

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EXTRACTOS DE *Larrea tridentata* CON ACTIVIDAD
ANTIFUNGICA E INHIBICION DE LA SINTESIS
DE AFLATOXINAS DE ESPECIES
DEL GENERO *Aspergillus*.**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

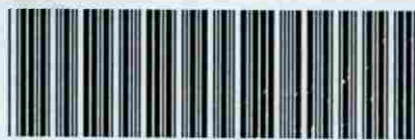
POR:

M.C. SHARLLI RUBI JUAREZ PALAFOX

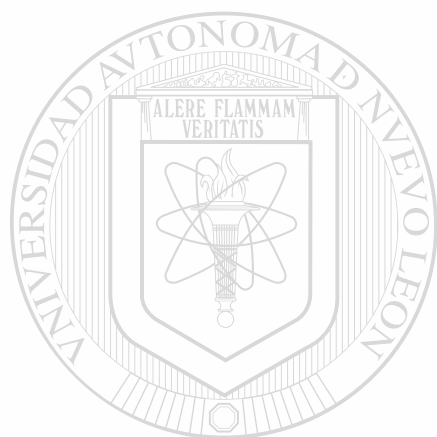
SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.,

JUNIO 2002

EXTRACTOS DE *Lorrea tridentata* CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA E INHIBICION DE LA SINTESIS DE AFLATOXINAS DE ESPECIES DEL GENERO *Aspergillus*.



1080124368



UANL

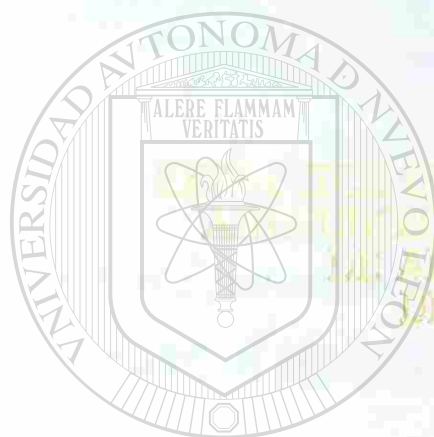
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
CARRERA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
CARRERA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

®

POR:

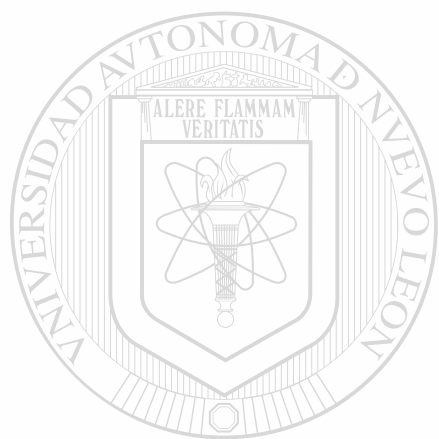
M.C. EBRAJIL RUBI RIVERA PALACIOS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

JUNIO 2002



TM
QP941
A3
J8
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EXTRACTOS DE *Larrea tridentata* CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA E INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE AFLATOXINAS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Aspergillus*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TESIS

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA.

POR

M.C. SHARLLI RUBI JUAREZ PALAFOX.

SAN NICOLAS DE LOS GARZA. N. L.

JUNIO 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**EXTRACTOS DE *Larrea tridentata* CON ACTIVIDAD ANTIFUNGICA E
INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE AFLATOXINAS DE ESPECIES DEL
GÉNERO *Aspergillus*.**

TESIS

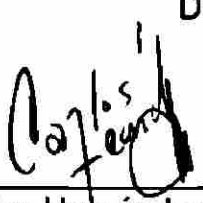
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGÍA.**

M.C. SHARLLI RUBI JUÁREZ PALAFOX.

**COMISION DE TESIS
APROBADA**


Dr. José Santos García Alvarado.
Director


Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Co-Director


Dr. Carlos Hernández Luna.
Asesor

San Nicolas de los Garza, N. L.

Junio 2002

**EXTRACTOS DE *Larrea tridentata* CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA
E INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE AFLATOXINAS DE ESPECIES
DEL GÉNERO *Aspergillus*.**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado, bajo la Co-dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y asesor Carlos Hernández Luna.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Este trabajo fue financiado por el primer programa de apoyo a la Universidad OMNILIFE 2000 "alimentar conciencia" y por el programa de apoyo a la investigación Científica y Tecnológica PAYCYT de la Universidad Autónoma de Nuevo León

DEDICATORIA

A mis Padres Ruth Perla Palafox Martínez y Alberto Juárez Reyes
por el amor, comprensión y consejos que siempre me brindaron
indicándome el camino a seguir siempre firmes en sus decisiones

A mis hermanos Helaman, Dorian y Zeltzin Aketzalit, por su
invaluable apoyo, estímulo y gran cariño que prodigaron en mis
momentos difíciles haciéndome ver que la vida es un reto.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A una persona muy especial (+), que ocupa mi corazón y mis
pensamientos, y aunque no este con migo fue el empuje para finalizar
este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación y la beca otorgada.

Al Dr. José Santos García Alvarado y la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, por sus asesorías, y enseñanzas en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Carlos Hernández Luna, por su asesoría, acertadas críticas y sugerencias que apliqué en mi trabajo aumentando la calidad del mismo

Al Dr. Rafael Castro Franco, por el valioso apoyo, asesorías, y sobre todo por su incondicional amistad y confianza.

A la Dra. Maria Julia Verde Start, por el apoyo y la confianza brindada para la realización de esta tesis (Gracias)

A mi amiga Ginebra G. Alarcón Flores, quien siempre estuvo presente compartiendo los momentos difíciles en toda mi carrera de Q.B.P. y de M.C. además de apoyar todas mis decisiones y cambios de carácter (Gracias).

Al M. C. Marco Escobar Aguilar y M. C. Perla Magdalena Ybarra Pérez por todos los momentos felices que pasamos durante la formación de Maestros en Ciencias, y por que de una manera u otra hicieron más ligero el trabajo en el laboratorio.

A Carlos Julián Rodríguez del Real, por su amor, y confianza que siempre han depositado sobre mi, dándome fortaleza.

A la Sra. Evangélica Martínez viuda de Cantú, a sus hijas Rocío y Eva Laura, a su nieta Karla María, quienes estuvieron a mi lado en todos los momentos, aconsejándome como seguir.

INDICE DE CONTENIDO

Página de título.	I
Comisión de Tesis	II
Localización	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice de contenido	VI
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	X
Abreviaturas y simbología	XIII
Resumen	1
Introducción	4
Antecedentes	6
Generalidades	6
Micotoxinas	7
Características fisicoquímicas de las aflatoxinas	10
Métodos de análisis para micotoxinas	11
Métodos de descontaminación	12
Legislación	13
Ocurrencia de aflatoxinas en México	13
Otras alternativas para controlar Aflatoxinas	14
Utilización de extractos de plantas como antifúngicos	16
Hipótesis	23
Objetivo	24
Método	25
Cepas utilizadas	25
Plantas utilizadas	25
Inóculo	25
Obtención del extracto	25
Determinación del actividad antifúngica de los extractos.	26

Determinación de la CMI	26
Determinación de la CMI en Maíz	27
Efecto del extracto sobre la producción de aflatoxinas	27
A) Medio de cultivo (A&M)	27
B) En Maíz	28
Cuantificación de Aflatoxinas por HPLC	29
Semicaracterización del compuesto activo	29
A) Bioautografía	29
B) Cromatografía en columna normal	30
CMI del ácido nordihidroguaiarético (NADG) en medio A&M	31
Resultados	32
Determinación de la actividad antifúngica de los extractos analizados	32
CMI de <i>Larrea tridentata</i> en medio de cultivo	33
CMI de <i>L. tridentata</i> en maíz	34
Efecto del extracto de <i>L. tridentata</i> sobre la producción de aflatoxinas	35
A) Curvas estándar para la cuantificación de aflatoxinas	35
B) Cuantificación de aflatoxinas en medio A&M	38
C) Cuantificación de aflatoxinas en Maíz	42
Semicaracterización del compuesto activo	46
A) Bioautografía	46
CMI del Ácido nordihidroguaiarético (NDGA)	56
Discusiones	57
Conclusiones	63
Literatura consultada	64

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1** 33
Actividad de los extractos de gobernadora sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* 1273.
- Figura 2.** 36
Curva de calibración del estándar de aflatoxina G₁.
- Figura 3.** 36
Curva de calibración del estándar de aflatoxina G₂.
- Figura 4.** 37
Curva de calibración del estándar de aflatoxinas B₁.
- Figura 5.** 37
Curva de calibración del estándar de aflatoxina B₂.
- Figura 6.** 47 [®]
Autobiografía de *A. flavus* 1059. El extracto de *L. tridentata* fue separado por TLC utilizando un sistema de cloroformo:metanol (9:1) y posteriormente se hizo crecer la cepa fúngica. La flecha indica el R_f de la banda que mostró la actividad biológica.
- Figura 7.** 49
Cromatografía en capa fina de extractos de *L. tridentata*. El extracto puro fue separado por cromatografía en columna utilizando como eluente cloroformo:metanol y posteriormente metanol absoluto (reveladas con cloruro de cobalto).

Figura 8. 50

Cromatografía en capa fina de extractos de *L. tridentata*. El extracto puro fue separado por cromatografía en columna utilizando como eluente cloroformo:metanol y posteriormente metanol absoluto (reveladas con sales de diazonio)

Figura 9. 52

Halos inhibición del crecimiento de fracciones extraídas de *L. tridentata* sobre *Aspergillus flavus* 1273.

Figura 10. 54

Cromatografía en capa fina de la fracción 3, revelada con (1) y sin (2) sales de diazonio.

Figura 11. 55

Bioautografía de una cromatografía en capa fina de la fracción 3 de extracto de *L. tridentata*. (1) sitio donde se encuentra la actividad inhibitoria del crecimiento de *A. flavus* 1059. (2) Visualización del compuesto activo revelado con sales de diazonio.

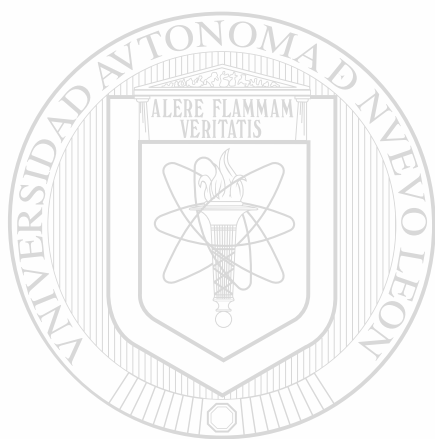
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	32
Actividad antifúngica de extractos.	
Tabla 2	34
Concentración mínima inhibitoria de <i>L. tridentata</i> sobre cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> , en dos medios de cultivo.	
Tabla 3.	35
Concentración mínima inhibitoria en Maíz.	
Tabla 4.	38
Ecuaciones obtenidas por los estándares para la cuantificación de aflatoxinas.	
Tabla 5.	39
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. flavus</i> 1273 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	
<i>L. tridentata</i>	
Tabla 6.	39
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. flavus</i> 1299 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	
Tabla 7.	40
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. flavus</i> 1059 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	
Tabla 8.	40
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. parasiticus</i> 148 diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	

Tabla 9	41
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. parasiticus</i> Sv-1 diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	
Tabla 10.	42
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. flavus</i> 1273 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> en maíz	
Tabla 11.	43
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. flavus</i> 1299 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> en maíz.	
Tabla 12.	43
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>A. flavus</i> 1059 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> en maíz.	
Tabla 13.	44
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>Aspergillus parasiticus</i> Sv-1 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> en maíz.	
Tabla 14.	44
Concentración de aflatoxinas producidas por <i>Aspergillus parasiticus</i> 148 a diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> en maíz.	
Tabla 15	45
Producción de aflatoxinas totales por 3 cepas de <i>A. flavus</i> a las que se les adicionó diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	
Tabla 16.	46
Producción de aflatoxinas por 2 cepas de <i>A. parasiticus</i> a las que se les adicionó diferentes concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> .	

Tabla 17	51
Concentración de Fracciones extraídas en columna cromatográfica (mg/75 μ l, aplicadas en una prueba de poso en agar.	
Tabla 18	53
Medida de los halos de inhibición del crecimiento por fracciones extraídas de <i>L. tridentata</i> sobre cepas de <i>Aspergillus</i> .	
Tabla 19	56
Concentración mínima inhibitoria del crecimiento sobre cepas de <i>Aspergillus</i> por NDGA y el extracto crudo de <i>L. tridentata</i> . CMI (μ g/ml).	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

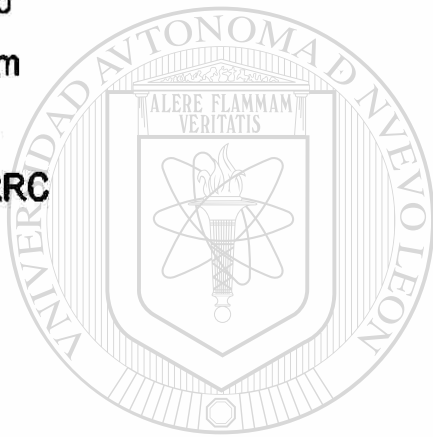
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE ABREVIACIONES

PDA	Agar Papa Dextrosa
A&M	Medio de cultivo Adye and Mateles
HCl	Ácido clorhídrico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
AF	Aflatoxina
AFB ₁	Aflatoxina B 1
AFB ₂	Aflatoxina B 2
AFG ₁	Aflatoxina G 1
AFG ₂	Aflatoxina G 2
AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica (Association of Official Analytical Chemist)
°C	Grados centígrados
T	Temperatura
d	días
h	Horas
et al	Y colaboradores
OMS	Organización Mundial de la Salud
FAO	Organización de Agricultura y alimentos (Food and Agricultura Organization)
FDA	Administración de Drogas y alimentos (Food and Drug Administration)
Fig	Figura
Tab	Tabla
g	Gramos
kg	Kilogramo
l	Litros

ml	militros.
μ l	microlitros.
μ g	Microgramos
M	Molar
mg	Miligramos
mm	Milímetros
Mm	Milimolar
pH	Concentración del ion hidrogeno
N	Normalidad
nm	Nanómetro
ppb	Partes por billon
ppm	Partes por millon
sp.	Especie.
SRRC	Centro de Investigación Regional del Sur (Southern Regional Research Center)
%	Por ciento



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

La presencia de micotoxinas en alimentos representa un grave peligro de salud pública, además de las pérdidas económicas que ocasionan a productores de alimentos. Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos por dos especies de hongos, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que tienen un alto potencial para contaminar una amplia variedad de cultivos agrícolas que afectan la calidad y el rendimiento de sus productos (Moreno- Matínez, 1996). Las aflatoxinas residuales en los desechos agrícolas y granos que son utilizados como alimentos para animales son ingeridas por éstos, se acumulan posteriormente en productos directos como leche, hígado y riñón y en productos elaborados como queso (ARS, 1993). La toxicidad extrema de las aflatoxinas, ocasiona que aun la presencia de bajos niveles de éstos compuestos sea motivo para indicar riesgos para la salud. Todos los seres vivos han resultado susceptibles a las aflatoxinas, algunas bacterias se inhiben en su presencia, ciertas plantas verdes presentan albinismo, las semillas pierden su capacidad de germinación. El grado de toxicidad varía de acuerdo con la especie por lo que la dosis letales en animales son variables, se pueden presentar efectos a dosis desde 0.5 hasta 20 μg de aflatoxina B1 por kg de peso corporal, dependiendo del tipo de ensayos biológicos utilizado (Peña y Duran, 1990). En mamíferos, provoca una amplia variedad de manifestaciones patológicas relacionadas con la capacidad de la aflatoxina para obstaculizar la síntesis de las proteínas, de reaccionar con las macromoléculas y organelos celulares así como de interferir en la producción normal de sistemas enzimáticos. El envenenamiento agudo con aflatoxinas causa necrosis y disfunción hepática y extensas lesiones hemorrágicas que resultan letales (Sharma, 1993; Yeh, et al., 1989).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre métodos físicos, químicos y biológicos para degradar a las aflatoxinas, sin embargo la estabilidad y termoresistencia que presentan han hecho difícil lograr resultados satisfactorios (Valle, 1991). Por otra parte, los compuestos efectivos para reducir el contenido de aflatoxinas presentan efectos no deseables en humanos, por lo que no han

podido ser aplicados en alimentos para prevenir la formación de aflatoxinas (Farag, *et al.*, 1989). La búsqueda de compuestos que inhiban el crecimiento de estos hongos y/o la producción de aflatoxinas es objetivo de estudio de grupos de investigación en diversas partes del mundo, ya que la contaminación de alimentos por hongos aflatoxigénicos sigue siendo un problema en muchos países (Moronuck, 1993).

Como fuente de productos fungicidas se han aislado compuestos de tipo de los flavonoides, cumarinas y triterpenoides con actividad fungicida que pueden utilizarse como conservadores naturales en alimentos (Duch, 1990; Picman, *et al.*, 1992; Yeh, *et al.* 1989; Vargas-Arispuro, 1994)

Tomando en cuenta este hallazgo nos dimos al estudio de la gobernadora (*Larrea tridentata*), una planta común en la región Norte México, rica en compuestos utilizados para muchos fines, como antivirales, anticancerígenos, insecticidas etc. La actividad antifúngica de los extractos fue evaluada sobre medio líquido Czapec-Dox (Difco) y medio A&M. La actividad antiaflatoxigénica se evaluó sobre medio A&M mediante HPLC.

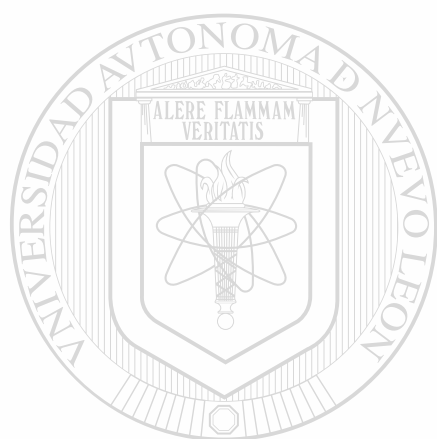
Se encontró una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) en Czapec de 3.03 $\mu\text{g/ml}$ a 3.9 $\mu\text{g/ml}$, y de 2.03 $\mu\text{g/ml}$ a 2.4 $\mu\text{g/ml}$ en A&M en cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. En cuanto a la inhibición de la síntesis de aflatoxinas en medio A&M, se dió en el 25%, 50% y 75% de la CMI en todas las cepas excepto para *A. flavus* 1059, que sólo produjo en el medio control.

La CMI que se encontró en maíz en condiciones de almacén fue de 20.0 $\mu\text{g/g}$ a 24.2 $\mu\text{g/g}$, encontrándose como cepa más sensible en este sistema a *A. flavus* 1299, ya que sólo sintetizó aflatoxinas hasta el 25% de la CMI.

Tanto en la producción de aflatoxinas en medio líquido como en maíz en condiciones de almacén, se presentó una diferencia estadísticamente significativa evaluada por dos métodos estadísticos (Dunnett y Student-Newman-Keuls).

También se realizó una semicaracterización del compuesto que le confería esa actividad antifúngica a *Larrea tridentata*, por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna, presumiblemente podemos decir que se trata del ácido nordihidroguaiarético (NDGA), que es una lignina con capacidad antifúngica,

anticancerígeno e insecticida, etc. El NDGA se probó en forma pura y se encontró un CMI que fue de 0.4 a 0.6 $\mu\text{g/ml}$ en las cepas de *Aspergillus* utilizadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales retos actuales, en el ámbito mundial, es la producción de alimentos libres de contaminantes. En los países en vías de desarrollo, alrededor del 85% de la alimentación depende de los productos agrícolas, en cambio, en los países desarrollados es el 40%. En términos generales se considera que la dieta del hombre, a nivel mundial, está constituida por un 70% de productos de origen animal. La gran mayoría de los productos agrícolas son invadidos por diversos microorganismos durante su desarrollo, en el campo, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades, lo que ocasiona fuertes pérdidas económicas. En particular, los granos y las semillas son invadidos por diversos hongos en almacén, la bodega, el silo y los trojes (Avalos, V. M., 2001).

La contaminación de materias primas y alimentos con hongos productores de sustancias tóxicas llamadas micotoxinas, es un problema mundial que puede ocasionar daños en la salud del hombre y los animales. Las micotoxinas son consideradas venenos inevitables en alimentos y no es posible predecir su presencia o prevenir enteramente su ocurrencia en los ingredientes alimenticios antes de la cosecha y durante su almacenamiento y procesamiento, dadas las actuales formas de manejo post-cosecha (Payne, G., 1992).

La micotoxina más común y de mayor interés en los alimentos balanceados es la aflatoxina. El primer reporte de esta toxina fue en el año de 1960, cuando más de 100,000 pavos murieron en Inglaterra; la causa del problema se encontró en un factor tóxico existente en la harina de cacahuete que se utilizaba en los alimentos como fuente de proteína. Se encontró que la causa del envenenamiento fue una toxina producida por *Aspergillus flavus*, a la cual llamaron aflatoxina (*Aspergillus flavus* toxina A-fla-toxina) (Chen, Z.-Y. et al 1998).

La aflatoxina B1 (AFB1), la más potente de todas, se encuentra en cereales, como el maíz, semillas de algodón, en diferentes nueces y casi siempre acompañada por las aflatoxinas B2, G1 y G2. Cuando el ganado consume alimento contaminado con AFB1, se encuentran residuos de ésta en la leche, la orina y las heces como AFM1, constituyendo así un riesgo para la salud pública. Esta

aflatoxina tiene una elevada resistencia al calor por lo que los procesos térmicos aplicados a la leche para consumo humano, no inactiva por completo el efecto tóxico de este compuesto (Avalos, V. M., 2001).

De ahí la importancia por erradicar estas sustancias de los productos agrícolas, evitando las infestaciones por hongos aflatoxigénicos en cultivos agrícolas. Una de las prácticas más comunes en la agricultura para solucionar esta problemática, es el uso indiscriminado de plaguicidas que superan los 10 millones de toneladas anualmente; los fungicidas cubren un 18% del volumen total. Sin embargo un reporte de la Academia Nacional de Ciencia (NAS) de los Estados Unidos sobre residuos de plaguicidas en los alimentos, estableció que los fungicidas poseen mayor riesgo carcinogénico que los insecticidas y herbicidas juntos (Wilson, C. *et al*, 1997).

Esta situación deja la necesidad de nuevas y mejores alternativas en la erradicación de plagas en cultivos agrícolas con modos de acción que sean más seguros para el hombre y su entorno biológico. Entre estas alternativas está el uso de compuestos naturales que pueden ser aplicados en el campo para inhibir el crecimiento del hongo y/o la producción de toxina, como se ha descrito en algunos trabajos reportados en la literatura.

Por tal motivo, en el presente trabajo se contempló el aislamiento y la caracterización de el o los compuestos presentes en el extracto alcohólico de *Larrea tridentata*, con actividad antifúngica y antiaflatoxigénica esta última analizada por HPLC.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES

La contaminación de alimentos agrícolas y pecuarios por hongos constituye un problema a nivel mundial. Los hongos pueden invadir los alimentos desde campo ó en el almacén, provocando una disminución en la calidad nutritiva y organoléptica en los alimentos invadidos, además ciertos hongos poseen la capacidad de sintetizar micotoxinas, sustancias químicas altamente peligrosas para la salud humana y animal. De la gran variedad de hongos existentes en los diversos ecosistemas, los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Pencillium*, siendo las especies más reconocidas *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ocraceus*, *F. moniliforme*, *P. niger*, que sintetizan toxinas hepatotóxicas, nefrotóxicas, inmunodepresoras y cancerígenas para los animales domésticos, las aves y los seres humanos (Peña, B. 1996)

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por Antonio Micheli, le dio ese nombre por el parecido de la cabeza conidial con las pilas bautismales de la época, llamada en latín "Aspergillum" (Micheli.P. A, 1729). Los miembros de este género son inmóviles, saprófitos y crecen en un amplio rango de substratos naturales y condiciones climáticas. Poseen un metabolismo versátil, ya que pueden estar presentes en bosques, piel, textiles, pinturas, plásticos, gomas, cemento y productos farmacéuticos teniendo de este modo una gran habilidad para dispersar sus esporas (Rippon, W. J. 1990).

Actualmente se conocen alrededor de 200 especies pertenecientes al género *Aspergillus*, de ellas solo 20 son consideradas patógenas para el hombre, entre ellas se encuentran: *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. parasiticus* (Bodey y Vartivarian, 1989). Dependiendo de las especies, pueden causar reacciones de hipersensibilidad, infecciones locales y diseminadas en pacientes inmunocomprometidos, micotoxicosis, etc. que en algunos casos pueden conducir a la muerte (Andriole, V. T., 1983; Gourama, H., *et al.*, 1995).

En 1902, Ceni y Besta en Italia, describieron los metabolitos de *Aspergillus* spp. como nocivos para animales, igual que Bidin y Gautier (1906), y

posteriormente Henrinci en Estados Unidos (1939). Hacia 1910, se habían descrito casi todas las formas de aspergilosis en animales, incluyendo el aborto micótico y la enfermedad respiratoria mortal. Posteriormente (1924) Clean encontró aspergilosis en tejido pulmonar necrosado, como enfermedad secundaria a la tuberculosis. Deve, la describió en 1938, como Aspergiloma por branquiectasia (pelota de hongos). Sin embargo, no fue hasta 1952 que se resaltó la importancia de la aspergilosis (Rippon, W. J., 1990).

Dentro del género *Aspergillus* las especies comúnmente involucradas son *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estas especies poseen características microscópicas que las diferencian como son la forma y tamaño de la cabeza conidial, el arreglo de las fialides, lo largo de las cadenas de los conidios y el color (Gourama, H., et al., 1995). Pero presentan características fisiológicas similares, tales como: su humedad relativa, la temperatura, requerimiento de oxígeno y el pH, así como también el tipo de micotoxinas que elaboran, mejor conocidas como aflatoxinas.

MICOTOXINAS

Actualmente se estima que el 25% de los cereales del mundo están contaminados con micotoxinas conocidas, mientras que un porcentaje mayor podría estar contaminado por toxinas aún no identificadas. No existe región alguna en todo el mundo que escape a la contaminación por micotoxinas y a su impacto negativo en la producción animal y la salud humana (Reyes, F. R. et al., 2000). Dentro de las micotoxinas de importancia económica se encuentran las aflatoxinas, zeralenona, vomitoxina, fumonisina, ocratoxina y la toxina T2. En climas cálidos existe una mayor cantidad de aflatoxinas y fumonisina, mientras que en áreas más frías se presenta la vomitoxina, ocratoxina, y toxina T2 (Ellis, W. O. et al., 1991). El mayor productor de micotoxinas es *Aspergillus*, ya que hasta el momento se ha establecido que produce las toxinas presentes en la tabla 1.

Tabla 1. Hongos productores de toxinas

<i>Aspergillus flavus</i>	Esterigmatocistina Aflatoxina Ácido aspergílico Ácido cójico Aspetoxina	Carcinogénica Hepatotóxica Mutagénica Teratogénica
<i>A. fumigatus</i>	Gliotoxina	Neurotóxica
<i>A. niger</i>	Ácido oxálico	Hepatotóxico, mutagénico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina Ácido penicílico	Carcinogénica Neurotóxica
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatosistina	Carcinogénica
<i>P. viridicatum</i>	Ocratóxina Citrina	Carcinogénica

Las micotoxinas involucradas en la cadena alimenticia pertenecen principalmente a tres géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Las especies de *Fusarium* producen micotoxinas y son consideradas patógenas destructoras de plantas, presentándose inmediatamente en la poscosecha. *Penicillium* y *Aspergillus* son comúnmente encontradas como contaminantes de diversos productos y alimentos (Sweeney, M. J., et al. 1998).

El término Aflatoxina, es una palabra compuesta que deriva de "A" del género *Aspergillus*, las letras "FLA" por la especie *flavus*, y el término "toxina" denota envenenamiento. Los *Aspergilos* toxigénicos son *A. flavus* y *A. parasiticus* y recientemente se describió *A. nomius*, pero es poco común.

Existen cuatro grupos mayores de aflatoxinas: B₁, B₂, G₁, G₂ y dos productos metabólicos adicionales, M₁ y M₂. Estas últimas fueron las primeras aisladas de la leche de animales lactando. La designación B resulta de la exhibición de fluorescencia azul bajo la luz UV y la designación G se refiere a la coloración amarillo verdoso también bajo LUV. De *A. flavus* sólo una proporción de los aislados puede producir aflatoxinas B₁, B₂ y ácido ciclopiazónico. *A. parasiticus*

produce B₁, B₂, G₁ y G₂ pero no ácido ciclopiazónico, y casi todos los aislados son toxigénicos. *A. nomius* es morfológicamente similar a *A. flavus* pero, así como *A. parasiticus* produce aflatoxinas B y G sin ácido ciclopiazónico.

La biosíntesis y el nivel de producción de aflatoxinas esta influenciada por la composición de los nutrientes en donde crecen los hongos, se ha observado que los azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, incrementan la biosíntesis de aflatoxinas en el caso de *A. flavus*, en tanto que la manosa y la xilosa estimulan la producción de aflatoxinas en *A. parasiticus*, pero las inhiben en *A. flavus* (Ellis, W. O. *et al*, 1991).

Las aflatoxinas, son acumulables en productos como leche, en órganos como hígado y riñón, así como en productos elaborados como queso (ARS, 1993). La alta toxicidad de estas toxinas, ocasiona que aun la presencia de bajos niveles de estos compuestos sea motivo para indicar riesgos de salud.

Todos los seres vivos han resultado susceptibles a las aflatoxinas, por ejemplo, algunas bacterias se inhiben en presencia de ellas, ciertas plantas verdes presentan albinismo, y las semillas pierden su capacidad de germinación. El grado de toxicidad varía de acuerdo con la especie afectada por lo que las dosis letales en animales son variables. Se ha reportado que se pueden presentar efectos a dosis que van de 0.5 hasta 20 µg de aflatoxina B₁ por kg de peso corporal (Peña, S. D., *et al.*, 1990). En mamíferos, la aflatoxicosis provoca una amplia variedad de manifestaciones patológicas, como el obstaculizar la síntesis de proteínas, o reaccionar con las macromoléculas y organelos celulares así como de interferir en la producción normal de sistemas enzimáticos, actuando como inhibidores biosintéticos de las rutas metabólicas, "*in vivo*" e "*in vitro*" (Moreau, C., *et al.* 1979). Se ha demostrado que las aflatoxinas B₁, G₁, y M₁ afectan la cadena respiratoria en mitocondrias, además de inhibir la ATPasa lo cual reduce la producción de ATP; además se ha observado que los niveles de glucógeno se reducen (Moss, M. O., *et al.* 1985). El envenenamiento agudo con aflatoxinas causa necrosis y disfunción hepática y extensas lesiones hemorrágicas que resultan letales (Sharma, A., *et al.* 1993; Yeh, *et al.*, 1989; Vargas-Arispu., *et al.*, 1998).

La aflatoxina B₁ es la micotoxina que se ha encontrado con más frecuencia y en altas concentraciones en alimentos. Esta aflatoxina se encuentra dentro de los carcinogénicos más potentes conocidos. La capacidad de la aflatoxina B₁ para producir mutaciones se debe a su habilidad para unirse covalentemente a la guanidina del ADN en la posición N-7 (aducto), afectando a nivel de transcripción; otros investigadores han observado que esta aflatoxina también se une al RNA impidiendo la transcripción (Swensen, *et al.*, 1977).

En 1990, Sabbioni demostró que la aflatoxina B₁ se une con los residuos de lisina encontrados en la albúmina sérica disminuyendo su actividad. También se observó que en el interior de la célula esta aflatoxina se interconvierte en B₂, la cual se une a aminoácidos libres y enzimas, provocando una reducción de la tasa de producción de proteínas.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS DE LA AFLATOXINAS

Las aflatoxinas químicamente son compuestos derivados de las isocumarinas (bifuranocumarinas) que pueden estar acopladas a un grupo de ciclopentanona (aflatoxina B₁ y aflatoxina B₂) ó a un anillo lactónico, (aflatoxina G₁ y G₂). Presentan la propiedad de fluorecer al ser expuestas a la luz ultravioleta de longitud de 365 nm. Se reconocen actualmente más de 20, siendo las más comunes en los alimentos la aflatoxina B₁, aflatoxina B₂, aflatoxina G₁ y aflatoxina G₂. Estas son solubles en metanol, acetonitrilo, cloroformo pero poco solubles en agua y en hidrocarburos. Son termoestables alcanzando un punto de ebullición por arriba de los 200°C. Todas presentan un efecto teratógeno, mutágeno y cancerígeno, siendo más tóxicas las aflatoxinas B₁ y G₁ (Peña, S. D., *et al.*, 1990).

MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA MICOTÓXINAS

Para determinar la contaminación de un alimento por aflatoxinas, existen diversos métodos, según se requiera rapidez, precisión, confiabilidad o reproducibilidad.

Existen métodos presuntivos, cualitativos, semicuantitativos, cuantitativos y confirmatorios. Entre los primeros se destaca la técnica de luz negra, la cual se ha descrito para cereales, que consiste en la exposición del grano quebrado a la luz ultravioleta (365 nm). La emisión de fluorescencia de color verde amarillento se toma como positivo. Esta es una técnica aprobada por la American Association of Cereal Chemists.

Entre los métodos cualitativos se encuentran los de minicolumna siendo el de Romer *et al.*, (1986) de los más utilizados para cereales y oleaginosas, con una sensibilidad de 10 ppb. El método involucra extracción química y cromatografía en columnas cortas de sílica gel o bien la sílica en combinación con fluorisil y laminas de aluminio y la subsiguiente separación de una banda fluorescente (Peña. B., *et al.*, 1998)

Entre los métodos semicuantitativos, la cromatografía de capa fina es la más común. Es oficial para aflatoxinas en cacahuates, sin embargo, una desventaja de esta técnica es la gran variabilidad en los resultados.

Entre los métodos cuantitativos la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía planar densitométrica son los más frecuentes en los laboratorios de calidad. Son muy efectivos, sin embargo, son costosos ya que requieren de materiales y personal capacitado. Existen también los métodos inmunoenzimáticos que tiene su fundamento en el desarrollo de columnas empacadas con anticuerpos monoclonales específicos para micotoxinas, como el biocop, aflatest y ocratest, entre otros. La ventaja que presentan los métodos cuantitativos como el HPLC con respecto a los ensayos inmunoenzimáticos es la sensibilidad.

METODOS DE DESCONTAMINACIÓN

Se han probado diversos métodos para eliminar a las aflatoxinas de los alimentos. Entre estos se incluyen los físicos como el de dilución; químicos como la tinción de bentonitas, zeolitas y aluminosilicatos y los microbiológicos. De todos estos sólo algunos han demostrado su eficiencia y sus ventajas comerciales.

Los aluminosilicatos se activan *In vivo* y secuestran a las micotoxinas, ya que la superficie molecular de estos aditivos, cuando son saturados con agua, atraen la parte funcional de su estructura química atrapándola contra su superficie. Los aluminosilicatos hidratados de sodio y calcio (HSCAS) a una concentración de 0.5 % adicionado a la dieta de pollos demostró sus efectos antiaflatoxigénicos (Kubena, L. F., *et al.*, 1993).

Algunos estudios realizados con *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, han demostrado ser efectivos eliminadores de las aflatoxinas, al ser atrapadas por las paredes de las levaduras. Se piensa que se debe a los mananoligosacáridos modificados conocidos como MOS que se encuentran en la pared celular de las levaduras (Devegowda, G., *et al.*, 1996).

La biotransformación microbiana es otro método prometedor que ha sido estudiado recientemente, para eliminar aflatoxinas. Esta constituye una forma de degradación no tóxica ya que utiliza microorganismos normales del tracto gastrointestinal. Otros grupos de investigación han estudiado hongos capaces de hidroxilar esteroides para eliminar aflatoxina B₁ (Erber, E. *et al.*, 1995). Los microorganismos que se incluyen son bacterias, actinomicetes, levaduras, moho y algas que pueden degradar aflatoxinas. Por ejemplo, *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, en solución acuosa puede irreversiblemente metabolizar y degradar aflatoxinas B₁, G₁, y M₁, o *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* y *L. plantarum* que se usan para prevenir el crecimiento del moho o para degradar aflatoxinas (Ellis, O. W., *et al.*, 1991)

LEGISLACIÓN

Se han realizado numerosos estudios con el fin de determinar los límites permisibles para diversas micotoxinas, en los Estados Unidos, Canadá, Bélgica, Francia, España, Italia, entre otros.

En Estados Unidos se han establecido límites de micotoxinas por producto y el destino de estos. En granos de consumo para bovinos de carne 300 ppb, bovinos 20 ppb, cerdos 200 ppb, sementales 100 ppb. En Suiza se prohíbe el uso de cacahuete y subproductos en la alimentación de bovinos de leche. Para granos de consumo humano la FAO y la OMS permiten 30 ppb, Canadá 20 ppb, Estados Unidos de Norteamérica 10 ppb, Francia 5 ppb, Suiza 2 ppb y Australia 5 ppb.

México ha establecido como Norma Oficial para Aflatoxinas en cereales y subproductos NOM-028-FITO-1995 (Peña, B. 1996), la cual permite menos de 20 ppb para consumo humano y animal.

OCURRENCIA DE AFLATOXINAS EN MÉXICO

Se considera que es inevitable la presencia de las micotoxinas en los cereales, oleaginosas y otros alimentos, por lo que en México se vigila que su concentración esté dentro de niveles permisibles; El Código Alimentario permite 20 microgramos por kilo (20ppb) en México; si bien hay presiones para llevarlo a 7µg/Kg e incluso menos. Se estima que en México la presencia de aflatoxinas en granos es del 1.5% de las muestras analizadas. De 1980 a 1989 se analizaron diferentes alimentos como cacahuetes que mostró una incidencia de aflatoxinas del 17%, el mazapán cerca del 48%; el maíz blanco, la fécula y la harina de maíz no mostraron contaminación por esta toxina; sin embargo el sorgo, cacao y leche, mostraron una incidencia de 33, 48 y 100% respectivamente (Guzmán, K. *et al.*, 1994).

De 1989 a 1992 se realizó un programa para supervisar la presencia de aflatoxinas en maíz en el Estado de Tamaulipas. Entre 1990 y 1991 se encontró que el 33.5% de la cosecha no pudo ser dispuesta como alimento ya que contenía de 21 a 400 mg/Kg de aflatoxinas totales. En Chiapas se han encontrado niveles bajos de aflatoxinas (8-12 ppb) pero bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos esta cantidad podría incrementarse (Juan- López, *et al.*, 1995).

En California si hizo un monitoreo de aflatoxinas en algodón y maíz, observándose que en campo se encontraban cantidades de 16 ppb y en almacén de 74 ppb, en cambio, en 1994, el promedio de aflatoxinas encontradas en los cultivos fue de 391 ppb en un rango de 9 – 2100 por plagas de insectos y las condiciones de labranza (Peña, S., M. Durán., 1990)

OTRAS ALTERNATIVAS PARA CONTROLAR AFLATOXINAS

Las plantas por su parte usan varios mecanismos de defensa para protegerse contra infecciones por patógenos. Estos mecanismos incluyen inducción de la modificación de la pared celular de plantas, la síntesis de fitoalexinas tóxicas, acumulación de proteínas con actividad antifúngica, inhibidores de proteasas o enzimas hidrolíticas relacionadas a patógenos blanco. Dentro de estas, se han reportado a las quitinasas y la 1, 3- β glucanasa, las cuales son sintetizadas en los tejidos vegetales de algunas plantas en respuesta a la invasión fúngica. Estas enzimas limitan el crecimiento fúngico mediante la degradación de quitina y 1, 3- β -Gluconasa (Leah, R. *et al.*, 1991).

Se ha establecido que el maíz (*Zea mays* L) contiene proteínas que funcionan como enzimas inhibidoras del crecimiento fúngico ((Guo, B. *et al.*, 1999; Chen, Z.-Y. *et al.*, 1998) y proteínas antifúngicas, tales como proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP), las cuales modifican e inactivan ribosomas extraños (;Gou, B. Z. *et al.*, 1997)

Se ha reportado que la actividad antifúngica de la zeamatina se debía a mecanismos de permeabilización de la membrana, facilitando la entrada de otros compuestos (Roberts, W. K. *et al.*, 1988; Gou, B. Z. *et al.*, 1998; Vigers, A. J. *et al.*, 1991; Gou, B. Z. *et al.*, 1997). Se encontró que existe una proteína de 14 KDa y otra de 18 KDa en varios genotipos de maíz (ejemplo; Qpaque 2, GT-MAS:Kg y MP420), que le confieren resistencia contra *A. flavus*, provocando cambios morfológicos de la hifa además de ruptura del conidio y también podía causar un efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de los hongos (Chen, Z.-Y. *et al.*, 1998; Guo, B. *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1997).

También existen antioxidantes como selenio, vitamina C, E y A, y carotenoides (caroteno y xantofila) que actúan contra los daños que provocan las aflatoxinas, ejemplo como quimiopreventivos o protectores contra la formación de aductos (DNA-AFB₁), antihepatotóxicos, antimutagénicos o anticancerígenos y anticitotóxicos (Shi, *et al.*, 1994; Webster. *et al.*, 1996; Coelho, M., 1996; Okotie, E. *et al.*, 1997; Rauscher, *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que ciertos componentes alimenticios y aditivos también presentan características anti-aflatoxigénicas, como el ácido elágico y el butilato hidroxitoueno, los cuales disminuyen la carcinogenesis y la mutagenesis inducida por aflatoxinas, al igual que otros aditivos alimenticios e ingredientes activos como el tumérico. Se ha encontrado también que compuestos de algunas plantas también tienen efectos inhibitorios sobre AFB₁ como el S-metilmetanotiosulfonato, que se encuentra en el jugo de col y cebolla (Cavin, C. *et al.*, 1998), los diterpenos, cafestol y kahweol y el ácido caféico presente en granos de café tostado y verde que actúan como agentes quimioprotectores contra la unión covalente de metabolitos AFB₁ a DNA de ratas (Manson. *et al.*, 1997). También se encontró que las piperinas y la cumarinas actúan como agentes protectores potenciales contra efectos carcinogénicos provocadas por las AFB₁ (Reen *et al.* 1997; Hault, R. J., *et al.* 1996; Goeger. D. *et al.*, 1998). La clorofila y sus derivados también presentan actividad quimiopreventiva contra AFB₁ (Breholt, V. *et al.*, 1995; Dashwood, R., *et al.* 1998)

UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMO ANTIFÚNGICOS

En América los primeros registros que se tienen del uso de plantas como antimicrobianos están contenidos en el Códice Badiano. Este libro fue escrito en 1552 por monjes Franciscanos que llegaron durante la conquista. Se dice que este libro contiene la información del uso de plantas como terapéuticos para tratar casi todas las enfermedades de la época. En 1571 se escribió otro libro por Francisco Hernández para constatar la sabiduría indígena sobre plantas medicinales (Lugo, E. E. 1992). Como se ve, las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas muy antiguas para el tratamiento de muchas enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos (Ríos, J. *et al.*, 1989). En los últimos años se ha realizado el análisis de algunas de estas plantas utilizadas en la cultura tradicional, lo que ha proporcionado validez científica para su uso. En nuestro país se han realizado estudios para evaluar la acción microbiológica de una gran diversidad de plantas medicinales, por ejemplo algunas utilizadas por los Mayas en el sur de México (Meckes, M. *et al.*, 1995) así como otras utilizadas por los aztecas (Davidson, J. and B. Ortiz, 1983). Muchas plantas acumulan sustancias orgánicas que se encuentran en cantidades suficientes para ser útiles (Dupis, G. *et al.*, 1972)

En 1986 la Academia Nacional de Ciencia de EUA reportó residuos de pesticidas los cuales fueron usados como fungicidas en algunos alimentos, indicando que estos pudieran presentar un riesgo carcinogénico, además le confieren resistencia a patógenos. Por lo tanto, las investigaciones se enfocan en la búsqueda de nuevas alternativas contra hongos y otras plagas, centrándose principalmente en productos naturales cuyos compuestos sean fácilmente degradables y no provoquen daño al humano y al medio ambiente (Wilson, C. *et al.*, 1997).

Uno de estos compuestos con propiedades antifúngicas es el cinnamilfenol, derivado de *Dalbergina* y *Machaenium* (Dupis, G. and B. Johori. 1972). Cinco años después se demostró que poseía también actividad antifúngica y fungiestática contra levaduras de importancia médica (Moore and Atkins, 1977). También en

ese año se probaron los aceites esenciales de especias sobre el crecimiento de levaduras que producían daño en alimentos y se observó que los aceites de ajo, pimienta, canela, clavo, cebolla y orégano presentaban la mayor inhibición de todos los probados (Conner and Beauchat, 1984).

El aceite de cebolla fue probado con cuatro cepas toxigénicas de hongos, analizándose la actividad inhibitoria del crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* var *globosus*, y la síntesis de esterigmatocistina y rubratoxina-A de *A. versicolor* y *Penicillium rubrum* (Zohri, A. et al., 1995). Por su parte el timol inhibió completamente el crecimiento de tres especies de *A. flavus*, *A. versicolor*, y *A. ochraceus*, a una concentración de 400 µg/ml. A menores concentraciones (200mg/ml) mostró una inhibición parcial en el crecimiento y la producción de las micotoxinas en *A. flavus* y *A. ochraceus*, y a 100µg/m se afectó el crecimiento y la producción de esterigmatocistina en *A. versicolor* (Hitokoto, H. S. et al., 1980).

En 1988, Paster y col. observaron que el extracto del tallo de olivo poseía actividad antifúngica y bactericida debido a que contenía ácidos cafeicos, algunas catequinas, cumarinas y ácido p-, o-, ó m- cumárico. Sólo el ácido cafeico y las o-cumarinas inhibían la producción de aflatoxinas en *Aspergillus flavus*, determinando que la producción de aflatoxinas no está relacionada con el crecimiento del hongo (Paster, N. et al., 1988). En 1999 Mahmoud, al estudiar extractos de plantas Egipcias como *Lupinus albus*, *Ammi visnaga* y *Xanthium pungens*, determinó que se inhibía el crecimiento y la producción de aflatoxinas en *A. flavus*, indicando que eran procesos correlacionados, pero sí afectó la relación en proporción de aflatoxina B₁ y B₂ (Mahmoud, A. L. 1999)

Beuchat y Golden en 1989 analizaron extracto de plantas, comunes utilizadas como agentes saborizantes y como preservativos, para inhibir el crecimiento fúngico, y demostraron que el aceite de tomillo (500mg/ml) tenía la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de *A. parasiticus*.

En 1992 se demostró la inhibición de la producción de aflatoxinas y crecimiento de *A. flavus* en granos de maíz, utilizando extractos de ajo y cebolla además de eugenol purificado del clavo. Se observó que la máxima inhibición de

crecimiento micelial ocurrió con el extracto de ajo y la inhibición mayor de producción de aflatoxinas ocurrió con el extracto de cebolla. El eugenol fue el compuesto con mayor actividad para inhibir la producción de aflatoxinas en los granos de maíz (Bilgrami, K. S. *et al.*, 1992).

Singh. *et al.*, en 1993, probaron 11 extractos acuosos de plantas medicinales en contra de 5 cepas fúngicas entre ellas *A. flavus*, y encontraron que los extractos de *Azadirachta indica* y *Ocimum sanctum* detuvieron el crecimiento fúngico. Se sugirió que el efecto inhibitorio se debía a la presencia de compuestos como terpenos, aceites esenciales, ciertos alcaloides, esteroides, gomas, resinas y fenoles presentes en las plantas.

Un año después, en 1994 se encontró que los aceites esenciales de canela, tomillo, orégano y comino eran capaces de detener el crecimiento micelial, así como la síntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Tantaoui-Elaraki, A. and L. Beraoud, 1994). En este mismo año se hicieron estudios en sapos (*Bufo regularis*) con tumores inducidos por aflatoxinas, y observaron que al alimentarlos con ajos la incidencia de los tumores se reducía en un 3-9%, por lo que, con este estudio se especuló que uno o más compuestos del ajo podían inhibir la carcinogénesis inducida por aflatoxina B₁ (el-Mofty, M. *et al.*, 1994). Así también, el extracto de nuez (*Semecarpus anacardium*) demostró ser efectivo en la reducción del hepatocarcinoma inducido por AFB₁ (Premalatha, *et al.* 1997). También se demostró que la administración del extracto metanólico de *Piper argyrophyllum* revertía los efectos genotóxicos de la AFB₁ en las células de ratas, y que extractos de *Thonninga sanguinea* eran capaces de proteger contra la hepatotoxicidad aguda ocasionada por esta aflatoxina a ratas (Kusamram, *et al.*, 1998).

Carnosol y el ácido carnosico, dos polifenoles naturales encontrados en *Rosmarium officinalis* L., son potentes inhibidores de la formación de aductos de DNA inducidos por AFB₁ *in vitro* (Kusamram, *et al.*, 1998).

En México, se demostró el efecto antimicrobiano de tres plantas del desierto de Chihuahuense contra 9 especies de bacterias y 10 hongos; encontrando que los extractos inhibían a más de uno de los microorganismos probados (Verastegui, A. *et al.*, 1996).

En 1997, Vargas-Arispu, *et al.*, determinaron que extractos de 5 plantas usadas en la medicina tradicional en el noroeste de Sonora presentaban inhibición del crecimiento y de la producción de aflatoxinas en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Los extractos de estas plantas inhibieron desde un 86% hasta un 100% la producción de aflatoxinas así como el crecimiento de los hongos.

Se han reportado que los extractos etanólicos de un concentrado de *Cassia senna* inhibía los efectos mutagénicos *in vitro* de AFB₁ cuando se aplicaba a bajas concentraciones. Además, se estableció que los compuestos responsables de la actividad fueron aglicones-antraquinones y los glicósidos naptopirone (Dankan *et al.*, 1994).

En 1998, se demostró la inhibición de *A. flavus* por algunas especies y plantas medicinales utilizadas comúnmente en China (Yin y Cheng., 1998). En ese año, Dhuley (1998) demostró la efectividad de extractos de Ashwandha (planta usada en la medicina tradicional hindú) en ratones con infecciones por *Aspergillus*. Este tratamiento fue dado por vía oral y probó ser más efectivo que los tratamientos con antimicóticos comunes. También se demostró el efecto inhibitorio de la formación de esporas en especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* por algunos aceites esenciales. Este trabajo determinó que el efecto se debía principalmente a una inhibición de la respiración del hongo.

En 1999, se estudió la actividad que presentaba el extracto de cebolla galés contra la producción de aflatoxinas y formación de esporas, en *A. parasiticus* y *A. flavus*, y se determinó que la sobrevivencia de las esporas dependía de la concentración y el tiempo de exposición del extracto. Estos efectos inhibitorios fueron similares a los presentados por los preservativos comúnmente usados (sorbato y propionato) (Fan, J. J., *et al.*, 1999).

Se han investigado las partes aéreas de plantas del género *Artemisia* y se encontró que poseen varios compuestos que inhiben el crecimiento fúngico de *A. flavus*, como el pinitol, umbeliferone, y flavones como hispidulin y belamcanidin así como también el santolinilol, un nuevo monoterpeno (Tan, R. X., *et al.*, 1999).

En este mismo año se estudiaron solas o combinadas, al ajo bakeri, al puerro chino, cebollino chino, chalote, y al bulbo de cebolla sobre *A. niger*, *A.*

flavus y *A. fumigatus*, y determinaron que la combinación de estas plantas inhibían mejor el crecimiento fúngico. (Yin, M. C., and S. M. Tsa. 1999)

En el 2000, Kim y col, investigaron la soya coreana la cual poseía ácido linoleico, el cual confiere capacidad para inhibir la síntesis de aflatoxinas sin afectar el crecimiento micelial (Kim, J. G. *et al.*, 2000). En este mismo año se demostró que el kolaviron un antioxidante que es considerado dentro del grupo de flavonoides, podía ser un quimiopreventivo potencial al inhibir la acción citotóxica y genotóxica de la AFB₁ en humanos (Nwankwo, J. O. *et al.*, 2000).

En el 2001, se realizaron investigaciones sobre extractos de la raíz de *Scutellaria baicalensis* y flavonoides sobre la aflatoxina B₁ oxidando enzimas del citocromo P450 en el hongo, y se determinó que tenía un efecto específico sobre CYP1A1/2 (enzima que da lugar a la formación de AFM₁). También se ha establecido que la *Salvia miltiorrhiza* previene la hepatocarcinogenesis inducida por AFB₁ (Liu, J. *et al.*, 2001). Además, se ha determinado que *Tamarix ramosissima* posee sustancias polifenólicas que actúan como antioxidantes, antibacterianos y antifúngicos (Sultanova, N. *et al.*, 2001).

Recientemente se investigó la actividad de la cúrcuma, una planta de la India, la cual posee una oleoresina, que se utiliza a nivel industrial; y se determinó que presentaba actividad antifúngica contra *A. flavus* por sus compuestos tumerone aromáticos, cúrcuma y curcunone junto con otros compuestos oxigenados (Jayaprakasha, G. *et al.*, 2001).

Como se puede ver, las plantas han sido una fuente muy diversa de compuestos antimicrobianos, sin embargo, aun falta mucho por conocer y explotar. En nuestro trabajo nos enfocamos al estudio de una planta muy común de la región norte de México, *Larrea tridentata* mejor conocida como gobernadora o chaparral, la cual ha tenido históricamente propiedades medicinales. Esta planta ha sido utilizada desde hace cientos de años por americanos nativos para varios propósitos, como tratamientos de infecciones urinarias, para deshacer cálculos renales, dolor de riñón e inflamación en la vejiga, tratamientos de problemas ginecológicos como la esterilidad femenina y en el posparto para regularizar la menstruación, hemorroides, fiebres, paludismo, granos, golpes, buena

cicatrización y reumatismo, dermatitis, hepatitis y como antiséptico, malestares gástricos, enfermedades venéreas y tuberculosis, en el tratamiento para micosis, además se ha especulado que posee actividad amibiana. Actualmente se utiliza como repelente para animales y aves, como insecticida del gorgojo pardo del frijol (*Acanthoscelides obtectus*, Coleoptera: Bruchidae); del barrenador mayor de los granos (*Prostephanus truncatus*, Coleoptera:Bostrichidae), funguicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium spp.* entre otros hongos fitopatógenos, además como agente terapéutico para el tratamiento de psoriasis, expectorante, antiviral y anticancerígeno (Coville. 1893).

Los compuestos químicos que contiene esta planta son, aluminio, beta-caroteno, calcio, carbohidratos (60%), clorine, cobalto, grasas (3%), fibras (10%), hierro, magnesio, NDGA (ácido nordihidroguaiarético), fósforo, potasio, proteína (10%), selenio, silicón, sodio, sulfuro y vitamina C. (http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_2000kromegel.html).

El compuesto químico responsable de muchas de las acciones antimicrobianas es una lignina. Ácido guaiarético, el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), el cual comprende 5-10% del peso seco de las hojas. Se ha encontrado que esta compuesto suprime la replicación del HIV-1 en células de humano infectadas y evita la trascricpción proviral y la transactivación regulada por Tat en el HIV, también se ha encontrado que inhibe el promotor que estimula citosinas del HIV (<http://www.ibiblio.org/london/alternative-healthcare/Southwest-School-ofBotanical-Medicine/Abstracs/Larrea-AB.txt>). Este compuesto presenta acción anti-inflamatoria posiblemente por su habilidad para bloquear la acción de la enzima lipoxigenasa que se encuentra en leucocitos, se piensa que por la misma acción de inhibición de esta enzima se debe su capacidad antitumoral, y se conoce que inhibe químicamente la división celular *in vitro*, sin embargo, el proceso de mitosis no se disminuye en estudios *in vivo*. (http://nutritionfocus.com/nutrition_supplementation/herbs/Chaparral.html#11)

Se ha encontrado que una alta cantidad de NDGA inhibe la cicloxigenasa componente de la prostaglandina sintasa, una enzima similar a la lipoxigenasa.

Además de ha establecido su actividad antiamebiana es debida a que contiene antioxidantes flavonoides

(http://wwwbccancer.bc.ca/pg_q_05.asp?PageID=1677&ParentID=2).

Según la FAO se estima que el 25% de los cultivos agrícolas a nivel mundial son contaminados por micotoxinas, de la cuales las aflatoxinas son las más predominantes. En base a todos estos estudios en los que se ha reportado y demostrado que las aflatoxinas producen efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en humanos y animales de laboratorio, resulta de gran importancia encontrar métodos adecuados para prevenir o eliminar estas sustancias.

Desde hace mucho tiempo una de las prácticas comunes en la agricultura para solucionar esta problemática, es el uso indiscriminado de plaguicidas que superan los 10 millones de toneladas anualmente; los fungicidas cubren un 18% del volumen total. Sin embargo, un reporte de la Academia Nacional de Ciencia (NAS) de los Estados Unidos sobre residuos de plaguicidas en los alimentos, estableció que los fungicidas poseen mayor riesgo carcinogénico que los insecticidas y herbicidas juntos. Esta situación deja en claro la necesidad de nuevas y mejores alternativas para la erradicación de plagas en cultivos agrícolas con modos de acción que sean mas seguros para el hombre y su entorno biológico (Wilson, G., 1998). Entre estas alternativas está el uso de compuestos naturales que pueden ser aplicados en el campo (Reyes, F. R., *et al.*, I. 2001). Por tal motivo en este trabajo se contempló el estudiar la Gobernadora (*Iarrea tridentat*) y poder establecer si posee compuestos con actividad antifúngica y antiaflatoxigénica.

HIPÓTESIS

Los extractos de *Larrea tridentata* presentan inhibición del crecimiento y producción de toxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* tanto "in vitro" como en condiciones simuladas de almacén.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS

Determinar la actividad de extractos de *Larrea tridentata* para inhibir el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIAL Y MÉTODO

SE UTILIZARON LAS CEPAS

Aspergillus flavus SRRC 1059

Aspergillus flavus SRRC 1273

Aspergillus flavus SRRC 1299.

Aspergillus parasiticus SRRC Su-1

Aspergillus parasiticus SRRC 148

Las cuales fueron donadas por el Dr. Deepak Bahtnagar del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Las cepas se mantuvieron en Agar Papa Dextrosa a -4°C y se realizaron siembras periódicas cada 8 días.

PLANTAS Y MAÍZ UTILIZADOS.

Se utilizó *Larrea tridentata*, mejor conocida como gobernadora o chaparral. Está fue colectada en Bermejillo, Durango mediante un muestreo aleatorio. Para los ensayos de maíz en condiciones de almacén, se utilizó un híbrido de maíz para ambientes de riegos restringidos del Norte de Tamaulipas, denominado H-437.

INÓCULO.

Se inocularon cajas con Agar Papa Dextrosa (PDA). Estas se incubaron a 28°C por 7 días, y transcurrido este tiempo se tomaron las conidias y se realizaron diluciones de las mismas en solución salina al 0.85% con Tween-20 hasta obtener una concentración de 1×10^5 conidias/ml. La concentración de conidias se determinó mediante conteo en cámara de Newbauer (Bulleman, *et al.*, 1977).

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.

Se tomó la planta, se lavó y se secó en una estufa de aire continuo, posteriormente se trituró en molino Willey con maya 10. Se colocaron 20g de planta/100ml de la solución de extracción [etanol al 96%, amortiguador de fosfatos y una mezcla de Metanol:HCl 0.1 N (3:1)] por 24 h. Posteriormente la muestra se

filtró con papel Whatman y se llevó a reflujo hasta su concentración en un aparato Soxhlet.

La solución extractora de Metanol:HCl provocó la aparición de dos fracciones, una acuosa y una aceitosa o resinosa. Ambas fracciones fueron colectadas y al igual que todos los extractos obtenidos fueron secados a temperatura ambiente por 7 d. Al momento de usarse se resuspendieron en etanol al 50% hasta observar una consistencia líquida. Se determinó el peso seco de los extractos y se almacenaron a 20°C hasta su uso, en un lapso no mayor de 15 d.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS.

Mediante la técnica de pozo en agar. Las Placas petri con agar papa dextrosa (Difco) fueron inoculadas con 0.5 ml de la solución de conidias previamente descrita. Estas se distribuyeron en la caja con ayuda de una asa de Driglasky. Sobre la superficie del agar se realizaron orificios de 5mm de diámetro y en ellos se colocaron 75 µl del extracto. Las cajas se incubaron a 28° C por 7 días, y después de este tiempo se determinó la presencia de halos de inhibición alrededor de los pozos. Se utilizó amortiguador de fosfatos como control negativo e hipoclorito de sodio al 85% como control positivo (Sánchez-García., 1995; Lozano., 1997). Este ensayo se realizó tres veces por duplicado.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO (CMI).

Se utilizaron tubos de 18 por 150 mm con 2 ml de medio Czapec-Dox (Difco) y/o A&M (por litro; Sacarosa 50.0 g, 3.0g (NH₄)SO₄, 10.0 KH₂PO₄, 2.0g MgSO₄·7H₂O, 0.7mg de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.5mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 10.0 mg de Fe₂(SO₄)₃·6H₂O, 0.3 mg de CuSO₄·5H₂O, 0.11 mg de MnSO₄·H₂O, 17.6 mg de ZnSO₄·7H₂O) (Cotty P. J. 1988) y se inocularon con una concentración de conidias de 1X10³ por ml. A esto tubos se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos, iniciando con concentraciones de 1 µg/ml con incrementos de 5µg/ml, y después se ajustó la CMI utilizando intervalos de concentraciones bajas. Se

incubaron por 7 d a 28°C y se realizaron observaciones cada 24 h con el fin de determinar la presencia o ausencia del crecimiento. La CMI se definió como la concentración mas baja de extracto que inhibió el crecimiento de los hongos durante el período de incubación. Cada experimento fue realizado al menos por duplicado con tres repeticiones.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) EN MAÍZ.

El maíz (H-437) fue descontaminado con un lavado de hipoclorito de sodio al 0.75% y con enjuagues de agua destilada estéril en tres ocasiones. Se secó a 37°C durante toda la noche. Se pesaron 10 g de maíz y se inocularon con 1×10^6 conidias/g (Guo, B. Z., *et al.* 1995). Se homogenizó bien y posteriormente se añadieron diferentes concentraciones del extracto, iniciando con concentraciones bajas y aumentándolas en intervalos de 5 µg, para después reducirlas hasta encontrar la CMI. El maíz fue incubado en cámara húmeda simulando condiciones de almacén. La CMI se definió como la concentración de extracto más bajo que inhibió el crecimiento visible del hongo en la superficie de maíz. Estos experimentos se llevaron a cabo al menos por duplicado con tres repeticiones cada uno.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EFFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS.

A) EN MEDIO DE CULTIVO (A&M).

Para este ensayo se utilizaron matraces de 250 ml con 50 ml de medio A&M a los cuales se le añadieron diferentes concentraciones del extracto equivalentes al 25, 50, 75 y 100% de la CMI respectivamente (Cotty, P. J. 1988). Los matraces se inocularon con 1×10^3 conidias/ml, y se incubaron a 28°C por 7 días en oscuridad y estáticos.

Al cabo de este tiempo se añadieron a los matraces 25 ml de acetona y 40 ml de diclorometano, se agitó a 300 rpm por 30 min. a temperatura ambiente, la

suspensión se filtró al vacío con papel Whatman # 3 para separar el micelio del medio de cultivo y se añadieron 20 ml de diclorometano. Y se repitió el proceso.

El precipitado se recuperó y se dejó secar toda la noche a 40°C. El filtrado se pasó a un embudo de separación, en donde se formaron dos fracciones, una del medio de cultivo y la otra de diclorometano donde se encontraba la posible fracción de aflatoxinas. Esta fracción se separó, recuperándose el diclorometano en un matraz, y se volvieron a añadir 20 ml de diclorometano a la fracción acuosa, y se repitió el procedimiento anterior. Ambas fracciones de diclorometano se juntaron, y se les añadieron 25 ml de agua saturada con NaCl.

Se separaron las fracciones de diclorometano y agua. A la fracción de diclorometano se le añadió 1.5 g de Na_2SO_4 y la fracción acuosa se desechó. La fracción con el Na_2SO_4 se filtró y concentró con papel Whatman #5 en rotavapor a una temperatura de 30 a 40°C. Este concentrado se resuspendió en 10 ml de acetonitrilo (Wheeler, H. M., D. Bhatnagar and M. G. Rojas., 1989) y se hizo pasar por una columna de 3 ml Supelclean™ LC-18 SPE para su purificación y concentración. De la solución eluida se desechó el acetonitrilo y las aflatoxinas adheridas a la columna se eluyeron con 5 a 6 ml diclorometano, se secó a 45°C, y después se resuspendió en 3 ml de acetonitrilo para realizar su cuantificación por HPLC.

La columna Supelclean™ LC-18 SPE fue activada previo a su uso utilizando primero 2 ml de metanol seguido de 2 ml de agua.

B) EN MAÍZ.

Se colocaron en una caja Petri 10 g de maíz al cual se adicionaron el 25, 50, 75 y 100% de la CMI. Se inocularon con 1×10^5 conidias/g. Las placas fueron incubadas a 28°C por 15 días con una humedad relativa semejante a las de almacén, y al cabo de este tiempo se realizó la extracción de las aflatoxinas.

Se colocó al maíz en una licuadora, y se agregaron 25 ml de acetona y 40 ml de diclorometano. El molido se pasó a un matraz y se agitó a 300 rpm por 30 min a temperatura ambiente y se filtró al vacío con papel Whatman #3 para separar las partículas de grano y micelio, de la mezcla líquida. El resuspendido se

lavó con 20 ml de diclorometano, y al filtrado se le realizó la misma metodología descrita en el punto anterior.

CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS POR HPLC.

Se utilizó un cromatografo líquido de alta presión (Shimadzu LC-10ADVP) con detector fluorescente (FR-10AXL), con columna Nova-Pak C18 de 3.9 X 150 mm, la cual posee una asa calibrada de 20 μ l, y se realizó la lectura a una longitud de onda de 360 nm.

Para realizar este ensayo se utilizó como fase móvil una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo (63:26:11) y como solución derivatizante una mezcla de ácido trifluoroacetico (TFA), ácido acético glacial y agua (100 μ l, 50 μ l y 350 μ l) la cual contenía 100 μ l de la muestra en estudio. Esta solución se activó a una temperatura de 65°C por 10 min. Y después se inyectó en el HPLC, y (Selim, M. I., M.A. Juchems and Popenorf W., 1998). Los picos obtenidos se compararon con una curva estándar previamente obtenida para determinar la concentración de las diferentes aflatoxinas en el medio. (AOAC., 1995)

SEMICARACTERIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO.

A) BIOAUTOGRAFÍA

La ubicación del compuesto activo se realizó por el método bioautográfico, el cual se apoya en los métodos de difusión y cromatografía (Ríos, Elfo, Hamburger Touchstone, 1980)

Para realizar este se modificó el método descrito por Hamburger. Se utilizaron placas cromatográficas de 2.5 X 7.5 cm y se cubrieron con una placa de sílica gel 7 G (Backer). A una proporción de 10 g de sílica por 25 ml de agua. Después que se secaron las placas se activaron a 120°C por 1 h. Los eluentes utilizados para el corrimiento de los extractos fueron seleccionados de acuerdo a experimentos previos. Se seleccionó la mezcla que separó el mayor número de compuestos, que fue cloroformo:metanol:acetona (7:1:2).

El extracto resuspendido en etanol 50% se colocó a 1 cm del borde inferior de la placa de cromatografía previamente activada con ayuda de un capilar. La aplicación se hizo gota por gota y en forma continua (banda). Se colocó la placa en una cámara cromatográfica que contenía los eluentes ya mencionados, permitiendo que la muestra corriera por capilaridad hasta una distancia aproximada de un 1 cm. del extremo superior de la placa. Se sacó de la cámara y se secó a temperatura ambiente para evaporar los eluentes. Se midió el Rf (frente de corrida) de cada fracción, posteriormente se cubrió con Agar se gelificó y sobre este se añadió una suspensión de conidias de las cepas en estudio, y se incubaron a 28°C por 7 días. La zona en donde no hubo crecimiento fue medida y correlacionada con el Rf que previamente se había registrado (Verastegui, M. A., *et al.* 2000).

B) CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA NORMAL.

El extracto se preparó, lavándolo con agua destilada 3 veces para eliminar el exceso de ácido clorhídrico que se utilizó en la maceración del material vegetal. Se obtuvo un precipitado chicloso (10 g), el cual fue mezclado con la sílica gel Kieselgel 60 (70-230 mesh ASTM Merck). La mezcla se secó hasta obtener una consistencia semejante a la sílica gel.

Para poder obtener un volumen significativo de los componentes del extracto se utilizó una columna de vidrio de 70 cm de longitud y 5 cm de diámetro, la cual fue empacada con sílica gel. En la parte superior a esto se añadió la mezcla de extracto y sílica gel previamente obtenida. Para terminar de empacar la columna se colocó un fragmento de algodón en la parte superior a fin de que el eluyente no cayera directo sobre la muestra. Se utilizaron 1.5 L de cloroformo y 2 L de cada mezcla de cloroformo:metanol (9.5:0.5, 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4). De esta cromatografía se recuperaron 40 fracciones de 250 ml.

Las fracciones obtenidas se separaron por cromatografía en capa delgada (TLC; Thin-Layer Chromatography) utilizando cloruro de cobalto como revelador general y sales de diazonio, para observar específicamente la presencia de flavonoides, a que se ha reportado que el ácido nordihidroguaiarético presenta un

estructura química semejante a un flavonoide, y que le confiere actividad a esta planta.

Se seleccionaron aquellas fracciones que dieron bandas semejantes en TLC, se unieron, secaron y mezclaron para volver a fraccionar por cromatografía en columna como se describió previamente, utilizando cloroformo:metanol (9.5:0.5). De esta separación se obtuvieron 8 fracciones de 250 ml. Se secaron y se resuspendieron en cloroformo y metanol, y se repitió la ubicación de las fracciones por TLC, utilizando como eluente cloroformo:metanol (9:1). A las fracciones obtenidas se les realizaron pruebas químicas; como la de Shinoda y cloruro férrico, a fin de identificar la presencia de grupos flavonoides e hidroxilos fenólicos, como los que se encuentran en el NDGA. Además se utilizó la técnica de pozo en agar utilizando estas fracciones, para señalar las que poseían actividad antimicrobiana, así como autobiografía para ubicar la actividad antimicrobiana y poder corroborar si se trata de NDGA.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ÁCIDO NORDIHDROGUALARÉTICO (NADG) EN MEDIO A&M.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Esta determinación se hizo de la misma manera que la determinada de la CMI del extracto analizo. En este caso se partió de una solución estándar de NDGA (Sigma chemical) ajustada a 10 mg/ml.

RESULTADOS.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ANALIZADOS.

Se probaron 3 tipos de extracciones, con etanol al 50%, amortiguador de fosfatos pH 7 y metanol:ácido clorhídrico 0.1N (3:1), para determinar cual mostraba efecto inhibitorio sobre las cepas analizadas. Se consideraron positivos aquellos extractos que mostraron halos de inhibición del crecimiento alrededor del pozo. Los resultados se muestran en la tabla y en la figura 1, en donde observamos que solo una de las fracciones extraída con metanol y HCl mostró actividad inhibitoria.

Tabla 1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS.

Extracto <i>Larrea tridentata</i>	<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Aspergillus parasiticus</i>	
	1059	1273	1299	Sv-1	148
Extracción					
Etanol 50%	ND	ND	ND	ND	ND
Amortiguador de fosfatos	ND	ND	ND	ND	ND®
Metanol:ácido clorhídrico 0.1N (3:1) Fracción acuosa	ND	ND	ND	ND	ND
Metanol:ácido clorhídrico 0.1N (3:1) Fracción aceitosa	+	+	+	+	+

ND: No presentó halos de inhibición.

+: Si presento halos de inhibición.

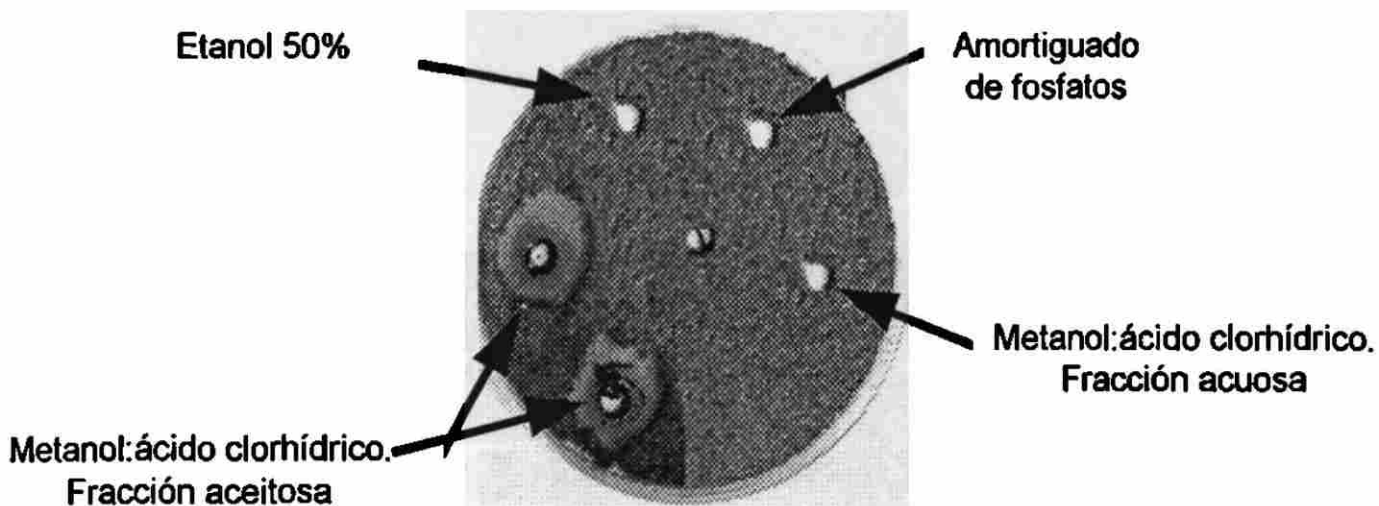


FIG. 1

ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE GOBERNADORA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS FLAVUS* 1273.

Cuando se realizó la extracción con este sistema de solventes, obtuvimos una fracción acuosa y otra aceitosa. Esta última fue la que mostró la actividad inhibitoria, y con ella fue con la que se siguió trabajando.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE *LARREA TRIDENTATA* EN MEDIO DE CULTIVO

Se determinó la CMI, utilizando el medio A&M y el Czapek-Dox. Encontramos que la CMI fue muy semejante en ambos medios, variando de 3.03 a 3.66 en el medio Czapek y 2.13 a 2.40 en medio A&M (Tabla 2).

El análisis estadístico demostró que existe diferencia significativa entre la CMI de los 2 tipos de medio de cultivo y las cepas utilizadas.

Tabla 3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN MAÍZ.

Maíz H-437	<i>Aspergillus flavus</i> (µg/g)			<i>Aspergillus parasiticus</i> (µg/g)	
	1299	1273	1059	Sv-1	148
Concentración	21.7 ± 2.58*	21.7 ± 3.42	20.0 ± 2.24	20.8 ± 3.03	24.2 ± 1.29

*Desviación estándar de la media.

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *L. TRIDENTATA* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS.

A) CURVA ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS.

En la elaboración de este análisis se hicieron curvas estándar de calibración para cada una de las aflatoxinas, y de este modo obtener la ecuación de la recta a fin de determinar la concentración de aflatoxinas presente en nuestros tratamientos, mediante curvas de calibración (Figuras 2, 3, 4, y 5) y sus ecuaciones correspondientes (Tabla 4).

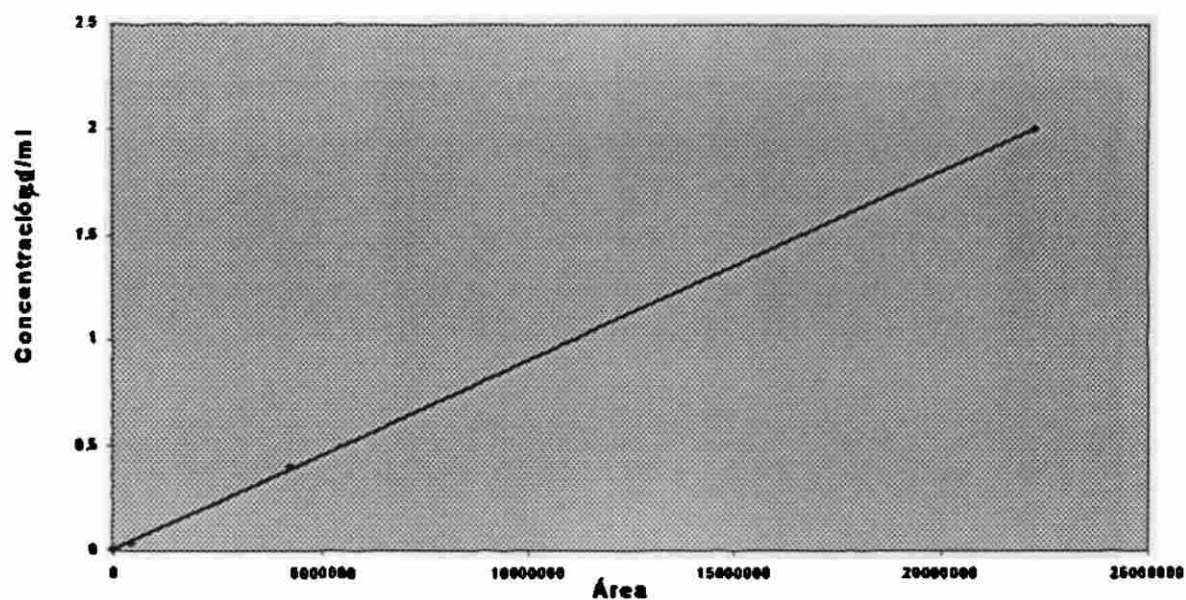


Figura 2. Curva de calibración del estándar de aflatoxina G₁.

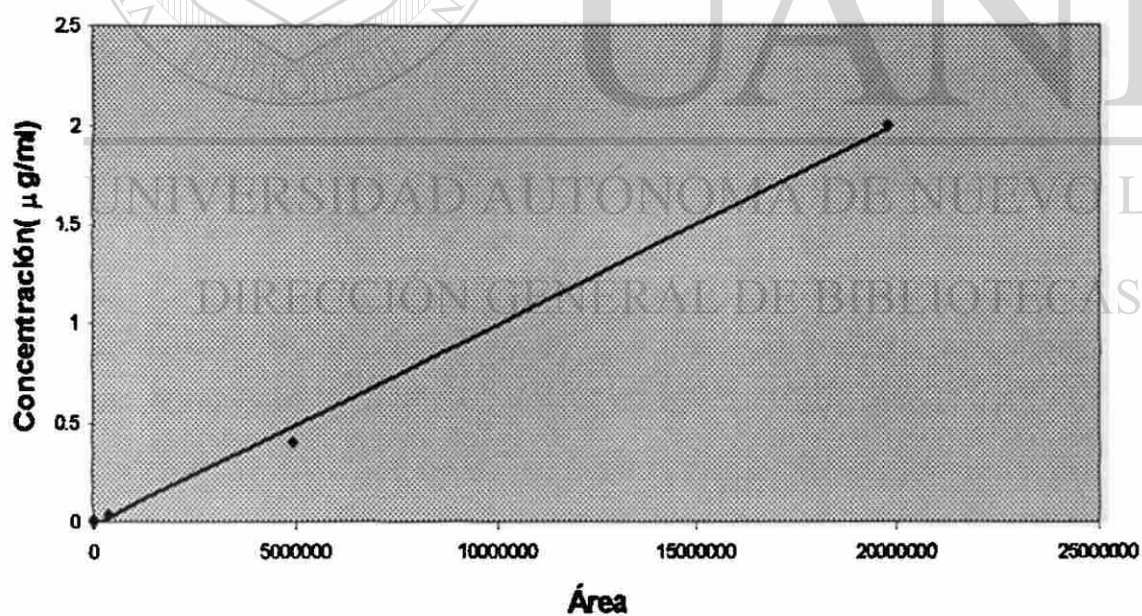


Figura 3. Curva de calibración del estándar de aflatoxina G₂.

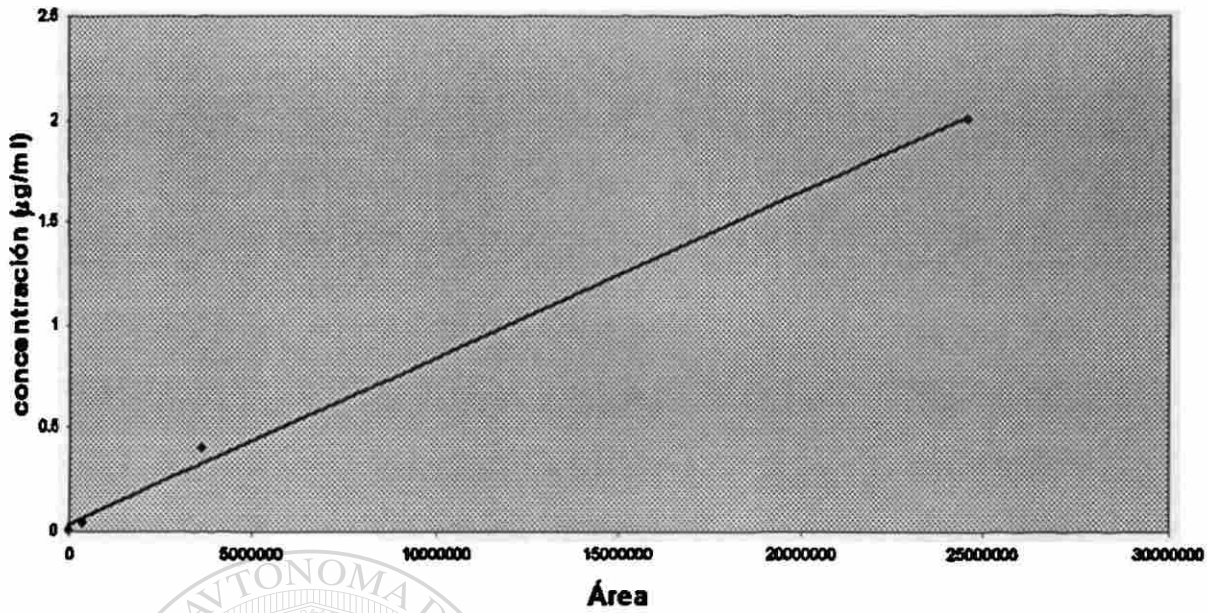


Figura 4. Curva de calibración del estándar de aflatoxinas B₁.

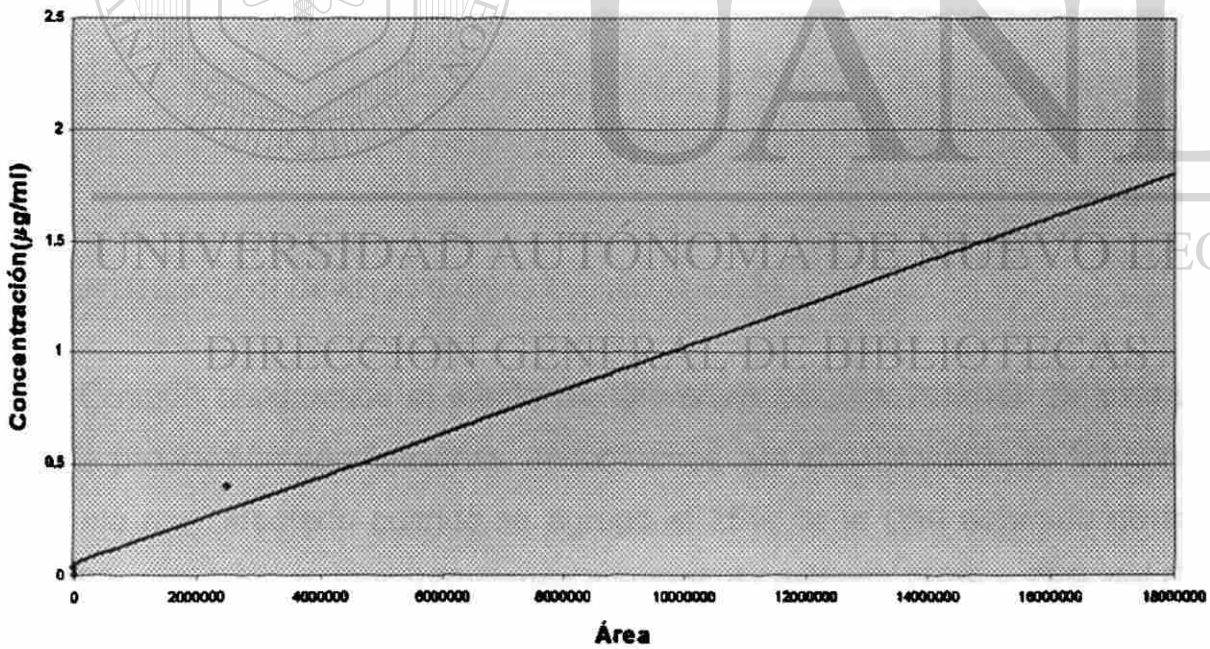
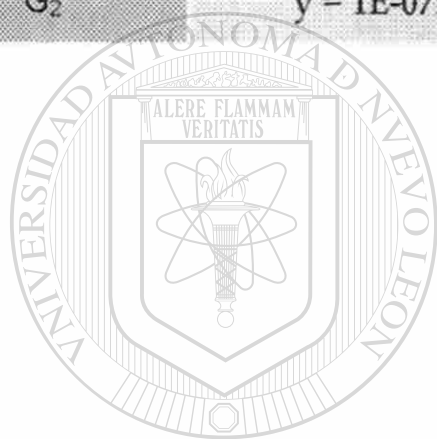


Figura 5. Curva de calibración del estándar de aflatoxina B₂.

Tabla 4. ECUACIONES OBTENIDAS POR LOS ESTÁNDARES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS.

Aflatoxina	Ecuación de la recta.	Coefficiente de correlación.
B ₁	$Y = 8E-08x + 0.0285$	R ² = 0.9975
B ₂	$y = 1E-07x + 0.0486$	R ² = 0.9948
G ₁	$y = 9E-08x + 0.0078$	R ² = 0.9999
G ₂	$y = 1E-07x - 0.0158$	R ² = 0.9971



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

B) CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN MEDIO A&M.



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Quando analizamos el efecto de diferentes concentraciones de extractos sobre la producción de aflatoxinas, encontramos que el crecimiento de los hongos no se vió muy afectado cuando se agregó el 25% de la CMI obtenida de cada cepa. Sin embargo, a concentraciones mayores de extracto (50% y 75% del CMI) si se observo disminución en todas las cepas, lo cual, también se vió reflejada en la concentración de aflatoxinas encontradas en cada caso (Tablas 5 a 9).

TABLA 5. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. flavus* 1273 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. TRIDENTATA*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Peso seco del Micelio (mg)	Aflatoxina ($\mu\text{g/ml}$)		Aflatoxina Totales ($\mu\text{g/ml}$)
		B ₁	B ₂	
Control	602 \pm 60*	73 \pm 8	14 \pm 2	90 \pm 10
25%	445 \pm 44	0.9 \pm 0.2	0	0.9 \pm 0.2
50%	109 \pm 40	0	0	0
75%	35 \pm 25	0	0	0
100%	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

*Análisis usado para la comparación múltiple de medias en la síntesis de aflatoxinas, fue Dunnett y Student-Newman-Keuls

UANL

Tabla 6. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. flavus* 1299 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. TRIDENTATA*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Peso seco del Micelio (mg)	Aflatoxina ($\mu\text{g/ml}$)		Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/ml}$)
		B ₁	B ₂	
Control	574.7 \pm 45*	553 \pm 73	22 \pm 3	578 \pm 72
25%	480 \pm 59	30 \pm 4	15 \pm 3	45 \pm 6
50%	243 \pm 39	0	0	0
75%	20 \pm 8	0	0	0
100%	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

*Análisis usado para la comparación múltiple de medias en la síntesis de aflatoxinas, fue Dunnett y Student-Newman-Keuls

Tabla 7. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. FLAVUS* 1059 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. TRIDENTATA*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Peso seco del Micelio (mg)	Aflatoxina ($\mu\text{g/ml}$)		Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/ml}$)
		B ₁	B ₂	
Control	613 \pm 76*	9 \pm 2	1 \pm 0.3	10.2 \pm 2
25%	463 \pm 38	0	0	0
50%	279 \pm 76	0	0	0
75%	30 \pm 7	0	0	0
100%	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

*Análisis usado para la comparación múltiple de medias en la síntesis de aflatoxinas, fue Dunnett y Student-Newman-Keuls.

UANL

Tabla 8. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. parasiticus* 148 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. TRIDENTATA*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Peso seco del Micelio (mg)	Aflatoxina ($\mu\text{g/ml}$)				Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/ml}$)
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
Control	647 \pm 51*	30 \pm 3	20 \pm 3	20 \pm 3	5 \pm 0.7	76 \pm 9
25%	493 \pm 74	16 \pm 2	1 \pm 0.2	3 \pm 0.9	4 \pm 0.9	23 \pm 4
50%	176 \pm 62	0	0	0	0	0
75%	18 \pm 2.3	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

*Análisis usado para la comparación múltiple de medias en la síntesis de aflatoxinas, fue Dunnett y Student-Newman-Keuls

Tabla 9. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. parasiticus* Sv-1 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Peso seco del Micelio (mg)	Aflatoxina ($\mu\text{g/ml}$)				Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/ml}$)
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
Control	640 \pm 96*	168 \pm 24	30 \pm 7	25 \pm 6	5 \pm 2	227 \pm 29
25%	528 \pm 61	16 \pm 3	1 \pm 0.4	1 \pm 0.3	0	18 \pm 3
50%	266 \pm 69	0	0	0	0	0
75%	18 \pm 2	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

*Análisis usado para la comparación múltiple de medias en la síntesis de aflatoxinas, fue Dunnett y Student-Newman-Keuls

Las cepas que sintetizaron las cuatro aflatoxinas fueron *A. parasiticus* Sv-1 y *A. parasiticus* 148. Las cepas *A. flavus* 1273, 1059 y 1299 sólo formaron aflatoxinas B₁ y B₂. Estas toxinas se detectaron cuando se agregó la concentración de extracto más bajo (25% de la CMI) en la mayoría de las cepas.

Encontramos que la cepa que tuvo la mayor producción de aflatoxinas fue *A. flavus* 1299, la de menor producción fue *A. flavus* 1059.

El análisis usado para la comparación múltiple de medias en la síntesis de aflatoxinas, fue Dunnett y Student-Newman-Keuls. Este reveló la existencia de diferencia significativa en la producción de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ entre los tratamientos y las cepas control. También se encontró diferencia significativa entre las cepas analizadas.

c) CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN MAÍZ.

En el ensayo con maíz se observó la producción de las cuatro aflatoxinas por *A. parasiticus* Sv-1 y *A. parasiticus* 148, en tanto que *A. flavus* 1299, 1273 y 1059 sintetizaron B₁, y B₂.

La cepa que produjo una cantidad mayor de aflatoxinas fue *A. flavus* 1273 y la que sintetizó menos fue *A. flavus* 1059. Encontramos la misma tendencia que obtuvimos en los ensayos realizados en medio de cultivo ya que a medida que se incrementaba la concentración del extracto se disminuía la cantidad de aflatoxinas producidas (Tablas 10 a la 14). Esta tendencia fue observada en todas las cepas analizadas.

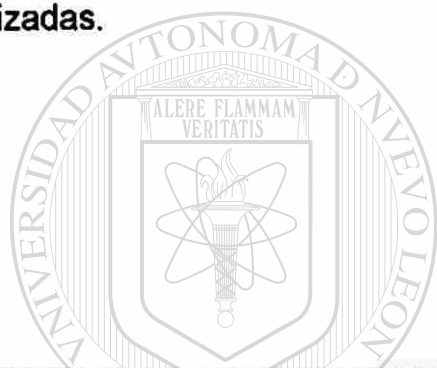


Tabla 10. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. flavus* 1273 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata* EN MAÍZ.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Aflatoxina (µg/g)		Aflatoxinas Totales (µg/g)
	B ₁	B ₂	
Control	311.2 ± 28.4	57 ± 5	368 ± 33
25%	14.4 ± 3.1	21 ± 2	35 ± 5
50%	7 ± 1	6 ± 1	13 ± 1
75%	0.85 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2 ± 0.2
100%	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

Tabla 11. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. flavus* 1299 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata* EN MAÍZ.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Aflatoxina ($\mu\text{g/g}$)		Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/g}$)
	B ₁	B ₂	
Control	25 \pm 2	8 \pm 2	34 \pm 3
25%	11 \pm 2	3 \pm 1	14 \pm 2
50%	0	0	0
75%	0	0	0
100%	0	0	0

*Desviación estándar de la media.



UANI

Tabla 12. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *A. flavus* 1059 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata* EN MAÍZ.

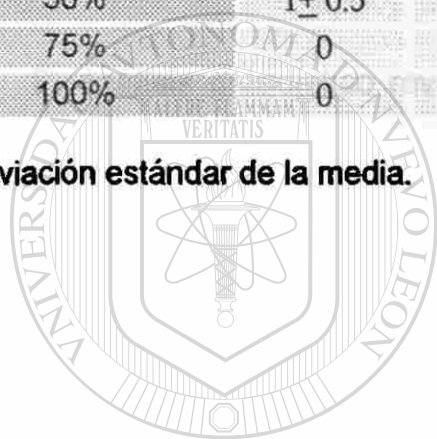
Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Aflatoxina ($\mu\text{g/g}$)		Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/g}$)
	B ₁	B ₂	
Control	9.8 \pm 1	3 \pm 0.2	12 \pm 1
25%	4.2 \pm 1.3	1 \pm 0.1	6 \pm 1
50%	4.6 \pm 0.5	1 \pm 0.3	6 \pm 0.3
75%	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	1 \pm 0.2
100%	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

Tabla 13. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus parasiticus* SV-1 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata* EN MAÍZ.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Aflatoxina ($\mu\text{g/g}$)				Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/g}$)
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
Control	13 \pm 2	17 \pm 2	12 \pm 2	11 \pm 3	51 \pm 7
25%	5 \pm 2	7 \pm 1	4 \pm 2	4 \pm 1	21 \pm 6
50%	1 \pm 0.5	4 \pm 1	1 \pm 0.2	2 \pm 0.6	8 \pm 2
75%	0	0	0	0	0
100%	0	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.



UANL

Tabla 14. CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus parasiticus* 148 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata* EN MAÍZ.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	Aflatoxina ($\mu\text{g/g}$)				Aflatoxinas Totales ($\mu\text{g/g}$)
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	
Control	10 \pm 1	13 \pm 3	16 \pm 5	6 \pm 1	45 \pm 10
25%	3 \pm 0.5	8 \pm 0.7	1 \pm 0.2	2 \pm 0.5	15 \pm 1
50%	1 \pm 0.1	3 \pm 1	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	6 \pm 1
75%	0.3 \pm 0.08	1 \pm 0.2	0	0	2 \pm 0.3
100%	0	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

Encontramos que *A. flavus* 1059 fue el más resistente, el cual redujo un 90% la producción de aflatoxinas cuando se adicionó el 75% de la CMI del extracto de *L. tridentata*. En contraparte *A. flavus* 1299 fue el que menos sintetizó aflatoxinas y el más sensible, el cual redujo la producción de aflatoxinas en un 50% al agregar el 25% del CMI del extracto, ya que cuando se aumento la concentración del extracto (50% del CMI) no se detectó producción de aflatoxinas.

Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en medio de cultivo encontramos que en algunas cepas la cantidad de aflatoxinas producida fue mucho menor, sin embargo, ambos tienen la misma tendencia (Tablas 15 y 16).

El análisis estadístico reveló la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos y los controles y entre las diferentes cepas analizadas.

Tabla 15. PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES POR 3 CEPAS DE *A. flavus* A LAS QUE SE LES ADICIONÓ DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	1273		1299		1059	
	Maíz (µg/g)	A&M (µg/ml)	Maíz (µg/g)	A&M (µg/ml)	Maíz (µg/g)	A&M (µg/ml)
Control	368 ± 33*	90 ± 10	34 ± 3	581 ± 73	12 ± 1	10 ± 2
25%	35 ± 5	0.9 ± 0.2	14 ± 2	46 ± 6	6 ± 1	0
50%	13 ± 1	0	0	0	6 ± 0.3	0
75%	2 ± 0.2	0	0	0	1 ± 0.2	0
100%	0	0	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

Tabla 16. PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS POR 2 CEPAS DE *A. parasiticus* A LAS QUE SE LES ADICIONÓ DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO DE *L. tridentata*.

Cantidad de extracto agregado (% de la CMI)	148		Sv-1	
	Maíz ($\mu\text{g/g}$)	A&M ($\mu\text{g/ml}$)	Maíz ($\mu\text{g/g}$)	A&M ($\mu\text{g/ml}$)
Control	45 \pm 10*	76 \pm 9	51 \pm 7	227 \pm 29
25%	15 \pm 1	23 \pm 4	21 \pm 6	18 \pm 3
50%	6 \pm 1	0	8 \pm 2	0
75%	2 \pm 0.3	0	0	0
100%	0	0	0	0

*Desviación estándar de la media.

SEMICARACTERIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO.

A) BIOAUTOGRAFÍA.

Lo primero que realizamos fue seleccionar la mezcla de solventes que se separaran el extracto en un mayor número de componentes (mayor número de bandas) por cromatografía en capa fina. Para esto probamos los eluentes cloroformo, metanol, acetona, benceno y butanol, solos y en mezclas. Encontramos que el mejor sistema de elusión resultó ser cloroformo:metanol:acetona (7:1:3).

Cuando realizamos la bioautografía, establecimos que la banda que mostró actividad inhibitoria del crecimiento en todas las cepas de *Aspergillus* analizadas tenían un R_f de 0.66 ± 0.07 (Figura 6). El compuesto se consideró de naturaleza polar ya que la utilizar únicamente cloroformo (compuesto no polar), este no migró, por lo que fue necesario utilizar una mezcla que incluyera solventes polares y no polares para poder obtener una mejor separación de bandas.

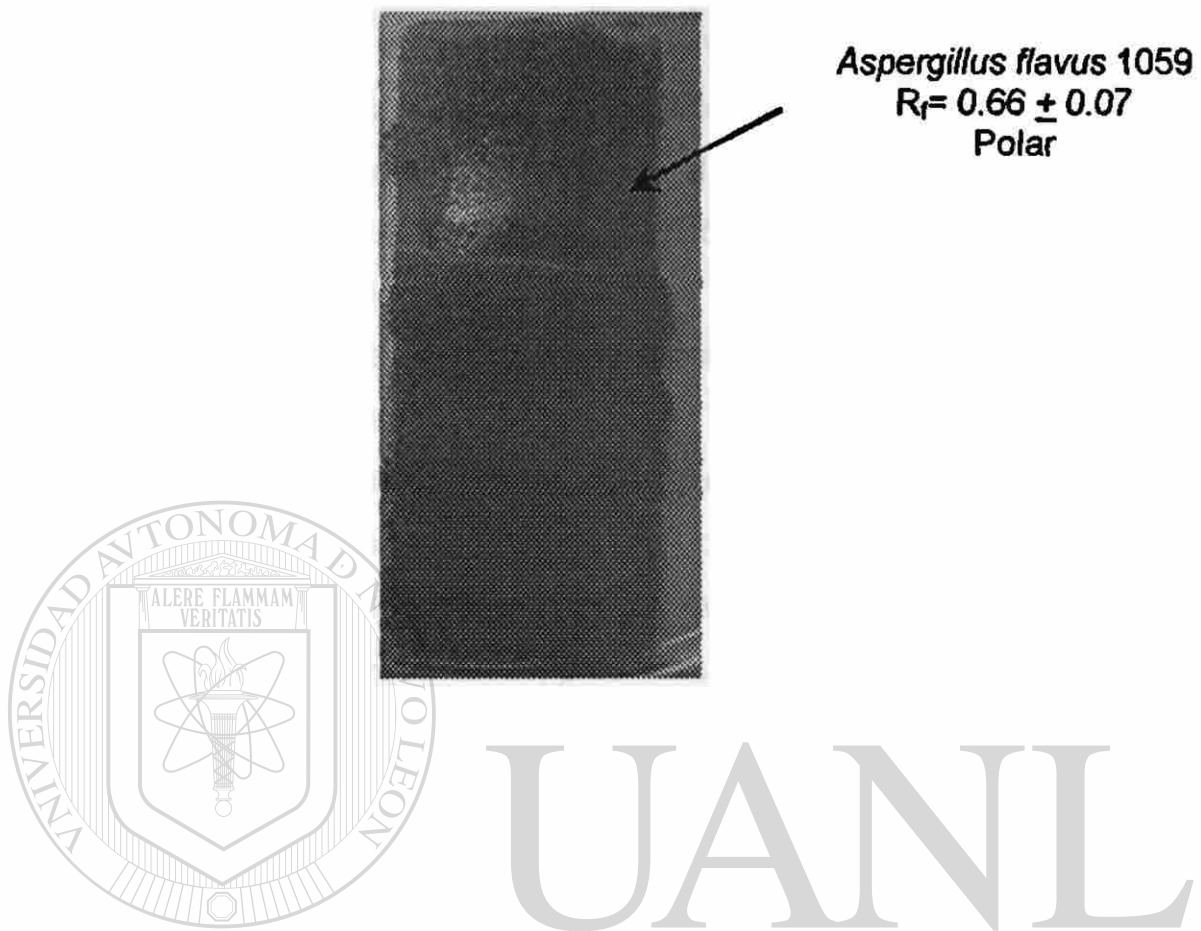
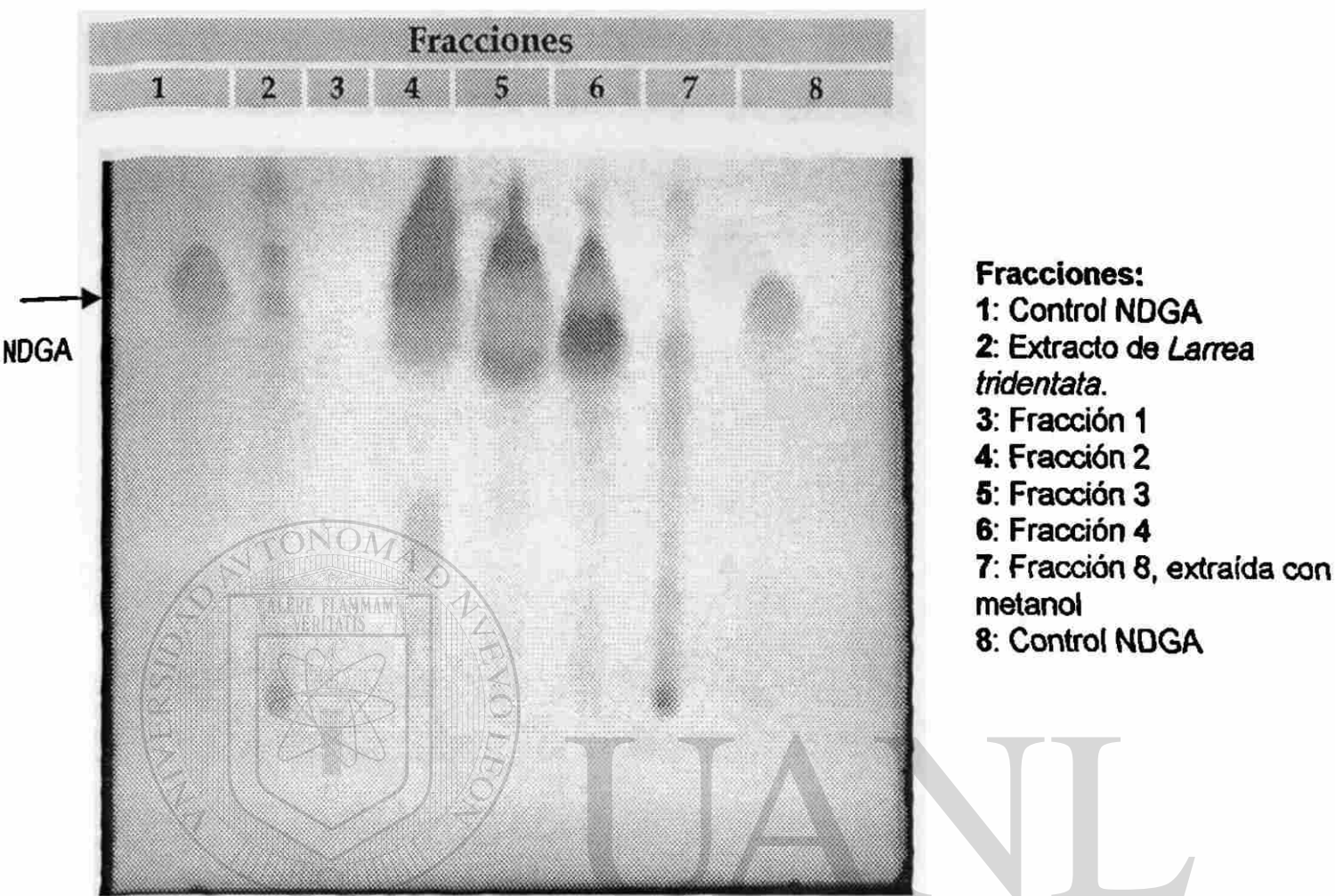


FIGURA 6. AUTOBIOGRAFÍA DE *A. FLAVUS* 1059. EL EXTRACTO DE *L. TRIDENTATA* FUE SEPARADO POR TLC UTILIZANDO UN SISTEMA DE CLOROFORMO:METANOL (9:1) Y POSTERIORMENTE SE HIZO CRECER LA CEPA FÚNGICA. LA FLECHA INDICA EL R_F DE LA BANDA QUE MOSTRÓ LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Posteriormente se realizaron dos extracciones por cromatografía en columna utilizando como eluente un sistema de cloroformo:metanol a diferentes proporciones en donde se obtuvieron, en la primera extracción, 40 fracciones, que se analizaron por TLC con cloruro de cobalto, y se unieron fracciones que presentaron bandas parecidas. La segunda extracción se realizó con la mezcla de las fracciones que presumiblemente presentaban el NDGA según el revelado con sales de diazonio, obtenidas de la primera extracción, con la finalidad de obtener el compuesto más puro, de la que se obtuvieron 8 fracciones de las cuales 7 de ellas se obtuvieron con mezcla de cloroformo:metanol, la última fracción se obtuvo utilizando metanol como eluente.

Estas fracciones se visualizaron por TLC reveladas con cloruro de cobalto, y se encontraron tres fracciones parecidas, que presumiblemente contenían el NDGA (Figura 7). Además se utilizaron otros reveladores como las sales de diazonio (un revelador de $-OH$ fenólicos, presentes en el NDGA), la cual también dió positivo (Figura 8), lo mismo que la prueba química con cloruro férrico al 1-2% (prueba específica para fenoles), que dió un color verde intenso indicando ser positiva para fenoles, en las fracciones, 4, 5 y 6, semejantes al comportamiento del control de NDGA utilizado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIGURA 7.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE EXTRACTOS DE *L. tridentata*. EL EXTRACTO PURO FUE SEPARADO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA UTILIZANDO COMO ELUENTE CLOROFORMO:METANOL Y POSTERIORMENTE METANOL ABSOLUTO (REVELADAS CON CLORURO DE COBALTO).

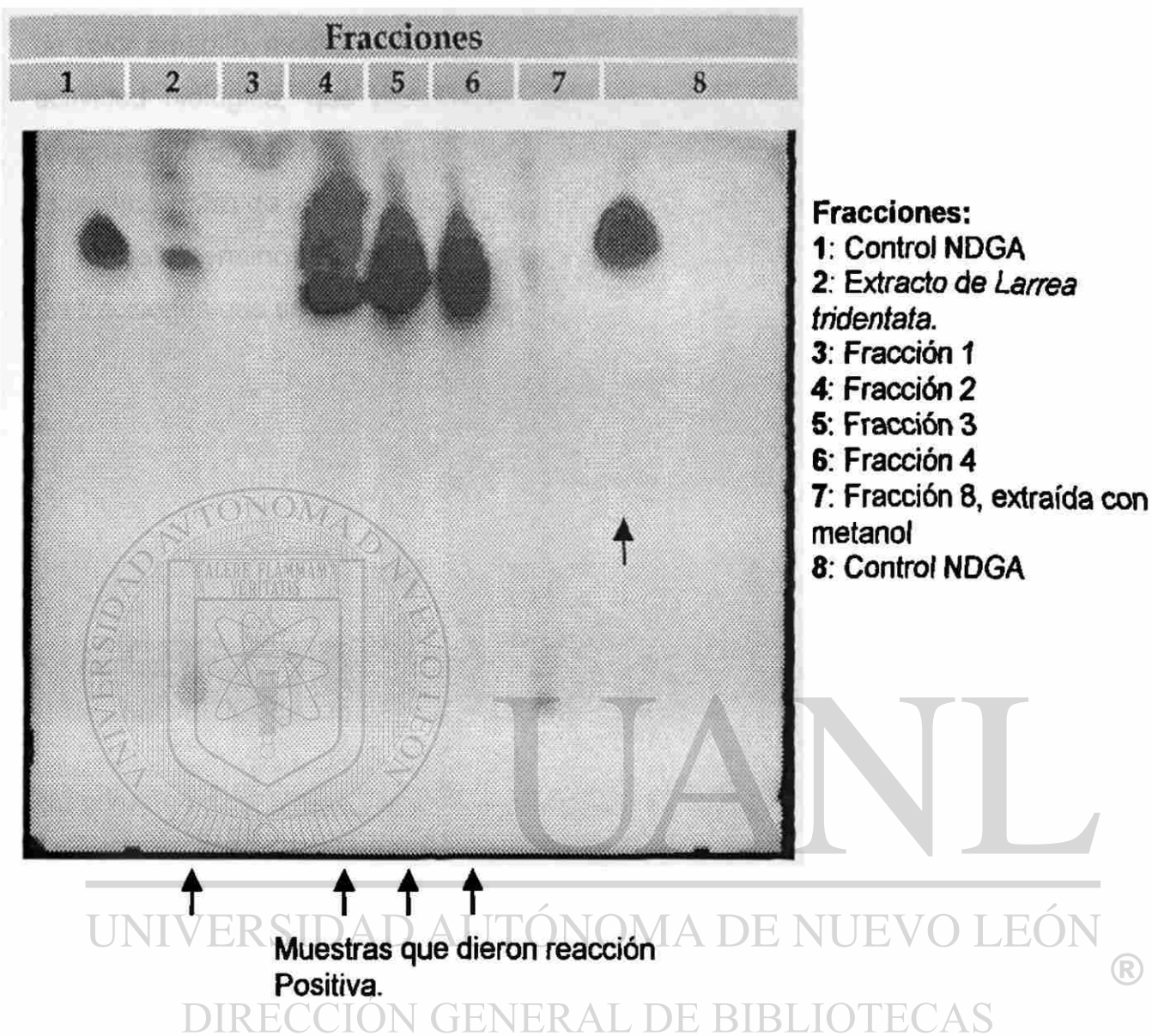


FIGURA 8.

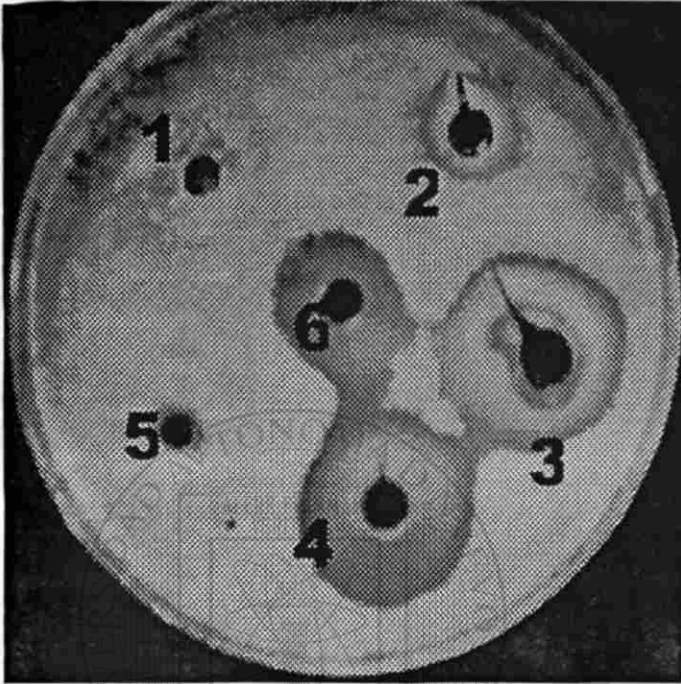
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE EXTRACTOS DE *L. TRIDENTATA*. EL EXTRACTO PURO FUE SEPARADO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA UTILIZANDO COMO ELUENTE CLOROFORMO:METANOL Y POSTERIORMENTE METANOL ABSOLUTO (REVELADAS CON SALES DE DIAZONIO).

Utilizando estas fracciones se realizó un ensayo para ubicar en cual de ellas se encontraba la actividad biológica. La fracción uno, era de consistencia aceitosa de color amarillo, mostró una inhibición temporal, solo por 4 días. Sin embargo, la actividad biológica, que permaneció por más de 7 días, se encontró en las fracciones 2, 3 y 4 (Figura 9), en donde se encuentra el NDGA. Estas fracciones mostraron halos de inhibición semejantes al control de NDGA utilizado (Tabla 18).

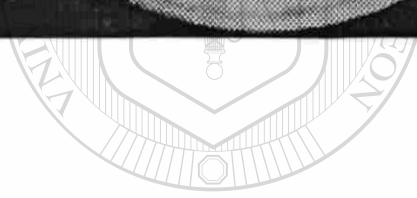
Se determinó la concentración que se utilizó en cada pozo, de cada una de las fracciones que se probaron (Tabla 17).

Tabla 17. CONCENTRACIÓN DE FRACCIONES EXTRAÍDAS EN COLUMNA CROMATOGRÁFICA (mg/75 μ l, APLICADAS EN UNA PRUEBA DE POSO EN AGAR.

Numero de pozo	Contenido	Concentración en 75 μ l
1	Fracción 1 (aceitosa NO NADG)	9.4
2	Fracción 2 (posee NDGA)	117.9
3	Fracción 3 (posee NDGA)	28.7
4	Fracción 4 (posee NDGA)	24.6
5	Fracción 8 (extraída con metanol, NO NADG)	3.6
6	Control (NADG)	0.8



Pozo	Fracción
1	Fracción 1
2	Fracción 2
3	Fracción 3
4	Fracción 4
5	Fracción 8
6	Control NDGA.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

FIGURA 9.

HALOS INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE FRACCIONES EXTRAÍDAS DE *L. tridentata*

SOBRE *Aspergillus flavus* 1273.

Tabla 18. MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR FRACCIONES EXTRAÍDAS DE *L. tridentata* SOBRE CEPAS DE *Aspergillus*.

Cepas	Numero de fracción (mm)						Extracto crudo
	1	2	3	4	5	6	
<i>A. flavus</i> 1273	7 ± 0.7*	19 ± 1.4	27.5 ± 27.5	18 ± 0	0	13.5 ± 2.1	13 ± 0
<i>A. flavus</i> 1299	5.5 ± 0.7	10.5 ± 2.1	21.5 ± 3.5	16.5 ± 0.7	0	11 ± 1.4	11 ± 1.3
<i>A. flavus</i> 1059	5.5 ± 0.7	19.5 ± 6.3	16 ± 2.8	17.5 ± 2.1	0	13 ± 1.4	13.5 ± 2
<i>A. parasiticus</i> 148	6 ± 0	11.5 ± 0.7	21 ± 1	15.5 ± 2.1	0	11 ± 1.4	9.8 ± 1
<i>A. parasiticus</i> Sv-1	6.5 ± 0.7	13 ± 2.8	20 ± 2.8	14 ± 0	0	10.5 ± 0.7	10.5 ± 1.4

*Desviación estándar de la media.

Una vez que se ubicaron las fracciones que contenían la actividad inhibitoria y que coincidieron en contener presumiblemente el NDGA, se seleccionó aquella que por TLC mostró contener menos compuestos (visualizado por menor número de bandas). La fracción 3 fue sometida a TLC, usando como eluente cloroformo:metanol (9:1), se reveló con sales de diazonio. A estas placas se les realizó la bioautografía. Encontramos que la banda que mostró la actividad biológica correspondía a una banda revelada con sales de diazonio, la cual presumiblemente correspondía a NDGA (Figura 10 y 11). Estos resultados se presentaron al probar todas las cepas.

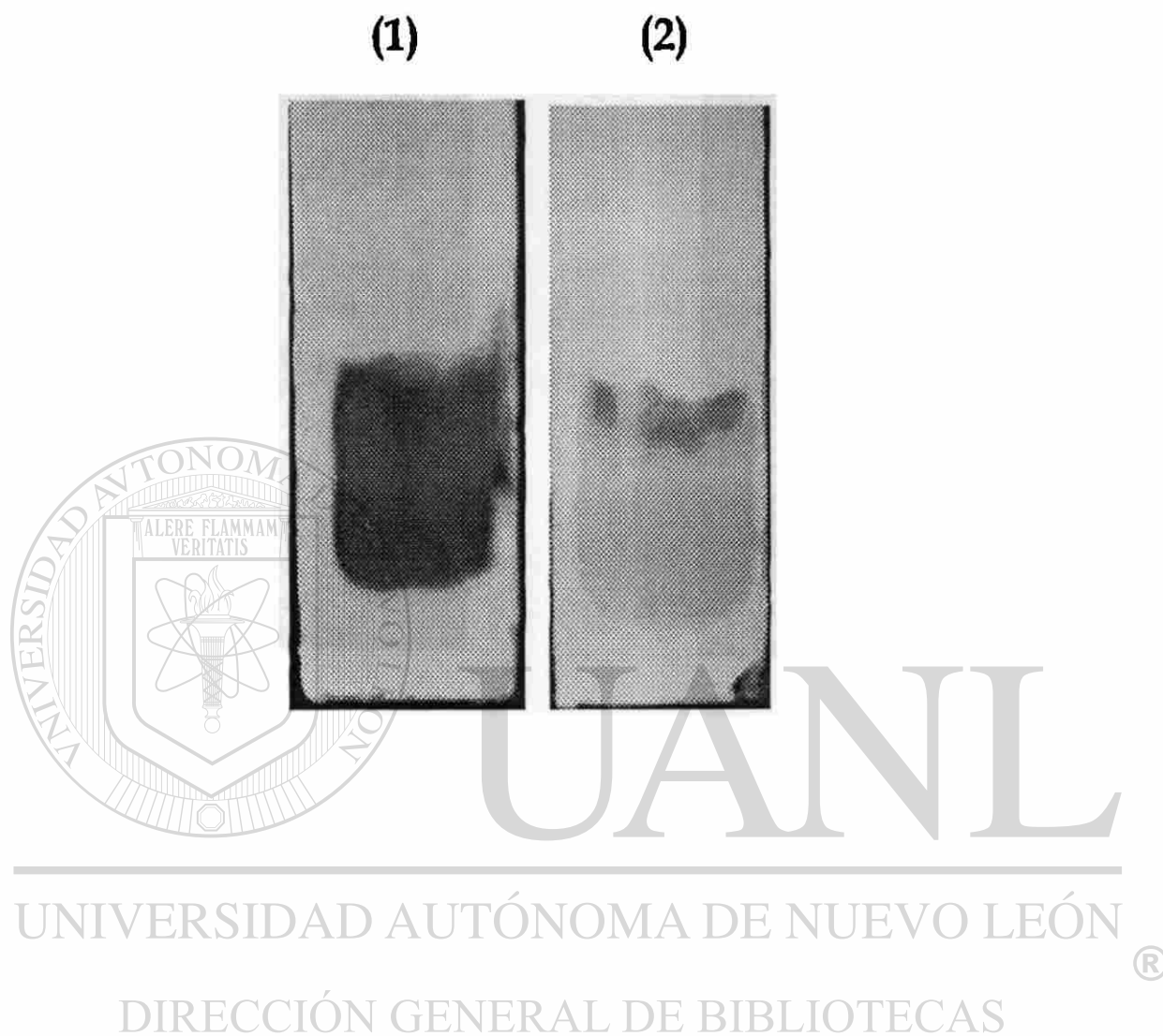


FIGURA 10.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA FRACCIÓN 3, REVELADA CON (1) Y SIN (2) SALES DE DIAZONIO.

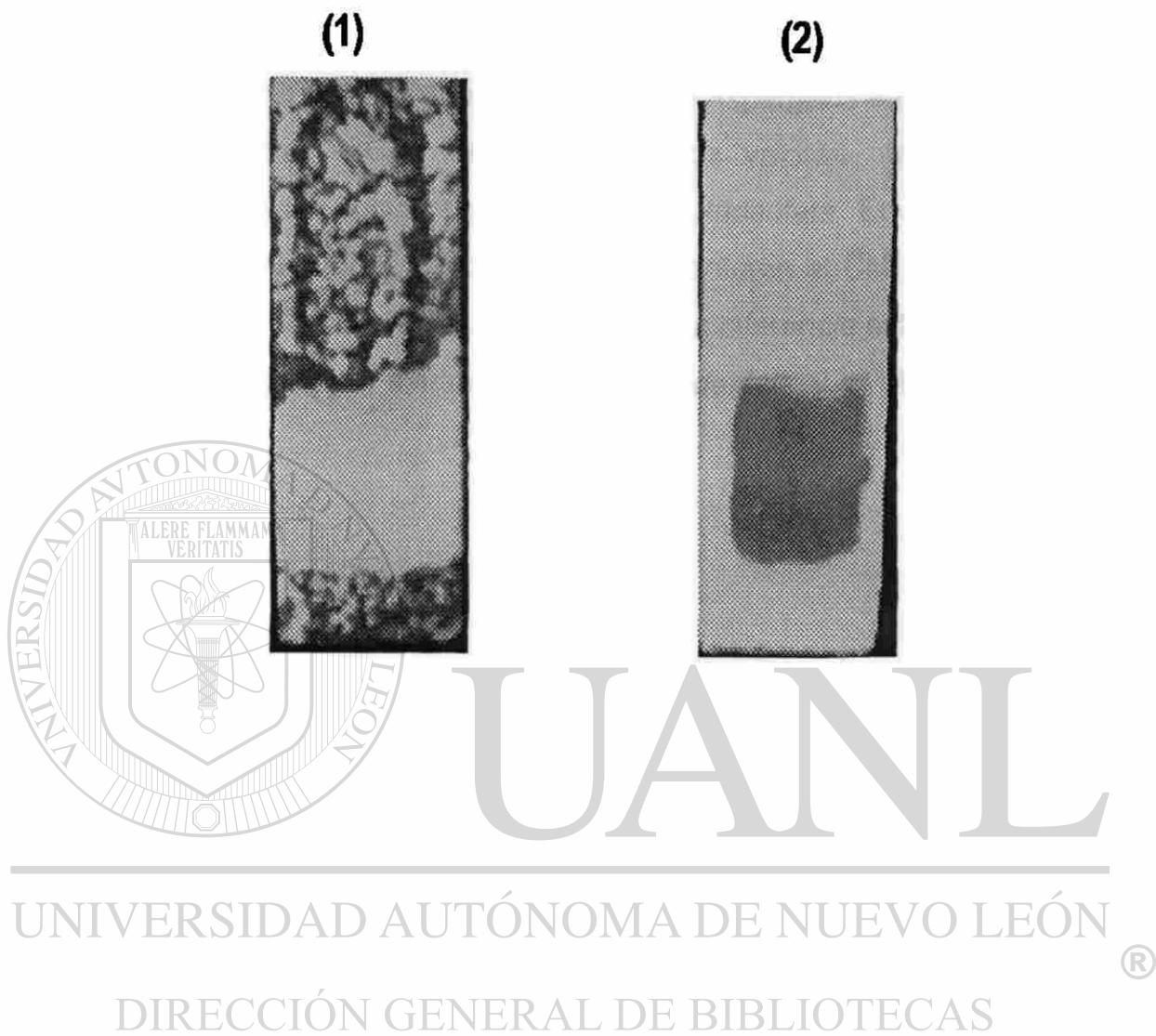


FIGURA 11.

BIOAUTOGRAFÍA DE UNA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA FRACCIÓN 3 DE EXTRACTO DE *L. tridentata*. (1) SITIO DONDE SE ENCUENTRA LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE *A. flavus* 1059. (2) VISUALIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO REVELADO CON SALES DE DIAZONIO.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ÁCIDO NORDIHDROGUAIARÉTICO (NDGA).

Se utilizó un estándar de 10 mg/ml de NDGA. Los resultados se muestran en la tabla 21. La menor CMI utilizando el NDGA fue *Aspergillus flavus* 1299, y la mayor CMI se presentó en *A. flavus* 1273, estos valores obviamente son diferentes a los obtenidos con extracto crudo de *L. tridentata*. En este caso las cepas a *A. flavus* 1299 y 1273 fueron las que presentaron el CMI más alto y *A. parasiticus* Sv-1 fue el de CMI menor. Se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre la CMI del extracto de *Larrea tridentata* y el obtenido por el NDGA puro.

Tabla 19. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO SOBRE CEPAS DE *Aspergillus* POR NDGA Y EL EXTRACTO CRUDO DE *L. tridentata*.

CMI ($\mu\text{g/ml}$)					
<i>Aspergillus flavus</i>					
1273		1299		1059	
NDGA	Extracto	NDGA	Extracto	NDGA	Extracto
0.6 \pm 0.01*	2.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0	2.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.01	2.1 \pm 0.2
<i>Aspergillus parasiticus</i>					
Sv-1			148		
NDGA	Extracto	NDGA	Extracto	NDGA	Extracto
0.5 \pm 0.02*	2.03 \pm 0.15	0.5 \pm 0.01			2.16 \pm 0.28

*Desviación estándar de la media.

DISCUSIONES.

A la fecha se tienen reportes de una gran cantidad de compuestos extraídos de plantas, los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Marchs, C. I., 1991; Aderige, B. I. *et al*, 1996), los cuales pudieran representar una fuente potencial de antimicrobianos. En la actualidad se han aislado compuestos que se han usado en la preservación de alimentos o como antibacterianos, antifúngicos, etc.

En México se tiene conocimiento del uso empírico de aproximadamente 7000 plantas; sin embargo, los reportes publicados hacen referencia casi exclusivamente al uso tradicional, mientras que la evidencia científica que valide tales usos es muy escasa. Se conoce que aproximadamente un 5% de las plantas mexicanas han sido sometidas a investigación que demuestren su actividad biológica, aunque en algunos casos, los bioensayos se realizan a nivel de extractos crudos, sin llegar al aislamiento de los principios activos puros (Martínez., 1996)

Ya desde hace tiempo se ha demostrado que algunos extractos de plantas de la zona norte de la República Mexicana presentaban efectos inhibitorios del crecimiento y la producción de aflatoxinas de hongos del género *Aspergillus* (Lozano., 1997). En este trabajo nos enfocamos a determinar el efecto de extractos de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento y la síntesis de toxinas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Esta planta ha sido reportada que posee una gran variedad de compuestos químicos como, Aluminio, beta-caroteno, calcio, carbohidratos (60%), cloro, cobalto, grasas (3%), fibras (10%), hierro, magnesio, NDGA (ácido nordihidroguaiarético), fósforo, potasio, proteínas (10%), selenio, silicón, sodio, sulfuro y vitamina C (<http://www.ibiblio.org/london/alternative-healthcare/Southwest-School-ofBotanical-Medicine/Abstracs/Larrea-AB.txt>). Desde hace tiempo se sabe que la planta posee actividad antifúngica, contra algunas especies de *Fusarium oxosporum*, *Pytium* spp. y *Rhizoctonia solani*, también propiedades de insecticida, como agente terapéutico y anticancerígeno (Coville. 1893). Debido a que las micotoxinas sintetizadas por el género *Aspergillus* son

potentes carcinogénicos, hepatotóxicos y teratogénicos, y se encuentran invadiendo la mayoría de los productos agrícolas son consideradas un problema que puede ocasionar daños en la salud del hombre y los animales, además son considerados venenos inevitables en el alimento y no es posible predecir su presencia o prevenir enteramente su ocurrencia en los ingredientes alimenticios, antes de la cosecha y durante su almacenamiento y procesamiento (Avalos, V. M. 2001). Por tal motivo surgió nuestra inquietud por analizar el efecto de esta planta en el crecimiento y la síntesis de toxinas de *Aspergillus*.

En la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se utilizó caldo Czapec-Dox y A&M (Mateles y Adye). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de un medio a otro, observándose un mayor CMI en caldo Czapec-Dox. Pensamos que esto pudiera deberse a que el Czapec-Dox es un medio enriquecido para el crecimiento del hongo, y ha sido utilizado para determinar la morfología colonial ya que favorece su crecimiento (Guthrie, W. D. et al. 1982; Richard, J. L. et al. 1991). En contraste el medio A&M es utilizado para la producción de aflatoxinas (Wheeler, H. M. et al. 1995). Esto se comprobó en nuestro trabajo, debido a que no se detectó la presencia de aflatoxinas en este medio.

— El medio A&M posee nutrientes que son básicos en la estimulación de la síntesis de aflatoxinas, como el sulfato de zinc, y es cual no se encuentra en el medio Czapec-Dox, ya que se ha reportado a este metal como cofactor necesario para el crecimiento celular y la formación de aflatoxinas (Davis, N. D. et al. 1965; Ehrlich Bennett, et al. 1979; K. et al. 1984; Niehaus, et al. 1984). Se ha reportado que la máxima producción de aflatoxinas por *A. flavus* se da en un medio que contiene 0.8 mg de zinc por litro (Lee, et al. 1966) Sin embargo, el requerimiento mínimo de este cofactor para la producción de aflatoxinas es 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (Mateles and Adye 1965). Un incremento en el contenido de zinc en el medio de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ da por resultado un aumento de 30 a 1000 veces en la producción de aflatoxinas, pero a 25 μg de zinc por ml disminuye la producción (Marsh, et al. 1975). Por otro lado, se ha establecido que el medio Czapec-Dox contiene

nutrientes diferentes del A&M, tal como el nitrato de sodio y el cloruro de potasio, tales sales quizá estimulen al sobre-crecimiento del hongo.

También se encontró que la CMI en maíz, fue aproximadamente 9 veces más elevada que en medio A&M, esto pudiera ser debido a que se ha reportado que el maíz es un sustrato satisfactorio para el crecimiento y producción de aflatoxinas por *Aspergillus* (Trenk, L. H. et al. 1970), o bien a que la homogeneidad en la distribución del inhibidor no es apropiada.

Para la determinación de aflatoxinas en maíz y medio A&M se realizaron curvas de calibración con aflatoxinas estándar de B₁, B₂, G₁ y G₂, y se determinaron los límites de confianza para el tiempo de retención en cada estándar; AFG1 de 3 ± 0.1 , AFG2 de 6.2 ± 0.04 , AFB1 de 5.2 ± 0.6 , AFB2 de 8.5 ± 0.3 , a fin de que aquellos picos del cromatograma que cayeran dentro de estos límites fueron consideradas como tal. Cabe mencionar que los límites de detección para aflatoxinas en HPLC es de 1 ppb (ng/ml) para la aflatoxina G1 y 0.5 ppb (ng/ml) para las otras (www.daltonics.bruker.com).

Los trabajos publicados sobre el combate de hongos aflatoxigénicos con productos naturales en su mayoría utilizan aceites esenciales (Ansari y Shrivastava, 1991; Picman et al., 1992; Sinha et al., 1993) y muchos de éstos son efectivos inhibidores del crecimiento, algunos contiene aldehído cinámico y eugenol. Kumar y Prasad (1992) trabajaron con extractos de plantas medicinales y registraron que uno de los extractos de *Andrographis peniculata* planta original de la India, presentó una máxima inhibición del 71.5% en el crecimiento micelial de *A. flavus*, porcentaje mayor que el obtenido por Bilgrami et al., (1992) al utilizar extractos de ajo y cebolla para inhibir el crecimiento de *A. flavus* al observar que la máxima inhibición de micelio fue del 62% con el extracto de ajo, sin embargo, en 1998 en Sonora se realizó un trabajo con extracto de *Larrea tridentata*, y *Proboscidea parviflora*, y observaron que extracto extraídos con diclorometano de *L. tridentata* inhibieron un 86% el crecimiento micelial, y el otro inhibió solo el 19%, el efecto para *L. tridentata* en este estudio fue similar al reportado por Faraga et al., (1989) al utilizar aceites esenciales de diferentes especies de plantas para el control de este hongo, los aceites de tomillo, comino, clavo y canela fueron los

aceites que inhibieron el crecimiento micelial del hongo entre 80 y 90%. Podemos considerar nuestro trabajo con mejor potencial de inhibición con referente al reportado en Sonora, ya que ellos utilizaron 500 μg del extracto en 50 ml de medio (ppm), esto quizá debido al tipo de extractor que utilizaron o al medio de cultivo utilizado, ya que nosotros encontramos una inhibición de 2 a 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En este trabajo reportamos diferencias estadísticamente significativas en las producción de aflatoxinas en medio A&M entre las 5 cepas de *Aspergillus*, y entre el control de cada cepa y el porcentaje de la CMI utilizado, sin embargo, todas las cepas sintetizaron toxinas hasta el 25% de la CMI y el crecimiento del hongo se vió afectado hasta el 50% de la CMI en donde se dió una reducción aproximada del 50% del peso seco del micelio comparado con el control, en tanto que al 75% no se observó crecimiento. En nuestros ensayos la cepa más sensible fué *A. flavus* 1059 ya que solo produjo aflatoxinas en el control, y la cepa que mas sintetizó aflatoxinas fue *A. flavus* 1299. Se tiene reportes de inhibición de la producción de aflatoxinas por extractos de plantas por ejemplo los reportado por Bilgrami, *et al.*, (1992), al informar que extractos acuosos de cebolla inhibieron la producción de aflatoxinas en *A. flavus* en un 60%, porcentaje similar a los obtenidos con diclorometano de *B. glutinosam*, *Ch. ambrosioides* y *L. tridentata*, los cuales inhiben 64% y 43% para el hongo (Vargas-Arispuro, *et al.*, 1998). Cabe mencionar que no todos los extracto actúan como inhibidores de la síntesis de aflatoxinas, ya que existen extractos que detienen la producción en los primeros días de desarrollo, pero después llegan a sintetizar el doble, comparado con la cepa utilizada como control (sin extracto), por ejemplo los realizados por Ansari y Shivastava (1991) al observar que el aceite eucalipto (*Eucalyptus maculata*) Baker, inhibía la producción de aflatoxinas en *A. flavus* hasta el sexto día, pero en los días siguientes se incrementó la producción que superó la concentración del control, por lo que fue considerado como promotor de la producción de aflatoxinas para este hongo. También se tiene reportes del efecto de *Ch. ambrosoides* y *B. glutinosam* en *A. parasiticus* en donde se reportan inhibiciones del 100% y 98% respectivamente (Vargas-Arispuro, *et al.*, 1998). Sin embargo, existen extractos que reducen el crecimiento micelial pero activan la formación de aflatoxinas como

el observado por Patkay *et al.*, (1993) al observar que el aceite de canela y cardamo reducían el crecimiento micelial de *A. parasiticus* en 50% y estimulaban la producción de aflatoxinas, resultado similares con *P. parviflora* y *E. eriantha* contra el mismo hongo.

Cuando analizamos la producción de aflatoxinas en maíz también hubo diferencias significativas. Las cepas que produjeron aflatoxinas hasta el 75% de la CMI fueron *A. flavus* 1273, 1059 y *A. parasiticus* 148, siendo la más resistente *A. flavus* 1059, ya que solo redujo su producción de aflatoxinas al 90%, en *A. flavus* 1273 al 99.59% y *A. parasiticus* 148, 96.4%. Los más sensibles fueron *A. flavus* 1299 y *A. parasiticus* Sv-1, esto debido a que el maíz no posee substratos que son requeridos por algunas cepas como el caso de *A. flavus* 1059, la cual no tuvo una buena síntesis de aflatoxinas en medio A&M. Se realizó la cuantificación de aflatoxinas en maíz sin inocular y no se detectó la presencia de aflatoxinas.

En la literatura se reportó que los genotipos de maíz exhiben diferentes niveles de susceptibilidad para el ataque de hongos y la producción de aflatoxinas comunes en almacenamiento, como *A. flavus*, esto sugiere la posibilidad de una respuesta similar en el caso de la producción de aflatoxinas (Cantone, F. A. *et al.*, 1983; Moreno-Martínez, E. *et al.*, 1978). Priyadarshini, *et al.*, observó diferencias en la respuesta de variedades de maíz en el crecimiento fúngico y la acumulación de aflatoxinas, estas diferencias han sido asociadas con sus características cualitativas de los genotipos (Priyadarshini, E. *et al.*, 1978). Zuber *et al.*, demostró que la aflatoxina B₁ fue producida en bajas concentraciones en híbridos de maíz y en altas concentraciones en cruces de maíz de la variedad OH-545 con híbridos (Zuber, M. S., *et al.*, 1978). LaPrade y Manwiller (1999) inocularon 9 híbridos de temporada corta con suspensión de esporas de *A. flavus* a través de la cáscara, y la concentración de aflatoxinas varió de 88 a 145 µg/kg y las diferencias entre los híbridos fueron significantes, también evaluaron 27 híbridos de temporada larga y encontraron que la diferencia en la concentración de aflatoxinas fue de 0 a 46 µg/kg, siendo significantes. Por lo tanto, el híbrido H-437 cae dentro de los híbridos de maíces susceptibles, en cuanto al crecimiento y la acumulación de

aflatoxinas por las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que se utilizaron en este trabajo.

Sin embargo, hay que señalar que los resultados no son consistentes y hay contradicciones en cuanto a la respuesta de los genotipos en la producción de aflatoxinas, existiendo variaciones de año a año y de localidad a localidad, lo cual no permite hacer recomendaciones sobre el uso de determinados híbridos. Además, de que en campo intervienen una serie de factores que al interactuar hacen que este problema biológico sea muy complejo. En este fenómeno están involucrados los genotipos del maíz y del hongo, y el medio ambiente. Este último con todas las implicaciones posibles; cambios climáticos, edáficos, la relación entre las enfermedades, los insectos y los hongos; y por supuesto, la relación hospedero-patógeno, de la cual poco se sabe.

Cuando analizamos el extracto de *L. tridentata*, determinamos que es un solo compuesto el responsable de la actividad biológica, y establecimos que este es un compuesto polar, y una vez ubicado que el NDGA confería la actividad antifúngica al extracto de la gobernadora, se realizó la CMI utilizando una solución estándar del compuesto (10mg/ml). Se pensó que por utilizar el NDGA como tal, se tendría una CMI significativamente menor que al utilizar el extracto de *Larrea tridentata*, pero se encontró que la CMI fue el 25% de la determinada con el extracto, esto quizá por la presencia de otros compuestos, ya que se realizaron pruebas químicas de algunas otras fracciones y se encontraron flavonoides por la reacción química de Shinoda, la cual es positiva al dar una coloración roja cuando reaccionar el ácido clorhídrico y limaduras de magnesio con los flavonoides (<http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/secprod/se00008.htm> (ligninasbiosíntesis), por lo que se sugiere que están en conjunto el NDGA, y los demás compuestos para dar esa CMI en el extracto (Tabla 21).

CONCLUSIONES.

*** *Larrea tridentata* inhibe el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* tanto *in vitro* como en condiciones simuladas a almacén.**

***El compuesto responsable de la actividad antifúngica muestra características similares al ácido nordihidroguaiarético (NDGA).®**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CONSULTADA

1. Ainhsworth, G. C., and P. K. C. Austwick. 1973. Fungal diseases of animals, 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, U. K.
2. Allameh, A. 1997. Comparison of the effect of low and high dose dietary butylated hydroxytoluene on microsome-mediated aflatoxin B₁-DNA binding. *Cancer Lett.* 114:217-220.
3. Andriole, V. T. 1993. Infections with *Aspergillus* Species. *Clin infect. Dis* 17 (Suppl2) S481-S486
4. Athukoralage, P. S., H. M. Herath., S. A. Deraniyagala., R. L. Wijesundera and P. A. Weerasinghe. 2001. Antifungal constituent from *Gordonia dissanayakei*. *Fitoterapia.* 72(5):565-567.
5. Badria, F. A., S. Li, and W. T. Shifer. 1996. Fumonisin as potential cause of kidney disease. *J. Toxicol.* 15(3): 273-292.
6. Beuchat, L. R. and Golden D. A. 1989. Antimicrobials Occurring Naturally in foods. *Food Thechnology, Symposium IFT.* pp 791-795.
7. Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., et al. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem Soc. Chem Commun.* 1988: 743-745
8. Bilgrami, K. S., K. K. Sinha and Sinha A. K. 1992. inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extract. *J. Med Res.* 96: 171-175.
9. Borris, R. P. 1996. Natural products rescarch:perspectives from a major pharmaccutical company. *J. Ethnopharmacol.* 51:29-38.
10. Breinholt, V., J. Hendricks , C. Pereira., D. Arbogast, and G. Bailey. 1995. Dietary clorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Cancer Res.* 55:57-62
11. Bullerman, L. B. 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.* 42:65-86.

12. Cannell, J. P. 1998. Natural products isolation. 1st Ed. Humana press Inc. Totowa, New Jersey. Pp 209-246.
13. Caterrall, F., E. Copeland., M. N. Clifford and C. Joannes. 1998. contribution of theafulvins to antimutagenicity of black tea: their mechanisms of action. *Mutagenesis* 13:631-636
14. Cavin, C., D. Holzhauser., A. Constable., A. C. Huggett, and B. Schilter. 1998. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B₁-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*. 19: 1369-1375.
15. Cawood, M. E., Gelderblom, W. C. A., Vleggaar, R., Behrend, Y., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O. 1991. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *J. Agric. Food. Chem.* 39: 1958-1962.
16. Chen, Z.-Y., R. L. Brown, A. R. Lax., B. Z. Guo., T. E. Cleaveland and J. S. Russin. 1998. Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14 kD protein. *Phytopathol.* 79:808-814.
17. Chen, Z. Y., R. L. Brown., T. E. Cleveland., K. F. Damann and J. S. Russin. 2001. Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production. *J. Food Prot.* 64(11):1785-1792.
18. Coelho, M. 1996. Optimum vitamin supplementation needed for turkey performance and profitability. *Feedstuffs*. 68:13-21.
19. Cordero, M. J., D. Raventós, and B. S. Segundo. 1992. Induction of PR protein in germinating maize seeds infected with the fungus *Fusarium moniliforme*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 41: 189-200.
20. Conner, D. E. and L. R. Beuchat. 1984. Effect of essential oils from plants on growth of Food Spoilage Yeast. *J. Food Sci.* 49:429-434.
21. Dashwood, R., T. Negishi, H. Hayatsu., V. Breinholt, J. Hendricks, and G. Bailey. 1998. Chemopreventive properties of chlorophylls toward aflatoxin B₁: a

- review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutant. Res.* 399:245-514.
22. Davidson, J. D. and B. M. Ortiz. 1983. The antibacterial properties of Aztec wound remedy. *J. Ethnomopharmacol.* 8(2):149-161.
23. Dupuis, D. and B. Johori. 1972. Cinnamyphenols as inhibitors of Fungal Growth. *J. Can. Microbiol.* 18: 929-933.
24. Ellis, W. O., J. P. Smith, and B. K. Simpson. 1991. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *J. Food Sci. Nutr.* 30(3): 403-439.
25. el-Mofty, M. M., S. A. Sark, A. Essawy, H. S. Abdel Gawad. 1994. Preventive action of garlic on aflatoxin B1-induced carcinogenesis in the toad *Bufo regularis*. *Nutr. Cancer* 21(11):95-100.
26. Fan, J. J. and Chen J. H. 1999. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by Welsh onion extracts. *J. Food Prot.* 62(4):414-417.
27. Firozi, P. F., V. S. Aboobaker, and R. K. Battacharya. 1996. Action of curcumin on the cytochrome P450-system catalyzing the activation of aflatoxin B₁. *Chem. Biol. Interact.* 100:41-51.
28. Heredia, N.L., J.S. García-Alvarado y R. G. Labbé. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxin production and protein synthesis by *Clostridium*® *perfringens* type A following heat shock. *J. Food Prot* 61:201-204.
29. Hesseltine, C. W. 1965. A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycologia.* 57: 149-197.
30. Hitokoto, H. S., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Kurata. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ, Microbiol.* 39:818-822.
31. Hoult, J. R, and M. Payá. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* 27: 713-722.

32. Huang, Z., D. G. White, and G. A. Payn 1997. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxins biosynthesis. *Phytopatol.* 87: 622-627.
33. Im, S. H., M. W. Bolt., R. K. Stewart and T. E. Massey. 1996. Modulation of aflatoxin B₁ biotransformation by beta-naphthoflavone in isolated rabbit lung cell. *Arch. Toxicol.* 71:72-79.
34. Jayaprakazha G. K., P. S. Negi, C. Anandharamakrishnan and K. K. Sakariah. 2001. Chemical composition of turmeric oil—a byproduct from turmeric oleoresin industry and its inhibitory activity against different fungi. *Z. Naturforsch.* 56(1-2):40-44.
35. Juan-Lopéz, M., M. Carvajal and B. Ituarte. 1995. Supervising programme of aflatoxins in Mexican corna Food Add. and Contaminants. 12:297-312.
36. Kim J. G., Y. M. Lee, P. G. Kim, W. S. Roh and H. Shintani. 2000. Reduction of aflatoxins by Korean soybean paste and its effect on cytotoxicity and reproductive toxicity—part 1. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by Korean soybean paste (Doen-jang) and identification of the active component. *J. Food Prot.* 63(9):1295-1298.
37. Kim, B. R, D. H. Kim, R. Park, K. B. Kwon, D. G. Ryu, Y. C. Kim, N. Y. Kim, S. Jeong, B. K. Kang and K. S. Kim. 2001. Effect of an extract of the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on aflatoxin B₁ oxidizing cytochrome P450 enzymes. *Planta Med.* 67(5):396-399.
38. Liu, J., C. F. Yang., S. Wasser, H. M. Shen, C. E. Tan and C. N. Ong. 2001. Protection of salvia miltiorrhiza against aflatoxin-B₁-induced hepatocarcinogenesis in Fische 344 rats dual mechanisms involved. *Life Sci.* 69(3):309-326.
39. 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.
40. Manson, M. M., H. W. Ball, M. N. Barreto, H. L. Clark, D. J. Judah, G. Williamson, and G. E. Neat. 1997. Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phases I and II drug

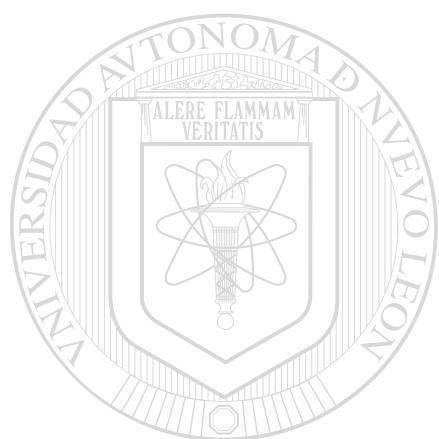
- metabolizing enzymes and aflatoxins metabolism. *Carcinogenesis* 18:1729-1738.
41. Moreno-Martínez, E. 1996. Aflatoxin in Maize: Ascenario in Mexico. *Memorias del Congreso Internacional Modulation of Chemical Toxicity and Risk Assessment*. Tucson, Arizona. p. 10.
42. Moore, G. S. and R. D. Atkins. 1997. The fungicidal and Fungistatic effects of an aqueous Garlic extract and Medically Important Yeast-like Fungi. *Mycol.* 69:341-348.
43. Micheli, P. A., 1729. "Nova Plantarum Genera". Florentiae 13-20.
44. Mistry, K. J., M. Krishna and R. K. Battacharya. 1997. Modulation of aflatoxin B1 activated protein kinase C by phenolic compounds. *Cancer Lett.* 121:99-104
45. Nelson, P. E. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *J. Rev. Phytopathol.* 31: 233-52.
46. Nwankwo, J. O., J. G. Tahnteng and G. O. Emerole. 2000. Inhibition of aflatoxin B1 genotoxicity in human liver-derived. HepG2 cell by kolaviro biflavonoids and molecular mechanisms of action. *Eur J. Cancer Prev.* 9(5):351-361
47. Paster, N., B. J. Juven and H. Harshemsesh. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *J. Appl Bacteriol.* 64 (4): 293-297.
48. Okotie-Eboh, G. O., L. E. Kubena, A. D. Chinnah and C. A. Bayles. 1997. Effects of beta-carotene and canthaxanthin on aflatoxicosis in broilers. *Poult. Sci.* 76: 1337-1341.
49. Paster, N., B.J. Juven and H. Harshemesh. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plants tissue constituents. *J. Appl Bacteriol.* 64(4):293-297.
50. Plattner, R. D., D. Wesleder, D. D. Shackelford, R. Peterson and R. G. Powler, 1992. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathol.* 117:23-28.
51. Peña, S. D. y M. C. Duran. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo.* 16 (94): 61-73.

52. Moerman, D. E. 1996. An analysis of the food plants and drugs plants of native North American, *J. Ethnopharmacol.* 52:165-169.
53. Leah, R., H. Tommerup., I. Svendsen and J. Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins antifungal properties. *J. Biol. Chem.* 266(3): 1564-1573.
54. George, D. E., K. E. Anderson, and A. W. Hsie. 1998. Coumarin chomoprotection aganis aflatoxin B₁-induced in mutagen activation and protection with chicke embryo and rat liver S9. *Environ. Mol. Mutagen.* 32:64-74.
55. Gourama, H. and L. B. Bullerman. 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds: A review. *J. Food Prot.* 58(12): 1395-1404.
56. Gembeh, S. V., R. L. Brown., C. Grimm and T. E. Cleveland. 2001. identification of chemical components or corn kernel pericarp wax associated with resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *J. Agric Food Chem.* 49(10):4635-4641.
57. Gou, B. Z., Z.-Y. Chen, R. L. Brown, A. R. Lax, T. E. Cleveland, J. S. Russin, A. D. Mehta, C. P. Selitrennikoff, and N. W. Wildstrom. 1997. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopatol.* 87(11): 1174-1178.
58. Guo, B. Z., R. L. Brown, A. R. Lax, T. E. Cleveland, J. S. Russin and N. W. Widstrom. 1998. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resitant and susceptible to *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* 61(1): 98-102.
59. Guo, B. Z., R. L. Brown, A. R. Lax, T. E. Cleveland, J. S. Russin., and N. W. Widstrom. 1999. Distribution of antifungal proteins in Maize kernel tissues using immunochemistry. *J. Food Prot.* 62(3): 295-299.
60. Le Bon, A. M., C. Roy, C. Roy, C. Dupont and M. Suschetet. 1997. In vivo antigenotoxic effects of dietary allyl sulfides in the rat. *Cancer Lett.* 114:131-134.

61. Lugo, E. E. 1992. Introducción al Estudio de las plantas Medicinales, la Interacción del Medio con la cultura Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo; México.
62. Lurent, D., N. Platzer, F. Koheler, M. P. Sauviat and F. Pellegrin. 1989. Macrofusine and micromoniline, two new mycotoxin isolated from corn infested by *Fusarium moniliforme* Sheld. Microbiol. Alim. Nutr. 7:9-16.
63. Raj, H. G., K. Gupta, V. Rohil, M. Bose, G. Biswas, S. K. Singh, S. C. Jain, V. S. Parmar, C. E. Olsen and J. Wengel. 1998. Aflatoxin B₁-induced micronuclei and cell cycle alteration in lung and bone marrow cell and their modulation by *Piper argyrophyllum* extract. Teratogen. Carcin. Mutat. 18:249-261
64. Rippon, W. J. 1990. Tratado de micología medica. 3a. Ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. Pp 668-669
65. Roberts, W. K., B. E. Laue and C. P. Selitrennikoff. 1988. Antifungal proteins from plants. Ann. N. Acad. Sci. 544: 141-151.
66. Rauscher, R., R. Edenharder, and K. L. Platt. 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mut. Res. 413: 129-142.
67. Reen, R. K., F. J. Wiebel and J. Singh. 1997. Piperine inhibits aflatoxin B₁-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. J. Ethnopharmacol. 58:165-173.
68. Rios, J. L., M. C. Recio and A. Villar. 1989. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Entomoph. 23:127-149.
69. Sabbioni, G. 1990. Chemical and physical properties of the major serum albumin adduct of aflatoxina B1 and their implication for the quantification in biological samples. Chem Biol. Interact. 75:1-10
70. Sharma, R. P. 1993. Immunotoxicity of micotoxins. J. Dairy Science. 76: 892-897.
71. Skrinjar, M., J. L. Rasic and V. Stojicic. 1996. Lowering of ochratoxin A level in milk by yogurt bacteria and bifidobacteria. Folia Microbiol 41:26-28.

72. Shi, C. Y., S. C. Chua, H. P. Lee and C. N. Ong. 1994. Inhibition of aflatoxin B₁-DNA binding and adduct formation by selenium in rats. *Cancer Lett.* 82:203-208.
73. Singh, H. N., M. M. Prasad and K. K. Sinha. 1993. Efficacy of leaf extracts of some medical plants against disease development in Banana. *Let. Appl. Microbiol.* 17: 269-271.
74. Sultanova, H., T. Makhomoor, Z. A. Abilov, Z. Parween, V. B. Omurkamzinova, A. ur-Rahman and M. I. Choudhary. 2001. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *J. Ethnopharmacol.* 78(2-3): 201-205.
75. Sweeney, J. M. and A. D. W. Dobson. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *J. Food Microbiol.* 43:141-158.
76. Tan R. X., H. Lu, J. L. Wolfender, T. T. Yu, W. F. Zheng, L. Yang, S. Gafener and K. Hostettmann. 1999. Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Med.* 65(1):64-67.
77. Takahashi, N., U. Hartig, D. E. Williams, and G. S. Bailey. 1996. The model Ah-receptor against beta-naphthoflavone inhibits aflatoxin B₁-DNA binding *in vivo* in rainbow trout at dietary levels that do not induce CYP1A enzymes. *Carcinogenesis* 17: 79-87.
78. Tantaoui-Elarika, A. and L. Beraoud. 1994. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oil of selected plant materials. *Env. Path. Toxicol. Oncol.* 31(1):67-72.
79. Vargas-Arispu, I., S. Araujo-Bernal, M. A. Martinez, -Telléz y M. Ortega-Nieblas. 1997. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y la producción de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Rev. Mex. Fitopat.* 15(2):91-95.
80. Verástegui, A. A. Sánchez, N. Heredia and J. García. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. *J. Ethnopharmacol.* 52: 175-177.
81. Vigers, A. J., W. K. Roberts and C. P. Selitrennikoff. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:315-323.

82. Webster, R. P., M. D. Gawde, and R. K. Bhattacharya. 1996. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Lett.* 98: 129-135.
83. Williams, G. M. and M. J. Iatropoulos. 1996. Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B₁ in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Cancer Lett.* 104:49-53.
84. Wilson, C., J. Solar, A. El Ghaouth and M. Wisniewski. 1997. Rapid Evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81(2): 204-210.
85. Zohori, A., A. Khayria and S. Saber. 1995. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L) oil. *Microbiol. Res.* 150: 167-172.
86. (<http://www.ibiblio.org/london/alternative-healthcare/Southwest-School-ofBotanical-Medicine/Abstracts/Larrea-AB.txt>)
87. (http://nutritionfocus.com/nutrition_supplementation/herbs/Chaparral.html#11)
88. (http://wwwbccancer.bc.ca/pg_g_05.asp?PageID=1677&ParentID=2)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



