

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ALTERACION DEL CRECIMIENTO,
LA ESPORULACION Y LA PRODUCCION DE
TOXINAS DE *Aspergillus flavus* Link ex Fries Y *Aspergillus*
parasiticus Speare POR EXTRACTOS DE PLANTAS
DEL GENERO *Yucca* Y *Larrea tridentata* DC Cov.

T E S I S

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

PRESENTA

CESAR ALFREDO SANCHEZ GARCIA

SAN NICOLAS, N. L.

ENERO 2000



SANCHEZ GARCIA CESAR ALFREDO

TD
Z5320
FCB
2000
S2



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**ALTERACION DEL CRECIMIENTO, LA ESPORULACIÓN
Y LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS DE *Aspergillus flavus* Link ex Fries
Y *Aspergillus parasiticus* Speare POR EXTRACTOS DE PLANTAS
DEL GENERO *Yucca* Y *Larrea tridentata* DC Cov.**

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

PRESENTA

CESAR ALFREDO SANCHEZ GARCIA

San Nicolas, N.L.

Enero 2000.

014-3

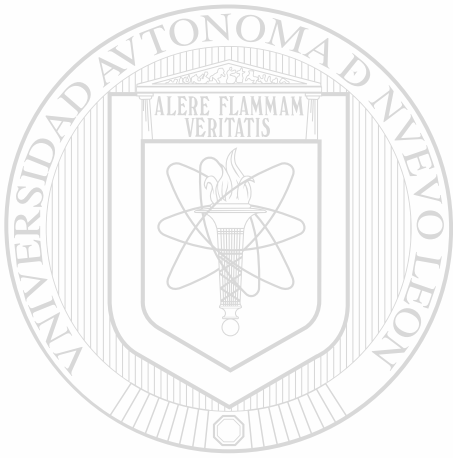
TA

532

CB

2000

S2



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FONDO
TESIS**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ALTERACION DEL CRECIMIENTO, LA ESPORULACIÓN
Y LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS DE *Aspergillus flavus* Link ex Fries
Y *Aspergillus parasiticus* Speare POR EXTRACTOS DE PLANTAS
DEL GENERO *Yucca* Y *Larrea tridentata* DC Cov.

TESIS

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

PRESENTA

CESAR ALFREDO SANCHEZ GARCIA

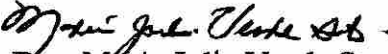
APROBADA
COMISION DE TESIS



Dr. José Santos García Alvarado
Presidente




Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Secretario



Dra. María Julia Verde Star
Vocal

Dr. Rafael Castro Franco
Vocal



Dr. Rahim Foroubakhch Pournavab
Vocal

San Nicolas, N.L.

Febrero 2000.

**ALTERACION DEL CRECIMIENTO, LA ESPORULACIÓN
Y LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS DE *Aspergillus flavus* Link ex Fries
Y *Aspergillus parasiticus* Speate POR EXTRACTOS DE PLANTAS
DEL GENERO *Yucca* Y *Larrea tridentata* DC Cov.**

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCION DEL Dr. JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO Y CO-DIRECCION DE LA Dra. NORMA LAURA HEREDIA ROJAS; EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y GENETICA DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

LA INVESTIGACION FUE FINANCIADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, BAJO EL PROYECTO 4092P-B9607. EL DOCTORANTE AGRADECE UNA BECA DEL MISMO ORGANISMO PARA EL PROGRAMA DOCTORAL.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**La necesidad del hombre por alcanzar una meta
es muy grande pero solo la logrará
cuando este dispuesto a pagar el precio.**
A SHADOW ON THE WALL...

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A mis padres César Sánchez Quezada (+) y Rosalinda García Garza
por lo que fui, soy y sere.

A mis hermanos (Eduardo, Alberto e Ilyana) por estar ahí siempre;
soportar mis ratos de furia y desago

A Gabrielle Alexandra Desiree Quinn Galavez;
por su amor, cariño y su comprensión.

TE QUIERO CHIQUITA!

A Cassandra Francesca y Desiree Hope ya que les
futuro pertenece y por ser como son.

GRACIAS PRINCESITAS!.

To Kayla for everything you teach me in so little time K-2000.

Al Dr. José Santos García Alvarado y al Dra. Norma Laura Heredia
Rojas por lo que aprendí con ellos, los momentos buenos, los malos,
pero sobre todo por su amistad atravez del tiempo.

A Son Goku, Vegeta, Picoro Daimaku, Ranma, Genma, Pikachu,
Charmander, Squartle, Butterfly y los demas; por lograr la meta
mas dificil de todas hacerme soñar; enseñarme a olvidar mis
problemas y hacerme ver que siempre es posible si así lo deseas.

AGRADECIMIENTOS

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

A la Dra. Ma. Julia Verde Star y al Dr. Rahim Foroubakhch Pournavab por tomarse el tiempo y paciencia para la revisión de este trabajo y por sus inmejorables consejos.

Al Dr. Rafael Franco Castro por su apoyo y asesoría en este trabajo además de su amistad incondicional

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos por todo lo que convivimos.

Al personal docente de la Facultad de Ciencias Biológicas que me dio gran parte de los conocimientos y me enseñó a amar mi segundo hogar.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Página de Título.....	I
Dedicatoria.....	V
Agradecimientos.....	VI
Indice de Contenido.....	VII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tablas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XV
Abstract.....	10
Resumen.....	12
Introducción.....	14
Antecedentes.....	16
Generalidades de <i>Aspergillus</i>	16
Producción de Mictotoxinas.....	17
Acido Ciclopiazónico.....	18
Ocurrencia.....	18
Actividad biológica	19
Acido Kójico.....	21
Ocurrencia.....	21
Usos.....	22
Actividad biológica	22
Aflatoxinas.....	24
Ocurrencia.....	25
Ocurrencia en México.....	27
Regulación.....	28
Actividad biológica	28
Métodos de Control.....	31
Actividad Antifúngica de Extractos de Plantas.....	34
Efecto de Extractos de Plantas sobre la Producción de Toxinas Fúngicas.....	41
Inhibición de Efectos de Aflatoxinas por Extractos de Plantas.....	43

	Página
Hipótesis.....	45
Objetivo General.....	45
Objetivos Específicos.....	45
Material y Métodos.....	47
Microorganismos a Utilizar.....	47
Inoculo.....	47
Plantas Usadas.....	47
Obtención de los Extractos.....	48
Extractos de <i>Yucca</i>	48
Extractos de <i>Larrea tridentata</i>	48
Determinación de la Actividad Antifúngica.....	49
Determinación de la CMI del Crecimiento en Medio de Cultivo.....	50
Efectos Sobre el Crecimiento en Medio de Cultivo.....	50
Efecto de Mezclas de los Extractos.....	51
Efectos Sobre la Producción de Toxinas en Medio de Cultivo.....	51
Extracción Múltiple de Toxinas.....	52
Cuantificación de Aflatoxinas.....	53
Cuantificación de Acido Ciclopiazónico.....	53
Cuantificación de Acido Kójico.....	54
Concentración Mínima Esporizada.....	55
Efectos Sobre la Germinación de Esporas.....	55
Efectos Sobre el Crecimiento de Tubo Germinativo.....	55
Determinación de la CMI del Crecimiento en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	56
Efecto de Dosis Subinhibitorias en el Crecimiento del Hongo en Maíz en Condiciones de Almacén.....	56
Efecto de Dosis Subinhibitorias en la Producción de Toxinas del Hongo en Maíz en Condiciones de Almacén.....	57
Extracción de Toxinas de Maíz en Condiciones de Almacén.....	57
Separación de Compuestos Antifúngicos.....	57

	Página
Determinación de la Banda Activa.....	58
Purificación del Compuesto de <i>Larrea tridentata</i>	58
Purificación del Compuesto de <i>Yucca</i>	59
Resultados.....	60
Extractos con Actividad Antifúngica.....	60
Concentración Mínima Inhibitoria.....	63
Efecto de las Mezclas de los Extractos.....	65
Efecto del Crecimiento en Medio de Cultivo.....	66
Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Medio de Cultivo.....	77
Efecto sobre la Producción de Acido Ciclopiazónico en Medio de Cultivo..	79
Efecto sobre la Producción de Acido Kójico en Medio de Cultivo.....	81
Concentración Mínima Esporicida.....	82
Efecto en la Germinación de Esporas.....	84
Efecto en la Producción de Tubo Germinativo.....	86
Concentración Mínima Inhibitoria en Maíz Bajo Condiciones de Almacén....	88
Efecto en el Crecimiento en Maíz Bajo Condiciones de Almacén.....	88
Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Maíz Bajo Condiciones de	91
Almacén.....	91
Efecto sobre la Producción de Acido Ciclopiazónico en Maíz Bajo	93
Condiciones de Almacén.....	93
Efecto sobre la Producción de Acido Kójico en Maíz Bajo Condiciones de	94
Almacén.....	94
Compuesto Activo de <i>Larrea tridentata</i>	94
Compuesto Activo de <i>Yucca rigida</i>	98
Discusión.....	102
Conclusiones.....	115
Perspectivas de la Investigación.....	116
Bibliografía	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Halos de Inhibición en Pozos.....	62
Figura 2.- Halos de Inhibición en Discos.....	62
Figura 3.- Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Larrea tridentata</i> en Medio Sólido.....	63
Figura 4.- Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Yucca rigida</i> en Medio Sólido.....	63
Figura 5.- Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Larrea tridentata</i> en Medio Líquido.....	63
Figura 6.- Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de <i>Yucca rigida</i> en Medio Líquido.....	63
Figura 7.- Control del Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i>	67
Figura 8.- Efecto del 25 % de la CMI en el Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i>	67
Figura 9.- Efecto del 50 % de la CMI en el Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i>	68
Figura 10.- Efecto del 75 % de la CMI en el Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i>	68
Figura 11.- Control del Crecimiento de <i>Aspergillus</i> a Nivel Microscópico.....	69
Figura 12.- Efecto del 25 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i> a Nivel Microscópico.....	69
Figura 13.- Efecto del 50 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i> a Nivel Microscópico.....	69
Figura 14.- Efecto del 75 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i> a Nivel Microscópico.....	69
Figura 15.- Control del Crecimiento de <i>Aspergillus</i> en Microscopia Electrónica.....	70

	Página
Figura 16.- Efecto del 25 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i> en Microscopia Electrónica.....	70
Figura 17.- Efecto del 50 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i> en Microscopia Electrónica.....	71
Figura 18.- Efecto del 75 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Larrea</i> en Microscopia Electrónica.....	71
Figura 19.- Control del Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i>	72
Figura 20.- Efecto del 25 % de la CMI en el Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i>	72
Figura 21.- Efecto del 50 % de la CMI en el Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i>	73
Figura 22.- Efecto del 75 % de la CMI en el Crecimiento Colonial de <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i>	73
Figura 23.- Control del Crecimiento de <i>Aspergillus</i> a Nivel Microscópico.....	74
Figura 24.- Efecto del 25 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i> a Nivel Microscópico.....	74
Figura 25.- Efecto del 50 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i> a Nivel Microscópico.....	74
Figura 26.- Efecto del 75 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i> a Nivel Microscópico.....	74
Figura 27.- Control del Crecimiento de <i>Aspergillus</i> en Microscopia Electrónica.....	75
Figura 28.- Efecto del 25 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i> en Microscopia Electrónica.....	75
Figura 29.- Efecto del 50 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i> en Microscopia Electrónica.....	75
Figura 30.- Efecto del 75 % de la CMI en el Crecimiento <i>Aspergillus</i> por <i>Yucca</i> en Microscopia Electrónica.....	75
Figura 31 .- Control del Crecimiento de <i>Aspergillus</i> en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	89

	Página
Figura 32 .- Efecto del 25 % de la CMI sobre el Crecimiento <i>Aspergillus</i> en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	89
Figura 33 .- Efecto del 50 % de la CMI sobre el Crecimiento <i>Aspergillus</i> en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	90
Figura 34 .- Efecto del 75 % de la CMI sobre el Crecimiento <i>Aspergillus</i> en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	90
Figura 35 .- Efecto del 100 % de la CMI sobre el Crecimiento <i>Aspergillus</i> en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	90
Figura 36 .- Cromatografía en Capa Fina del Extracto de <i>Larrea tridentata</i>	95
Figura 37 .- Autobiografía del Extracto de <i>Larrea tridentata</i>	96
Figura 38 .- Técnica de Difusión de las Bandas del Extracto de <i>Larrea tridentata</i>	97
Figura 39 .- Cromatografía en Capa Fina del Extracto de <i>Yucca rigida</i>	99
Figura 40 .- Autobiografía del Extracto de <i>Yucca rigida</i>	99
Figura 41 .- Técnica de Difusión de las Bandas del Extracto de <i>Yucca rigida</i> ...	100

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Resultados de los Extractos de Plantas Probadas sobre Cepas de <i>Aspergillus</i>	60
Tabla 2.- Resultados de los Extractos de Plantas Probadas sobre Cepas de <i>Aspergillus</i>	61
Tabla 3.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los Extractos en Medio Sólido.....	64
Tabla 4.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los Extractos en Medio Líquido.....	65
Tabla 5.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las Mezclas de los Extractos.....	66
Tabla 6.- Efecto del Extracto de <i>Larrea</i> sobre Diámetro de Colonia.....	67
Tabla 7.- Efecto del Extracto de <i>Yucca</i> sobre Diámetro de Colonia.....	72
Tabla 8.- Efecto de Concentraciones Subletales de <i>Larrea tridentata</i> sobre el Crecimiento.....	76
Tabla 9.- Efecto de Concentraciones Subletales de <i>Yucca rigida</i> sobre el Crecimiento.....	77
Tabla 10.- Efecto del Extracto de <i>Larrea</i> sobre la Producción de Aflatoxinas.....	78
Tabla 11.- Efecto del Extracto de <i>Yucca</i> sobre la Producción de Aflatoxinas.....	79
Tabla 12.- Evaluación de la Producción de Acido Ciclopiazónico.....	80
Tabla 13.- Evaluación de la Producción de Acido Kójico.....	81
Tabla 14.- Concentración Mínima Esporicida del Extracto de <i>Larrea</i>	82
Tabla 15.- Concentración Mínima Esporicida del Extracto de <i>Yucca</i>	83
Tabla 16.- Efectos del Extracto de <i>Larrea tridentata</i> sobre los Porcentajes de Germinación en cepas de <i>Aspergillus</i>	84
Tabla 17.- Efectos del Extracto de <i>Yucca rigida</i> sobre los Porcentajes de Germinación en cepas de <i>Aspergillus</i>	85
Tabla 18.- Efectos del Extracto de <i>Larrea tridentata</i> sobre el Crecimiento del Tubo Germinativo en cepas de <i>Aspergillus</i>	86

	Página
Tabla 19.- Efectos del Extracto de <i>Yucca rigida</i> sobre el Crecimiento del Tubo Germinativo en cepas de <i>Aspergillus</i>	87
Tabla 20 .- Concentraciones Mínimas Inhibitorias de Extractos de <i>Larrea tridentata</i> y <i>Yucca rigida</i> en Maíz.....	88
Tabla 21.- Efecto del Extracto de <i>Larrea</i> sobre la Producción de Aflatoxinas en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	92
Tabla 22.- Efecto del Extracto de <i>Yucca</i> sobre la Producción de Aflatoxinas en Maíz bajo Condiciones de Almacén.....	93
Tabla 23.- Determinación de la Fase Móvil mas Adecuada para la Separación del Compuesto Activo de <i>Larrea tridentata</i>	95
Tabla 24.- Pruebas Químicas Realizadas para Determinar la Naturaleza del Compuesto Activo de <i>Larrea tridentata</i>	97
Tabla 25.- Determinación de la Fase Móvil mas Adecuada para la Separación del Compuesto Activo de <i>Yucca rigida</i>	98
Tabla 26.- Pruebas Químicas Realizadas para Determinar la Naturaleza del Compuesto Activo de <i>Yucca rigida</i>	101

LISTA DE ABREVIATURAS

A

A_{505}	Absorbancia a 505 nm
A_{580}	Absorbancia a 580 nm
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AF	Aflatoxina (s)
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AK	Acido Kójico
ANOVA	Análisis de Varianza
AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica (Association of Official Analytical Chemist)
ARN	Acido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
ATPasa	Enzima Adenosin Trifosfatasa

C

°C	Grados Centígrados
Ca ²⁺	Ion Calcio
C.A.S.T.	Consejo para la Agricultura Ciencia y Tecnología (Council for Agricultural Science and Technology)
cm ²	Centímetro Cuadrado
CME	Concentración Mínima Esporocida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPA	Acido Cilopiazónico

D

d	Día (s)
---	---------

E

E.U.A.	Estados Unidos de América
<i>et al</i>	Y Colaboradores
etc.	Etcétera

F

FAO	Organización de Agricultura y Alimentos (Food and Agriculture Organization)
FDA	Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration)

FeCl₃ Cloruro de Hierro III

Fig. Figura

Figs. Figuras

x g Fuerza Gravitacional

g Gramo (s)

G

H

h Hora (s)

HCl Acido Clorhídrico

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución
(High Performance Liquid Chromatography)

K

kg Kilogramo (s)

L

l Litro (s)

LD₅₀ Dosis Letal para el 50 % de la Población

M

M	Molar
mg	Miligramo (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
min	Minuto (s)
μ	Micrómetro (s)
μ g	Microgramo (s)
μ l	Microlitro (s)

N

N	Normalidad
NaHCO ₃	Carbonato Acido de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetro (s)
No.	Número (s)

O

OMS	Organización Mundial de la Salud
-----	----------------------------------

P

PDA	Papa Dextrosa Agar
pH	Logaritmo Reciproco de la Concentración de Ion Hidrógeno
p.p.b.	Partes por Billón
p.p.m.	Partes por Millón
p/v	Porciento Peso / Volumen

S

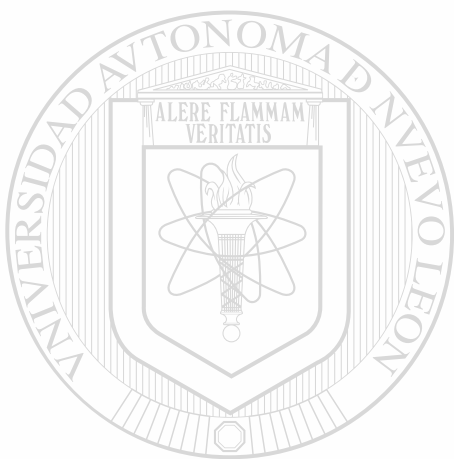
sp.	Sin Especie
SRRC	Centro de Investigación Regional del Sur (Southern Regional Research Center)

U

UNEP	Programa Ambiental de las Naciones Unidas (United Nations Environmental Program)
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)

V

v/v	Por ciento Volumen / Volumen
%	Por ciento



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABSTRACT

In Mexico and another countries, *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* are a big problem of pollution in crops such as corn and the products derived from these. The main importance of these microorganisms is their capability of produce diverse toxins at the same time; between the most common are aflatoxins (AF), cyclopiazonic acid (CPA) and kojic acid (AK); in case of be consumed can cause dangerous damages to the living organisms; like hepatotoxicity, teratogenicity, immunotoxicity and dead. Different physical and chemical methods have been used to control the contamination of food and feeds by these fungi or their toxins, however, until now there is not a method that provide all the appropriate characteristics for its use on foods. The world tendencies show an increase for the consumption of food without the use of chemical substances, in this work we study the effectivity of two plant extracts as an alternative for the control of the contamination by these fungi and their toxins. We obtained different extracts from plants of genera *Yucca* and *Larrea*; the preliminary results shown that the extracts of *Yucca rigida* and *Larrea tridentata* got the best inhibition on growth; follow it these; we determinate the minimal inhibitory concentration and the effect on production of aflatoxins, cyclopiazonic acid and kojic acid, in both, culture media and corn kernels under storage conditions. Finally were additionated subinhibitory concentrations so we could determinate the effect on hifae growth, viability and germination of spores, growth of germinative tube and toxins production.

The *Larrea tridentata* extract was the most effective on growth inhibition. The addition of subinhibitory doses of the *L. tridentata* extract (25 to 75 % of MIC) originated reductions of growth from 35 to 70 % on all strains used, for *Y. rigida* extract we determinate reductions of around 65 % on all strains. Both extracts inhibited strongly the production of all the toxins analyzed even on the lowest concentration (25 % of MIC). These activity was observed same on cultured media and corn kernels under storage conditions. By the way, was observed an strong sporicide activity and the inhibition of growth of germinative tube. The statistical analysis didn't show significative differences ($P > 0.05$) between the strains, but it did between the species ($P < 0.05$) and the extracts used ($P < 0.05$). The active compounds were isolated and the chemical analysis show the presence of a lignane for *L. tridentata* extracts and a steroidal saponin for *Y. rigida* extracts. Both compounds could be an alternative for the preservation of foods and feeds susceptible of contamination for these microorganisms.

RESUMEN

En México así como en otros países, los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* representan una grave problema de contaminación en cultivos de maíz y de sus productos procesados. La importancia de estos organismos radica en su capacidad para producir varias toxinas; entre estas se encuentran: las aflatoxinas (AF), el ácido ciclopiazónico (CPA) y el ácido kójico (AK) cuya ingesta puede llegar a causar daños tan severos como hepatotoxicidad, teratogenicidad, inmunotoxicidad e incluso la muerte. Se han probado y usado diferentes métodos físicos y químicos para controlar la contaminación de alimentos por el hongo o sus toxinas, sin embargo, hasta el momento no existe ningún método satisfactorio. Tomando en cuenta la tendencia mundial de consumo de alimentos totalmente naturales, en este trabajo investigamos la efectividad de dos extractos de plantas como alternativa para el control de la contaminación por estos hongos y sus toxinas en alimentos. De acuerdo con ensayos preliminares, se obtuvieron diferentes extractos de plantas de los géneros *Yucca* y *Larrea*. Los extractos de *Yucca rigida* y *Larrea tridentata* presentaron mayor inhibición de crecimiento y se les determinó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento y la producción de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y ácido kójico, tanto en medio de cultivo como en maíz en condiciones de almacén. Posteriormente se adicionaron dosis subinhibitorias de los extractos para determinar su efecto en el crecimiento, la

viabilidad, la germinación de esporas, el crecimiento de tubo germinativo y la producción de toxinas.

El extracto de *Larrea tridentata* fue mas efectivo en la inhibición del crecimiento. La adición de dosis subinhibitorias (25 a 75 % de la CMI) del extracto de *L. tridentata* originó reducciones del crecimiento que variaban desde un 35 a un 70 % en todas las cepas usadas, en el caso del extracto de *Y. rigida* se observaron reducciones en el crecimiento hasta un 65 % dependiendo de la cepa y la concentración del extracto usado. Ambos extractos inhibieron fuertemente la producción de las tres toxinas analizadas aún en la concentración mas baja usada (25 %). Esta actividad se mostró tanto en medio de cultivo como en maíz en condiciones de almacén. Igualmente de importancia resultó la actividad esporicida de los extractos, así como la inhibición del crecimiento del tubo germinativo. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las cepas de la misma especie, pero si entre las especies diferentes ($P < 0.05$) y de igual forma entre los extractos usados ($P < 0.05$). Los compuestos activos se aislaron y de acuerdo con análisis químicos que indican la presencia de un lignano en el caso del extracto de *L. tridentata* y de una saponina de tipo esteroideo en el caso de *Y. rigida*. Estos compuestos pueden ser una alternativa para la preservación de alimentos susceptibles de contaminación por estos microorganismos.

INTRODUCCION

Hoy en día la contaminación de los cereales por hongos es uno de los problemas en alimentación mas grandes a nivel mundial. Se estima que una cuarta parte de todas las cosechas de cereales se contaminaban en el campo o durante su almacenaje (C.A.S.T., 1989; Trail, *et al.*, 1995). Algunos de los principales hongos contaminantes de estos tipo de cultivos pertenecen al género *Aspergillus*. Las principales especies asociadas a esta contaminación son: *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, los cuales, además de producir daños físicos en el grano son capaces de generar sustancias tóxicas para los consumidores. Entre las toxinas o micotoxinas mas importantes que producen estos hongos se encuentran el ácido ciclopiazónico (CPA) , el ácido kójico (AK) y las aflatoxinas (AF) como indican Dowd (1988); Gqaleni, *et al.* (1997); Pier, *et al.* (1989); Trail, *et al.* (1995).

El ácido ciclopiazónico al ser ingerido por ratas, perros y otros mamíferos en dosis subletales causa pérdida de peso y aumento en la concentración de amilasa, colesterol y lipasa sérica (Gqaleni, *et al.*, 1997; Pier, *et al.*, 1989; Raymond, *et al.*, 1995). El ácido kójico presenta una alta citotoxicidad hacia leucocitos, además de una actividad cardiotóxica; también se ha visto que si esta toxina se inocular por vía intraperitoneal puede causar convulsiones o la muerte (Beelik., 1956; Werch, *et al.*, 1957; Wilson., 1966). Las aflatoxinas provocan hepatotoxicidad, teratogenicidad, inmunotoxicidad e incluso la muerte; además,

se les ha relacionado fuertemente con la aparición de cáncer hepático (Dvorackva., 1990; Ellis, *et al.*, 1991; Wilson., 1966).

Debido a su alta toxicidad se han realizado diversas investigaciones sobre métodos físicos, químicos y biológicos para controlar o eliminar al hongo o la producción de las micotoxinas. Sin embargo, estos procesos son caros, inefectivos o de muy difícil manejo (Applebaun y Marth., 1980; Ellis, *et al.*, 1991; Karunaratne, *et al.*, 1990; Moss y Smith., 1985). Actualmente algunas sustancias provenientes de plantas con actividad antifúngica o bien inhibidora de la producción de micotoxinas han comenzado a verse como una alternativa para controlar estos microorganismos en cereales (Ellis, *et al.*, 1991; Trail, *et al.*, 1995).

En este trabajo se probó la efectividad de extractos de plantas de la región como inhibidores del crecimiento, de la formación de esporas y de la producción de toxinas, tanto en medio de cultivo como en granos de maíz en condiciones de almacenaje.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANTECEDENTES

GENERALIDADES

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por Antonio Micheli. El le dio ese nombre por el parecido de la cabeza conidial con las pilas bautismales de la época, llamadas en latín "Aspergillum" (Micheli., 1729).

Tiempo después se le agrupó en la clase Hyphomycetes, la cual pertenece a su vez a la subdivisión Deuteromycotina. Estos hongos se caracterizan por producir micelio de forma sencilla o conidióforos cerrados (Beuchat., 1987; Ellis, *et al*, 1991). Regularmente estos hongos filamentosos son saprofiticos, que pueden ser encontrados fácilmente en una amplia variedad de climas y como contaminantes de suelo, aire, productos alimenticios, piel, madera, textiles, keroseno, pintura, plástico, caucho, cemento y artículos farmacéuticos entre otros (Gourama y Bullerman., 1995). Este género es de gran importancia para los humanos, porque dentro de el se encuentran especies que pueden ser tanto patógenas como benéficas, en este último caso se encuentran las especies usadas en la producción de alimentos fermentados (Hesseltine, *et al.*, 1966).

Actualmente se conocen alrededor de 200 especies pertenecientes al género *Aspergillus*, de ellas solo 20 son consideradas como patógenas para el hombre (Bodey y Vartivarian., 1989). Entre estas últimas las mas comunes son: *Aspergillus terreus* (Glotzbach., 1982), *A. nidulans* (Corral, *et al.*, 1982), *A. niger* (Tack, *et al.*, 1982) *A. fumigatus* (Rinaldi., 1983), *A. flavus* y *A. parasiticus* (Bodey y Vartivarian., 1989). Dependiendo de la especie, pueden causar reacciones de

hipersensibilidad, infecciones locales y diseminadas en pacientes inmunocomprometidos, micotoxicosis, etc. que en algunos casos puede conducir a la muerte (Andriole, 1993; Gourama y Bullerman., 1995).

PRODUCCION DE MICOTOXINAS

Muchas especies de *Aspergillus* son productoras de micotoxinas, las cuales son metabolitos secundarios que son tóxicos para vertebrados superiores u otros animales cuando son incorporadas a la dieta (Bullerman, 1979; Smith y Moss., 1985; Gqaleni, *et al.*, 1997). *A. flavus* y *A. parasiticus* son dos especies relacionadas con la contaminación de alimentos, granos almacenados, cultivos de algodón, cacahuete, maíz, sorgo y trigo, entre otros (Hesseltine, *et al.*, 1966; Gallagher, *et al.*, 1978; Mannon y Johnson., 1985; Farr, *et al.*, 1989; Gqaleni, *et al.*, 1997). Su importancia radica en la capacidad de estos hongos para producir varias toxinas como el ácido ciclopiazónico, el ácido kójico y las aflatoxinas en diferentes concentraciones (Wilson., 1966; Richard y Gallagher., 1979; Te-Paske y Gloer., 1992; Norton., 1995). La coproducción de estas toxinas puede resultar en un efecto sinérgico o aditivo en los consumidores (Dowd., 1988; Pier, *et al.*, 1989; Trail, *et al.*, 1995).

Desde el punto de vista económico aproximadamente el 25 % de los cultivos de cereales son afectados por micotoxinas cada año (Mannon y Johnson, 1985; C.A.S.T., 1989; Trail, *et al.*, 1995). Esto da como resultado un costo de varios miles de millones de dólares por pérdidas de la cosecha y animales afectados,

mas un costo extra por el monitoreo de las micotoxinas en los cultivos, en los animales y en los productos que éstos consumen (Trail, *et al* 1995).

CPA

Generalidades

El CPA, es un ácido indol-tetramérico primeramente aislado de cultivos de *Penicillium cyclopium* en 1968 por Holzapfel. Se sabe hoy en día, que varias especies de hongos pueden también producirlo (Orth., 1977; Still, *et al.*, 1978; Le Bars., 1979; Yokota, *et al*, 1981). En estudios realizados por Luk *et al*, en 1977, se demostró que el CPA es coproducido junto con las aflatoxinas por algunas especies de *Aspergillus*. De manera similar, Gallagher *et al*, en 1978, reportaron que el 52 % de cepas aisladas de *A. flavus* producían CPA y aflatoxinas contra un 33% que solo producían aflatoxinas. Se ha reportado también que *A. parasiticus*, a pesar de tener una enorme similitud con *A. flavus* no produce esta micotoxina (Dorner, *et al.*, 1984).

Ocurrencia

En estudios realizados en 1977, por Leistner y Pitt se demostró la presencia de CPA en carnes y embutidos. Además esta toxina ha sido reportada como un contaminante común en maíz (Gallagher, *et al.*, 1978; Widaistuti, *et al.*, 1988; Urano, *et al.*, 1992), cacahuates (Landsen y Davison., 1983; Urano, *et al.*, 1992), mijo (Rao y Hussain., 1985), arroz (Ostry y Polster., 1989), semillas de girasol (Ross, *et al.*, 1991), trigo (Balanchandran y Parthasarsthy., 1995), diversos

tipos de queso (Le Bars., 1990) y derivados de estos productos (Balanchandran y Parthasarsthy., 1995).

Actividad biológica del CPA

Purchase en 1971, reportó que la inyección intraperitoneal de esta micotoxina en ratas producía hipertensión, convulsiones y finalmente la muerte 30 min después. La LD₅₀ reportada para esta vía es de 2.3 mg/Kg en ratas machos. También se reportó que en dosis orales no se observaban los síntomas nerviosos y la muerte sobrevinía días después. La LD₅₀ en este último caso era de 36 mg/Kg en ratas machos y de 63 mg/Kg para las hembras.

Purchase, también reportó que una sola dosis alta de CPA, provocaba necrosis localizada en casi todos los órganos de las ratas. Además, en dosis bajas por un período de tiempo prolongado, producían cambios degenerativos en el corazón, el hígado, los riñones y el bazo, adicionalmente, cambios en los ductos biliares, hepáticos, pancreáticos y renales.

En pollos jóvenes, se determinó que el CPA ocasionaba lesiones en el proventrículo, pérdida de peso y que la tasa de mortalidad aumentaba con dosis orales de 100 ppm (Dorner, *et al.*, 1983) Al año siguiente (1984) Lomax *et al*, demostraron que la toxina producía lesiones focales en el tracto digestivo y los riñones, de cerdos y perros. Estos últimos animales han probado ser los mas sensibles a esta toxina con una LD₅₀ de 2 mg/Kg por vía oral.

Durante 1988, se realizaron estudios de esta micotoxina en primates donde se reveló que dosis de 60 mg/Kg/d administradas en forma constante por

periodos de tiempo moderados (3 meses) causaban, arritmia cardiaca, engrosamiento de las paredes del corazón, además de lesiones focales en este órgano. Al observar al microscopio se observó obstrucción en los conductos renales, biliares y pancreáticos por cuerpos proteicos (Jaskiewics, *et al.*, 1988).

En 1984, Morrisey *et al.*; determinaron que el CPA no presentaba un potencial teratogénico ni carcinogénico. Sin embargo, se ha visto que el CPA causa desarreglos celulares en el corazón, el hígado y los riñones y aumento de las vacuolas internas en células endoteliales. En miocitos se ha observado una lisis de las miofibrillas, acumulación y aumento en el número de mitocondrias y formación de lisosomas; mientras que en células epiteliales se observa aumento en el tamaño del núcleo en primates (Jaskiewics, *et al.*, 1988).

En 1978, Gallagher, determinó que el efecto nervioso de esta toxina se debía principalmente a que forma quelatos con algunos metales; lo que da su toxicidad "*in vivo*". Estudios recientes demostraron que esta toxina produce una inhibición de la ATPasa dependiente de calcio por lo que ocasiona un efecto relajante en células musculares en concentraciones bajas (Hesseltine, *et al.*, 1966; Gallagher, *et al.*, 1978; Ellis, *et al.*, 1991; Raymond, *et al.*, 1995; Gqaleni, *et al.*, 1997). De igual forma, afecta los procesos relacionados con la exportación de proteínas y modificación de estas en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico debido a la inhibición de la bomba de calcio de la célula (Pier, *et al.*, 1989; Raymond, *et al.*, 1995; Gqaleni, *et al.*, 1997).

En últimas fechas han sido reportados posibles efectos teratogénicos por esta toxina. En 1997, Petr y Rozinek describieron una aceleración en la meiosis en oocitos de cerdo; debido tal vez, a la inhibición de la ATPasa por bloqueo de la bomba de Ca^{2+} como se había descrito anteriormente. A partir de este año comenzó la concientización acerca de la toxicidad del CPA, se han realizado estudios donde se describen métodos para su control, como lo es el uso de arcillas para su adsorción (Dwyer y Kubera., 1997).

AK

Generalidades

El 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona o ácido kójico fue descubierto desde 1907 y en 1924 se determinó su estructura (Saito., 1907; Wilson., 1966, Ariff, *et al.*, 1996). Este compuesto es producido por varias especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Acetobacter* (Spector., 1957; Wilson., 1966; Bajpai., 1982, Ariff, *et al.*, 1997). Entre las especies productoras del AK mas importantes están *A. flavus* (Bajpai, *et al.*, 1981; Bajpai, *et al.*, 1982; Megalla, *et al.*, 1987; Madihah, *et al.*, 1993) y algunas cepas de *A. parasiticus* (Nandan y Polasa., 1985; Coupland y Niehaus., 1987).

Ocurrencia

El ácido kójico ha sido aislado de alimentos y granos contaminados por *A. flavus* (Wilson y Wilson., 1964; Wilson., 1966; Ariff, *et al.*, 1997). Igualmente se presenta en alimentos que se fermentan usando cepas de *Aspergillus*, tal es el

caso de comidas de estilo japonés como el miso, la salsa de soya y el sake entre otros (Sinha, *et al.*, 1993).

Usos

El AK fue utilizado como un insecticida contra algunos coleópteros (Beelik., 1956; Wilson., 1966). En la industria farmacéutica se utilizaba como un antiinflamatorio, analgésico y antimicrobiano contra bacterias gram-negativas (Morton, *et al.*, 1945; Wilson., 1966). Además, algunos estudios demostraron que derivados de esta toxina presentan también efectos antibacterianos (Morton, *et al.*, 1945).

En la industria alimentaria se utiliza el ácido kójico como un potenciador de sabor (Le Blanc y Akers., 1989) y como un agente antioxidante (Chen, *et al.*, 1991). Por otra parte, la industria cosmética usó este compuesto para productos blanqueadores de la piel (Ohyama y Mishima., 1990). Sin embargo algunos estudios han demostrado toxicidad debido al consumo del ácido kójico.

Actividad biológica del AK

En 1934, Friedeman, realizó estudios en perros a los que les inoculó el AK por vía intravenosa; él observó que se presentaban síntomas de intoxicación a 150 mg/Kg y que el 100 % de los animales murieron a dosis de 1 g/Kg. Se ha determinado que la dosis letal mínima del AK para ratones de 17 g inoculados por vía intraperitoneal es de 30 mg (Morton, *et al.*, 1945); y que para embriones de pollo de 12 días es de 12 mg/huevo (Lee, *et al.*, 1950).

Otros estudios, en ratones recién nacidos determinaron que concentraciones de 25 mg/Kg administrados por vía oral provocaban convulsiones hasta por 3 h y que una dosis de 10 mg/kg inyectada por vía intraperitoneal causaba la muerte (Werch, *et al.*, 1957; Wilson., 1966).

De manera general, el AK reduce la tasa de crecimiento de varios órganos en los seres que lo consumen, estimula la eritropoyesis (Giroir, *et al.*, 1991), mas sin embargo, produce leucopenia debido a una alta toxicidad hacia los leucocitos (Beelik., 1956; Wilson., 1966). Además, cambia las concentraciones de los componentes del suero y la actividad de varias enzimas celulares (Giroir, *et al.*, 1991).

Estudios mas recientes demostraron que el AK podía generar efectos clastogénicos en el ADN en cultivos celulares de hígado de ratas y teratogenicidad en embriones de pollos (Kinosita, *et al.*, 1968; Stark, *et al.*, 1980).

Años mas tarde, Shibuya *et al* (1982) demostraron que esta toxina generaba cambios mutagénicos en *Salmonella typhimurium*.[®]

En 1991, estudios realizados por Wei *et al*, demostraron que concentraciones de 10 a 13 mg/ml en cultivos celulares de ovario de hámster, ocasionaban pérdida de proteínas celulares y la forma nuclear. Además, observaron que concentraciones de 6 mg/ml incrementó la cantidad de entrecruzamientos de cromátides hermanas y aumentó la aparición de aberraciones cromosómicas. Tiempo después se determinó que la aplicación de AK vía oral en ratas inducía la formación de tumores tiroideos (Fujimoto, *et al.*,

1998). Al año siguiente (1999), Mitsumori y Onodera determinaron que esta toxina redujo los niveles de hormonas tiroideas en suero y como resultado ocasionó las lesiones en tiroides.

Otro de los efectos recién observados del AK es que a concentraciones bajas se llega a producir cierto tipo de dermatitis aguda por contacto (Serra-Baldrich y Tribo., 1998)

Hasta la fecha no existe una regulación formal para el ácido ciclopiazónico ni para el ácido kójico y por lo tanto no se tienen medidas de control adecuadas para estas micotoxinas.

AF

Generalidades

Las AF son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*. En particular las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* son las que las producen en mayor cantidad (Ellis, *et al.*, 1991), sin embargo, algunas especies de *A. nomius* y *A. tamari* también las producen (Ellis, *et al.*, 1991; Gourama y Bullerman., 1995).[®]

El término de "aflatoxinas" proviene de la siguiente fuente: "A" por *Aspergillus*; "FLA" de la especie *flavus* y "TOXINA" que significa veneno, debido a que estas micotoxinas fueron aisladas primeramente en cultivos de *A. flavus* (Ellis *et al.*, 1991).

En 1961, fueron aisladas de alimento relacionado con la enfermedad X de los pavos mediante cromatografía en papel (Sergeant, *et al.*, 1961; Hartley, *et al.*, 1961) y posteriormente en cromatografía en capa fina (Nesbitt, *et al.*, 1963).

Años más tarde, Asao *et al* (1965) determinaron la estructura química de las aflatoxinas B₁ y G₁, posteriormente descubrieron que las AF B₂ y G₂ eran dihidro-derivados de las primeras.

Químicamente estas micotoxinas son difuranocumarinas (Buchi y Rae., 1985; Ellis, *et al.*, 1991). La diferencia entre las AF B y G radica en que las primeras presentan un ciclopentano unido al anillo cumarínico y las segundas presentan una fusión con una lactona (Gourama y Bullerman., 1995).

Actualmente se consideran 18 tipos diferentes de estas micotoxinas, pero las más comunes son la B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ (Beuchat., 1987; Ellis, *et al.*, 1991). De estas, la B₁ y la G₁ son las que ocurren con mayor frecuencia (Durackova., 1990; Ellis, *et al.*, 1991; Trail, *et al.*, 1995).

La clasificación de AF se hace de la siguiente forma: Las letras B y G se refieren a los colores fluorescentes (Blue y Green en inglés) que se observan al ser expuestas a luz ultravioleta; y los subíndices se refieren a la diferencia en los corrimientos en cromatografía en capa fina. Para el caso de las aflatoxinas M₁ y M₂ las cuales son hidroxilados de las AF B₁ y B₂ respectivamente y pueden encontrarse en leche (Bullerman., 1974; Ellis, *et al.*, 1991).

Ocurrencia

La contaminación de maíz por *A. flavus* fue descrita por primera vez en 1920 por Taumberius en Estados Unidos, y no fue hasta 1975, que Anderson *et al* demostraron la presencia de aflatoxinas en el maíz contaminado por este hongo.

Bajo condiciones favorables (88 - 95 % de humedad relativa y 25 - 30 °C) el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxinas es posible hasta en un 99% de los casos (Bullerman., 1979).

Las aflatoxinas presentan una distribución a nivel mundial, particularmente en productos como cacahuete y maíz entre otros ya mencionados. Los resultados obtenidos de muestreos internacionales realizados por la FAO (Organización de Agricultura y Alimentos), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP) de 1976 a 1983 revelaron que el 90% de las muestras obtenidas de Brasil, Canadá, Guatemala, Kenia, India, Filipinas, Tailandia, Estados Unidos, Reino Unido y la Unión Soviética, estaban contaminadas con aflatoxinas y que las cantidades variaban de 4 a 1920 µg/Kg para maíz y de 24 a 5000 µg/Kg para cacahuates Jelinek, *et al.*, 1989).

Otros estudios realizados en alimentos en diferentes países encontraron resultados similares; donde alrededor del 90% de las muestras estaban contaminadas y que mas del 95% de ellas contenían mas de 20 µg/Kg de AF Jelinek, *et al.*, 1989).

La presencia de estas toxinas ha sido también reportada en mayor o menor grado en países de América Latina como El Salvador, Costa Rica, Guatemala, Haití, Colombia, Ecuador y México (Tamaulipas, Chiapas y Baja California) de acuerdo con Reyes-Méndez (1995).

Ocurrencia en México

En México, se han realizado estudios sobre la ocurrencia de aflatoxinas en diversos alimentos. En los años 70 se analizaron: tortillas, frijol, maíz, harina nixtamalizada, nuez y alimento para ganado. La presencia de aflatoxinas varió desde 1% hasta 100%.

Durante 1980 a 1989 se analizaron diferentes alimentos como cacahuete que mostró una incidencia de AF^F de 17%, el mazapán fue de cerca de 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., 1994).

Entre 1989 y 1992 se realizó un programa para supervisar la presencia de aflatoxinas en maíz en el Estado de Tamaulipas. De 1990-1991, se encontró que el 33.5% de la cosecha no pudo ser dispuesta como alimento, puesto que contenía de 21 a 400 mg/Kg de aflatoxinas totales (Juan-López, *et al.*, 1995).

En Chiapas, se han encontrado niveles de entre 8 y 12 ppb, pero bajo condiciones adecuadas esta cantidad se podría incrementar. En Baja California, en el año de 1993, se hizo un monitoreo de aflatoxinas en maíz almacenado, encontrando cantidades de 16 a 74 ppb. Al año siguiente, el porcentaje de aflatoxinas aumentó en promedio 391 ppb, pero los rangos variaban desde 9 hasta 2100 ppb (Reyes-Méndez., 1995).

Por todo lo anterior podemos decir que los niveles de aflatoxina en cereales cosechados en varias partes de la República Mexicana están por arriba de los niveles recomendados para el consumo en humanos y/o animales.

Regulación de Aflatoxinas

Dada su alta toxicidad, la regulación sobre la presencia de estas sustancias es muy estricta y se ha establecido a nivel mundial. Según la FDA de Estados Unidos, las aflatoxinas son sustancias venenosas que se rigen por la Sección 402 a-1 del Acta referida a Comida, Drogas y Cosméticos. En este apartado se mencionan los niveles permitidos de AF que son como siguen 20 ppb totales para comida de consumo humano (FDA., 1994; C.A.S.T., 1989) y de 20 a 300 ppb totales para la mayoría de alimento de ganado (FDA., 1982; C.A.S.T., 1989); la leche, es una excepción ya que solo se permiten 0.5 p.p.b. de aflatoxinas totales (FDA., 1977; C.A.S.T., 1989).

En México la regulación especifica los siguientes valores máximos: 20 ppb en alimentos para humano, 0 ppb sobre leche y 200 ppb en alimento para ganado (Torres., 1995). Otros países presentan legislaciones mas estrictas a las ya mencionadas (Ellis, *et al.*, 1991).

Actividad biológica de las Aflatoxinas

Varios estudios han demostrado que las aflatoxinas presentan diversos efectos para la salud de los seres vivos, estos pueden ser catalogados en: efectos biológicos y efectos bioquímicos (Ellis, *et al.*, 1991).

Efectos biológicos

Estos son influenciados por la especie, el sexo, la edad, la calidad nutricional y la ingestión de otros químicos presentes, además de la dosis y el período de exposición del organismo (Gurtoo y Motycka., 1976; Preston, *et al.*, 1976; Moss y Smith. 1985).

En cuanto a su toxicidad, la aflatoxina B₁ es la mas potente de todas, seguida de la M₁, la G₁, la B₂ y finalmente la G₂ (Gourama y Bullerman., 1995). Como ya se ha mencionado las aflatoxinas son potentes carcinógenos, la AF B₁ esta considerada como el principal hepatocarcinógeno en animales, aunque, se ha visto que también las aflatoxinas B₂ y G₁ presentan este efecto pero en menor grado (Moss y Smith, 1985; Ellis, *et al.*, 1991). Se cree que la toxicidad de la AF B₁ se debe a su conversión en epóxido que es el que reacciona con el ADN y causa el efecto cancerígeno (D'Andrea y Haseltine., 1978; Moss y Smith., 1985; Dvorackva., 1990).

La aflatoxicosis es una intoxicación debida al consumo de alimento contaminado con AF (Dvorackva., 1990; Trail, *et al.*, 1995). Esta se divide en primaria y secundaria, la primaria se origina cuando se consumen grandes cantidades de estas micotoxinas, puede terminar con la muerte del individuo en forma rápida, en cuyo caso se observan en las necropsias o autopsias zonas hemorrágicas en el hígado, proliferación del parénquima hepático y células epiteliales, además de congestión en riñón y enteritis hemorrágica (Newberne., 1985; Moss y Smith., 1985 Dvorackva., 1990; Trail, *et al*, 1995). Por otro lado, la

aflatoxicosis secundaria ocurre al ingerir dosis bajas de estas micotoxinas, pero por períodos largos de tiempo. Esto provoca una reducción de la efectividad de la fagocitosis y de la formación de anticuerpos no específicos, lo que puede ocasionar un sistema inmune débil, pérdida de peso y con el tiempo la muerte (Pier, *et al.*, 1989; Ellis, *et al.*, 1991; Trail, *et al.*, 1995)

Efectos bioquímicos

Son aquellos en los que las aflatoxinas actúan como inhibidores biosintéticos de las rutas metabólicas, "*in vivo*" e "*in vitro*" (Moreau y Moos., 1979). Se ha demostrado que las AF B₁, G₁ y M₁ afectan la cadena respiratoria en mitocondrias, además de inhibir la ATPasa lo cual reduce la producción de ATP; de forma similar se ha observado que los niveles de glucógeno se reducen debido a la acción de estas toxinas (Moss y Smith., 1985).

El ADN también es afectado, se ha determinado que la AF B₁ o su epóxido (B_{2a}) se unen fuertemente al ADN formando abductos que inhiben la transcripción (Clifford, *et al.*, 1967; Swensen, *et al.*, 1977); otros investigadores han observado que esta aflatoxina también se une a ARN impidiendo la transcripción (Swensen, *et al.*, 1977).

Sabbioni (1990), demostró que la AF B₁ se une con los residuos de lisina encontrados en la albúmina sérica disminuyendo su actividad; también se ha observado que en el interior celular esta AF se interconvierte en aflatoxina B_{2a} la cual se une a aminoácidos libres y enzimas provocando una reducción de las tasas de producción de proteínas (Moreau y Moss., 1979).

Medidas de Control de las Aflatoxinas

Debido a la alta toxicidad de las AF se han buscado diversos métodos para eliminarlas, estos pueden ser clasificados en tres grandes grupos: físicos, químicos y biológicos (Ellis, *et al.*, 1991).

Métodos Físicos

Aquí se incluyen a la extracción con solventes, la cual se ha comprobado que presenta un recuperación de aflatoxinas de entre el 90 y 95 %; sin embargo, el uso de solventes presenta serias desventajas como el aumento en los costos y pérdida de las propiedades nutritivas y organolépticas del alimento (Zaika y Buchanan., 1987; Moss y Smith., 1985).

Otro método físico es el uso de altas temperaturas, el cual puede ser efectivo para cierto tipo de alimentos, la desventaja es que las aflatoxinas presentan una temperatura de degradación de 250°C en promedio, la cual puede ser difícil de alcanzar con ciertos alimentos sin que estos sufran deterioro (Peers y Linsell, 1975). Otros investigadores han demostrado que el calor húmedo podría ser mas efectivo sin embargo, solo se logran reducciones del 80% como máximo de AF totales (Goldblatt., 1971; Mann, *et al.*, 1976).

El uso de radiaciones es otro método utilizado para eliminar AF; este método es muy costoso y su efectividad no es muy buena. En estudios realizados solo el 45% de las aflatoxinas totales fueron eliminadas y se puede correr el riesgo de que el alimento se deteriore y no sea apto para el consumo (Fennell., 1966; Frank y Grunewald, 1970)

Finalmente el uso de adsorbentes también ha sido analizado. Estas son sustancias a las que las aflatoxinas se adhieren covalentemente, tal es el caso de la arcilla de bentonita (Masimango, *et al.*, 1978) y las sales de aluminosilicato de sodio-calcio. Se ha comprobado que estos compuestos pueden separar hasta el 80 % de las aflatoxinas de un alimento y en cierta forma modificar su toxicidad (Doyle, *et al.*, 1982; Zaika y Buchanan., 1987; Philips, *et al.*, 1988).

Métodos Químicos

La inactivación química es uno de los métodos mas prometedores para la remoción de aflatoxinas de alimentos; por lo que una enorme cantidad de químicos han sido estudiados. Entre los mas usados están: ácidos, bases, algunos gases y agentes oxidantes (Moss y Smith., 1985).

Los ácidos y las bases fuertes presentan ciertas ventajas sobre los otros químicos, ya que son baratos y su eficiencia es muy alta (95 - 98 %) (Goldblatt y Dollear., 1977); sin embargo, en los alimentos cambian sus propiedades organolépticas y sus características nutricionales. Estos químicos no actúan solo sobre las AF B₁ y G₁ (las cuales son convertidas en sus epóxidos B_{2a} y G_{2a} respectivamente) (Pons, *et al.*, 1972) pero estos siguen siendo peligrosos como se ha explicado anteriormente.

Otros químicos usados son los gases y según los investigadores el de amonio es el mas efectivo. Este último reduce la cantidad de aflatoxinas en cerca de un 98%; sin embargo, también disminuye de forma significativa la cantidad de proteínas y deja un olor sobre el alimento que no es fácilmente eliminado

(Brekke, *et al.*, 1977), a pesar de esto, este gas se usa en algunos países como Francia, Senegal y Estados Unidos (Moss y Smith., 1985).

Dentro de los agentes oxidantes, esta el uso de ozono (Dwarakanath, C.T., *et al.*, 1968) y peróxido de hidrogeno (Sreenivasamurthy, *et al.*, 1967; Applebuan y Marth., 1980); sin embargo, estos agentes actúan de forma similar a los ácidos y bases fuertes y no afectan de manera significativa a las aflatoxinas B₂ y G₂ (Moss y Smith., 1985).

Otros compuestos químicos que han sido usados para el control de estas toxinas incluyen a insecticidas diclorados, ácido benzóico, ácido sórbico, etileno, oxígeno, azida, nitratos, sales de potasio, sales de selenio y metales pesados. Sin embargo, estos reducen el crecimiento del hongo mas que la cantidad de aflatoxinas producidas, además de dejar residuos tóxicos o indeseables, difíciles de eliminar y de cambiar las propiedades nutricionales de los alimentos tratados

(Zaika y Buchanan., 1987).

Métodos biológicos

Muchos microorganismos incluyendo bacterias, actinomicetos, levaduras, hongos y algas presentan la capacidad de degradar aflatoxinas mediante procesos enzimáticos (Ellis, *et al.*, 1991). De todos los organismos estudiados *Flavobacterium auranticum* NRRL B-184, es el mas efectivo; este microorganismo transforma la AF B₁ en aflatoxicol; sin embargo, esta transformación lleva mucho tiempo. Se ha estimado que se requieren de 3 a 4

días para que esta bacteria transforme el 60 % de la aflatoxina presente en un alimento (Ciegler, *et al.*, 1966; Lillehoj, *et al.*, 1971).

Otros microorganismos probados son los *Lactobacillus* que también han demostrado capacidad de degradar aflatoxinas (Karunaratne, *et al.*, 1990). Todos los métodos anteriores presentan serias desventajas por su costo y/o por los efectos que ocasionan al alimento tratado (Applebaun y Marth., 1980; Moss y Smith., 1985; Karunaratne, *et al.*, 1990; Ellis, *et al.*, 1991).

Actividad antifúngica de extractos de plantas

Por todo lo anterior se han buscado nuevas alternativas para eliminar o reducir el crecimiento de los hongos y/o la producción de estos metabolitos tóxicos. Una de esas posibles estrategias es la utilización de extractos de plantas con capacidad antifúngica y/o inhibidoras de la producción de micotoxinas.

El uso popular de extractos de plantas se remonta desde los egipcios quienes las usaban para preservar a sus muertos y los griegos para eliminar algunas de las enfermedades mas comunes de la época (indigestión, neumonía, etc.) además de usarse como conservadores de sus alimentos (Richard y Gallagher., 1979; Recio y Rios., 1989).

Los primeros reportes científicos fueron escritos por Louis Pasteur, en el año 1858, en donde describió la efectividad del ajo y la cebolla como antibacterianos y antifúngicos (Block., 1983; Delaha y Garagusi., 1985).

En América los primeros registros que se tienen están contenidos en el Códice Badiano, este libro fue escrito en 1552 por monjes franciscanos que

llegaron durante la conquista. Se dice que el 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, 1992).

Durante la década de 1920 a 1930 varios investigadores describieron los efectos inhibitorios en bacterias y hongos por aceites esenciales usados en la industria de perfumería de la época (Macht y Kunkel, 1920; Dyche-Teague; 1924).

Tiempo después en 1948; Sporston *et al*, observaron que extractos de 73 plantas presentaban un efecto inhibitorio en bacterias y hongos patógenos.

En estudios realizados en 1971 y 1972, se reportó que algunos extractos provenientes de 156 plantas presentaban inhibición del crecimiento de bacterias y hongos patógenos los cuales eran mas potentes que los antimicrobianos comúnmente usados en la época (Mitscher, *et al*, 1971; Mitscher, *et al*, 1972).

En 1977 se demostró que extractos provenientes del ajo presentaban una actividad fungicida y fungistática contra levaduras de importancia médica (Moore y 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 y Beuchat, 1984).

Al año siguiente (1978) Morris *et al*, demostraron que fragancias crudas provenientes de plantas usadas en los jabones inhibían el crecimiento de

bacterias y levaduras patógenas. Se encontró que el 44% mostraba una inhibición contra al menos uno de los microorganismos probados.

Van Hoof *et al*, en 1980, evaluaron los efectos de extractos del álamo (*Populus sp*) contra virus, bacterias patógenas, levaduras y hongos de importancia médica. Se encontró que algunas de las fracciones obtenidas presentaban efectos antibacteriales, antifúngicos y antivirales.

Años después, Rovalo *et al* (1983) realizaron un estudio sobre *Helietta parvifolia* (barreta) la cual es una planta de la región noreste de México; a la que se le da diversos usos y encontraron que el aceite esencial de esta planta presentaba un alto potencial fungicida inhibiendo el crecimiento de *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* y *Fusarium sp.*, además de causar alteraciones anatómicas y fisiológicas en *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. flavus*.

Tres años después se estudió la actividad antibacteriana y antifúngica de flavonoides provenientes de plantas, encontrándose que los hongos fueron más sensibles que las bacterias probadas (El-Gammal y Mansour., 1986). En ese mismo año, Polancheck *et al*, comprobaron que las saponinas aisladas de la raíz de alfalfa presentaban una alta toxicidad a hongos y contra bacterias patógenas.

Betto *et al*, en 1988, estudiaron extractos de *Artemisia arborescens*, analizando sus partes aéreas y subterráneas por separado. Este estudio determinó que solo las partes subterráneas mostraban actividad antitumoral y antifúngica por lo que se determinó que los agentes antimicrobianos eran específicos de ciertas partes de la planta. Durante ese año Lopes *et al*,

encontraron que extractos provenientes de plantas de la familia Aristolochiaceae presentaban propiedades antitumorales, antifúngicas, antibacteriales e insecticidas. También en este año, se aisló la fitoalexina GMM, de la zanahoria, que inhibe el crecimiento de células bacterianas, fúngicas, animales y vegetales, alterando la permeabilidad de la membrana (Amin, *et al.*, 1988).

En el año 1990, se analizó la actividad de 38 extractos de plantas contra *Candida spp* encontrando que mas del 40 % de ellos presentaban un efecto inhibidor del crecimiento de esta levadura (Caceres, *et al.*, 1990b).

En el año de 1991, se encontraron extractos de plantas de la zona mediterránea que presentaban actividad antimicrobiana contra al menos uno de los microorganismos probados (6 especies bacterianas y 9 fúngicas); entre los hongos filamentosos se encontraban *A. parasiticus* y *F. culmorum*, los cuales fueron inhibidos por tres de los extractos probados (March, *et al.*, 1991). Ese mismo año, Elías *et al*, determinaron que saponinas triterpenoides provenientes de *Hedera helix* presentaban propiedades antifúngicas, antihelmínticas, moluscocídica y antimutagénica.

Linton y Wright en 1993 demostraron el efecto de los compuestos volátiles provenientes de plantas presentaban diversos efectos sobre el crecimiento de bacterias y hongos, por ejemplo: algunos compuestos volátiles provenientes de las semillas de frijol y pepino en germinación inhibían la esporulación de hongos como *Penicillium sp.* y *Gelasinnispora cerealis*. Este año se estudió el uso

de extractos de plantas medicinales para combatir enfermedades fúngicas de plátanos, obteniéndose mejores resultados que con los antifúngicos comúnmente usados (Singh, *et al.*, 1993).

Al año siguiente, 1994, se demostró que los compuestos volátiles de las hojas de algodón presentaban efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *A. flavus* hasta por 7 días, de manera similar, los productos volátiles del neem reducían notablemente la producción de aflatoxinas y el crecimiento de *A. parasiticus* (Eberhardt y Young., 1994). Ginesta-Peris *et al*, en ese año, obtuvieron un compuesto con posible actividad antimicrobiana llamado xantina; aislado de *Xanthium spinosum*, este resultó muy efectivo como inhibidor del crecimiento de bacterias y hongos.

También en 1994, Ouf *et al*, aislaron compuestos antifúngicos provenientes de plantas del género *Zygophyllum*, donde solo la fracción metanólica exhibió un fuerte efecto contra los hongos probados. De igual forma se estudiaron extractos de plantas del género *Salvia* y *Bhesa paniculata*, estos mostraron actividad bactericida, antifúngica, y antitumoral (Ohashi, *et al.*, 1994). En ese año se demostró el efecto de algunos aceites esenciales contra microorganismos deteriorantes de alimentos y se determinó que estos podían ser usados como conservadores de los mismos (Mishra y Dubey., 1994).

Al año siguiente (1995), Nwosu, y Okafor realizaron estudios donde determinaron el efecto antifúngico de plantas medicinales del sureste de Nigeria contra hongos patógenos. También en este año, Pai y Platt comprobaron el efecto

antifúngico de los extractos de ajo contra diferentes especies *Aspergillus* causantes de otitis.

En 1996, Aderiye y Ogundana determinaron la propiedades antifúngicas de la planta *Dioscorea alata*, la cual se usa comúnmente en la medicina tradicional india, contra hongos y levaduras patógenas. Estudios similares han sido realizados por Larhsini y Lazrec que demostraron la actividad antifúngica y analgésica de *Sium nodiflorum*; Fabry y Okemo que observaron un efecto inhibitorio sobre hongos patógenos de plantas medicinales de Africa. Además de los estudios de Lis-Balchin y Deans quienes probaron extractos de *Pelargonium sp.* contra *A. niger* encontrando efectos fuertemente inhibitorios.

Un año después (1997), un sinnúmero de estudios fueron realizados, sin embargo; solo mencionaremos algunos de los mas importantes para este trabajo; Tan y Kong, demostraron que secoiridoides presentes en *Gentiana siphonantha* presentaban efecto inhibitorio del crecimiento de ciertos hongos y levaduras patógenas. También en ese año, Valsaraj y Pushpangadan hicieron un muestreo de 78 plantas medicinales de las cuales el 80 % presentaba un efecto inhibitorio sobre hongos (*Aspergillus sp* y *Candida albicans*) y bacterias patógenas (*S. aureus* y *E. coli*).

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 demostró la efectividad de extractos de Ashwagandha (planta usada en la medicina tradicional hindú) en ratones con infecciones por

Aspergillus. Este tratamiento fue dado por vía oral y probó ser mas efectivo que los tratamientos con antimicóticos usados. También demostró el efecto inhibidor de la formación de esporas en especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* por algunos aceites esenciales. En este trabajo determinó que el efecto se debía principalmente a una inhibición de la respiración del hongo.

En Latinoamérica se han realizado diversos estudios en busca de sustancias con actividad antimicrobiana, algunos de los mas recientes son: entre otros el realizado en 1990 por Caceres *et al*, en el cual, se probaron 84 extractos de plantas contra 5 especies de enterobacterias encontrando que al menos uno de los extractos presentaba actividad antimicrobiana contra alguna de las bacterias probadas (Caceres, *et al.*, 1990a), meses después se analizó el efecto de 38 extractos de plantas contra *Candida sp.* (Caceres, *et al.*, 1990b).

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

El uso de aceites esenciales provenientes de plantas para proteger a maíz en condiciones de almacén fue demostrado en 1998 por Montes-Belmont y Carvajal, además se determinó su efectividad como inhibidores del crecimiento de especies de *Aspergillus*.

Efecto de extractos de plantas sobre la producción de micotoxinas

Los aceites esenciales de especias, como se ha visto, son algunos de los principales productos de las plantas que inhiben el crecimiento de los hongos productores de aflatoxinas. En 1974 se demostró que los componentes de aceites esenciales de canela y clavo inhibían el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* en concentraciones de 200 a 250 ppm (Bullerman., 1974). De igual forma se observó un efecto similar en *A. flavus* con el aceite esencial de canela (Bullerman, *et al.*, 1977).

En el año de 1989, Farag *et al* demostraron que los aceites esenciales de clavo, comino y tomillo inhibían el crecimiento y la producción de toxinas en *A. parasiticus*. En 1991 se determinó que el aceite de eucalipto originaba inhibición en la producción de toxinas por *A. flavus* (Ansari y Shrivastava., 1991).

Al año siguiente (1992), se demostró la inhibición de la producción de aflatoxinas y crecimiento de *A. flavus* en granos de maíz, utilizando extractos de ajo y de cebolla además de eugenol purificado de clavo. Se observó que la máxima inhibición de crecimiento micelial ocurrió con el extracto de ajo y la inhibición mayor de producción de aflatoxina ocurrió con el extracto de cebolla. El eugenol fue el compuesto con mayor actividad para inhibir la producción de aflatoxina en los granos de maíz (Bilgrami, *et al.*, 1992).

Ese mismo año, Sinha *et al*, analizaron "*in vitro*" el efecto de los aceites de clavo y de canela en el crecimiento y la producción de aflatoxina por *A. flavus*. La actividad de estos compuestos se verificó en el maíz reproduciendo

condiciones de almacenamiento. Se observó que el aceite de canela fue mejor inhibidor del crecimiento y de la producción de aflatoxinas en maíz comparada con el de clavo.

En la India, Kumar y Prasad utilizaron el extracto obtenido de *Andrographis peniculata* y observaron que a concentraciones de 10 mg/ml se producía una reducción del crecimiento y de la producción de aflatoxinas de hasta un 78 % en comparación con el control (Kumar y Prasad., 1992).

Patkar *et al.*, en 1993, determinó el efecto inhibitorio de varias plantas medicinales de la India sobre el crecimiento y la producción de toxinas en *A. flavus* en concentraciones relativamente bajas, de 50 a 150 ppm.

En 1994; Prasad *et al.*, analizaron la planta *Amorphophallus campanulatus* y el oxalato de calcio como inhibidor de la biosíntesis de aflatoxina. Determinaron que a una concentración de 4.5 mg/ml de extracto de las hojas y 0.4 mg/ml de oxalato de calcio, se inhibía el crecimiento y la biosíntesis de aflatoxina de manera significativa en comparación con el control. Ese mismo año se demostró el efecto inhibitorio de aceites esenciales de algunas especias sobre la producción de aflatoxinas y el crecimiento de *A. parasiticus*, demostrándose que estos aceites podían inhibir ambos procesos en concentraciones desde 0.1 % hasta 1% (Tantaoui-Elaraki y Beraoud., 1994).

Mahmoud en 1994, probó el efecto inhibitorio de 20 aceites esenciales sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *A. flavus*. La

concentración mas alta probada fue de 1000 ppm y la inhibición se detectó desde las 200 ppm para algunos de los aceites.

Un año mas tarde (1995), Goodrich-Tanrikulu *et al* reportaron un efecto inhibitorio del crecimiento y la producción de aflatoxinas en *A. flavus* por un regulador del crecimiento de plantas llamado metil-jasmonato.

En 1997, Bankole, demostró que los aceites esenciales de *Azadirachta indica* y *Morinda lucida* en concentraciones de alrededor de 250 ppm presentaban inhibición en el crecimiento y la producción de aflatoxinas en *A. flavus* en maíz bajo condiciones de almacén; también se observó que la concentración que inhibía el 100% de la producción de aflatoxinas era de 1000 ppm, sin embargo, el hongo todavía mostraba crecimiento a esta concentración.

En 1997, Vargas-Arispuro *et al* determinaron que extractos de plantas usados en la medicina tradicional 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.

Inhibición de la actividad biológica de las aflatoxinas por extractos de plantas

El primer reporte data de 1994 donde Hashim y Aboobaker encontraron que extractos de algunas plantas usadas como especias inhibían la formación de abductos de ADN-Aflatoxina “*in vitro*”; esto probablemente debido a un aumento en la actividad enzimática de los cuerpos microsomales del hígado.

Tres años mas tarde; en 1997, se demostró el efecto antimutagénico de extractos de plantas en *Salmonella sp.* tratada con aflatoxina B₁ (Gonzalez de Mejia y Ramos-Gomez., 1997). En este año, también se aislaron polifenoles de romero los cuales presentaban efectos inhibitorios en la formación de abductos en ADN causados por aflatoxinas (Offord y Mace., 1997). Ese mismo año, se comprobó que extractos de plantas presentaban efectos protectivos contra la formación de aberraciones cromosómicas causadas por aflatoxinas y otros compuestos carcinógenos (Ito y Nakamura., 1997). Después Gyamfi y Aniya en 1998, demostraron la protección de plantas medicinales sobre dosis altas de aflatoxinas en ratas fischer.

Aunque existen alguna investigaciones sobre la actividad de extractos de plantas sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *Aspergillus*, poco o nada se ha investigados sobre la producción de otras micotoxinas, así como el efecto sobre otros procesos de la fisiología del hongo de importancia en la patogénesis. Debido a esto nos propusimos determinar el efecto de extractos de dos géneros de plantas de la zona Noreste de la República Mexicana sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de micotoxinas de *Aspergillus flavus* Link ex Fries y *A. parasiticus* Speare "In vitro" y en maíz bajo condiciones de almacenaje.

HIPOTESIS

Los extractos provenientes de plantas del género *Yucca* y *Larrea tridentata* presentan inhibición del crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* tanto "in vitro" como en maíz en condiciones de almacén.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de extractos de plantas del género *Yucca* y *Larrea tridentata* sobre el crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio de cultivo y en granos de maíz en condiciones de almacén.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar los extractos de plantas del género *Yucca* y *Larrea* con actividad antifúngica.

Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos activos en medio de cultivo y en granos de maíz en condiciones de almacén.

Establecer el efecto de dosis subletales de los extractos antifúngicos sobre el crecimiento del hongo y la producción de ácido ciclopiazónico, ácido kójico y aflatoxinas.

Determinar la actividad esporicida de los extractos con actividad inhibidora.

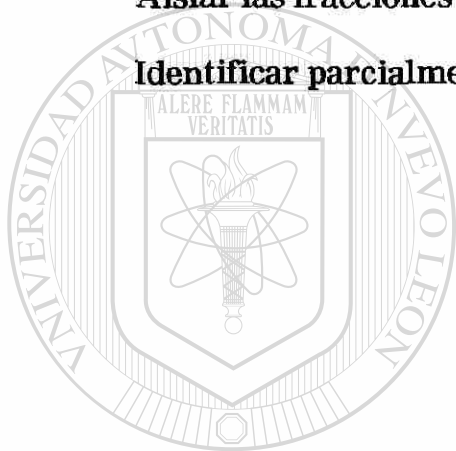
Establecer el efecto de los extractos antifúngicos en dosis subinhibitorias sobre la germinación de esporas.

Determinar la actividad de los extractos sobre el crecimiento de tubo germinativo.

Utilizar mezclas de los extractos con el fin de determinar su posible sinergismo como inhibidores del crecimiento y la producción de toxinas.

Aislar las fracciones de los extractos crudos con actividad antifúngica.

Identificar parcialmente los compuestos activos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MATERIAL Y METODO

Microorganismos utilizados

Se utilizaron las cepas la SRRC 1059, la SRRC 1273 y la SRRC 1299 de *Aspergillus flavus* y las la SRRC Su-1 y la SRRC 148 de *A. parasiticus*. Estas cepas fueron donadas por el Dr. Deepak Bahtnagar del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

Inoculo

Este fue preparado de la siguiente forma: en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) se inoculó, cada una de las cepas por medio de picadura en el centro de la caja, estas se incubaron a 28 °C por 7 días, transcurrido este tiempo se tomaron las conidias y se realizaron diluciones de las mismas en solución salina 0.85% hasta obtener una concentración de 1×10^7 conidias por ml. La concentración de esporas se determinó mediante una cámara de Neubauer y se corroboró mediante espectrofotometría y cuanta en placa (Bullerman, *et al.*, 1977, Ellis, *et al.*, 1991)

Plantas analizadas

Se utilizaron plantas del género *Yucca* (*Yucca carnerosana*, *Yucca filifera*, *Yucca rigida*, *Yucca stricta* y *Yucca thompsoniana*) y *Larrea tridentata* DC Cov; estas plantas fueron obtenidas mediante un muestreo aleatorio simple, seleccionando de tres a cinco plantas como mínimo.

Se utilizó también la variedad de maíz Cargell Roy Treviño, la cual es usada de forma comercial en la región.

Obtención de los extractos

Extractos de las plantas de *Yucca*

Se tomó 1 K de las hojas de la planta fresca, estas se secaron a 30 °C por 48 h en una estufa de circulación forzada. Posteriormente las plantas secas se trituraron en un molino Wiley con una maya de 10, después de esto la muestra se mezcló con la solución de extracción la cual contenía Agua:Isopropanol:Acido Clorhídrico (HCl) 0.1 M; en proporciones iguales. Esta mezcla se dejó macerar por 48 h a temperatura ambiente en oscuridad total. Posteriormente, se filtró el macerado; la mitad del filtrado se colocó en un equipo Corning donde se le realizó una bidestilación y el resto se concentró en un rotavapor a baja presión a 40 °C; el residuo se separó en tres partes; una se maceró con HCl (0.1M), la otra con NaOH (0.1M) y la tercera se mezcló con cloroformo por 4 días a 30 °C. De allí se filtró y se dejó en reposo en un embudo de separación por 48 h a 30 °C.

Después de este tiempo se formó un precipitado el cual se separó y el líquido restante se pasó a un rotavapor con baja presión para concentrarlo (Domínguez,[®] 1988).

Extractos de *L. tridentata*

Las plantas se secaron y se trituraron bajo las mismas condiciones antes descritas, una vez hecho esto se mezclaron con una solución de Metanol:HCl 0.1N (3:1) y fueron llevadas a reflujo por 7 días en un aparato Soxhlet. Transcurrido este tiempo, el extracto se concentró de la forma anteriormente

descrita y se resuspendió en etanol 96 %, agua destilada estéril y una mezcla de Glicerol:Agua (1:1) (Domínguez., 1988).

Todos los extractos obtenidos se guardaron a 4 °C en la obscuridad hasta su uso pero por un período no mayor a 3 meses (Sánchez-García., 1995).

Determinación de la actividad antifúngica de los extractos

Aquí se tomaron cajas de Petri con 15 ml de PDA las cuales fueron inoculadas con 0.5 ml de la solución de conidias previamente descrita, estas se distribuyeron en la caja con un asa de Driglasky e inmediatamente después se procedió a realizar orificios en la superficie del agar. En cada pozo se colocaron 75 µl de extracto y las cajas se incubaron a 28 °C por 5- 7 días. Después de este tiempo se determinó la presencia de halos de inhibición en los cultivos. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y el positivo 75 µl de Hipoclorito de Sodio al 85% (Sánchez-García., 1995; Lozano., 1997)

De igual forma se prepararon discos de papel filtro Whatman No 1 de 5 mm de diámetro, cada disco se impregnó con 50 µl de extracto y se dejaron secar a 37°C por 3 h, al terminar este tiempo se colocaron en cajas de Petri con PDA inoculadas e incubadas como se describió antes. Los extractos positivos fueron aquellos que mostraron un halo de inhibición a su alrededor o que no presentaban crecimiento en superficie del papel; de manera similar al anterior, discos sin extracto fueron los controles negativos y los positivos contenían 50 µl de Hipoclorito de Sodio al 85% (Lozano., 1997).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del crecimiento (CMI)

Se utilizaron cajas de Petri con 20 ml de PDA y matraces con 25 ml de medio Czapek. A estos se les agregó diferentes concentraciones de los extractos activos (iniciando en 1 mg/ml y con incrementos de 1 mg/ml) (Sánchez-García., 1997). Después se inocularon con una suspensión de conidias hasta obtener 1×10^8 conidias por ml en los medios y se incubaron a 28 °C por 7 días, se realizaron observaciones cada 24 h con el fin de determinar la presencia o ausencia de crecimiento. La CMI se definió como la concentración de extracto mas bajo que inhibía el crecimiento de los hongos durante el período de incubación. Cada experimento fue realizado por duplicado con tres repeticiones.

Efecto de los extractos en el crecimiento del hongo

Se probó el 25, 50 y 75 % de la CMI de los extractos activos de las plantas en el medio PDA (15 ml) en cajas de Petri; posteriormente se inoculó el hongo por picadura en el centro de la caja. Después los cultivos se incubaron a 28 °C por 7 días, observando su morfología colonial.

Se utilizó la técnica de Ridell; para lo que se tomó 1 cm² de PDA con la concentración subletal del extracto activo; este se colocó en un portaobjetos y se inoculó por los lados con las conidias del hongo; el microcultivo se incubó en una cámara húmeda a 28°C y se observó el crecimiento hifal y la conidiación cada 24 h al microscopio de luz.

De estos cultivos se realizaron montajes y se observaron en microscopía electrónica de barrido para su análisis; para el cual se inocularon tubos con caldo Czapek (previamente descrito) y se les agregaron concentraciones conocidas de extractos; después se incubaron a 28 °C por 7 días; transcurrido este tiempo se colocaron las monturas adecuadas y se recubrieron con una capa de oro con el fin de darles contraste; posteriormente se observaron al microscopio electrónico de barrido para determinar los efectos del extracto en el crecimiento de los hongos.

Efecto de mezclas de los extractos en el crecimiento del hongo

Los extractos a su CMI, fueron mezclados en proporciones que iban desde 1:1 hasta 1:9 y viceversa, cada mezcla se colocó en tubos de ensaye de 13 x 80 mm con 3 ml de caldo Czapek, que posteriormente fue inoculado como se ha descrito previamente. Después se incubaron a 28 °C por 7 días. Transcurrido este tiempo

se observaron buscando crecimiento visible.

Efecto de extractos sobre la producción de toxinas

Se añadió el 25, 50 y 75% de la CMI en matraces con 50 ml de medio Czapek, el cual se inoculó como fue previamente descrito; inmediatamente después se incubaron a 28 °C por un período de 7 días; terminado este tiempo, el cultivo se filtró al vacío para separar el crecimiento del hongo, se determinó peso seco para medir su crecimiento y al sobrenadante se le sometió a extracción múltiple de toxinas.

Extracción Múltiple de Toxinas

El sobrenadante se mezcló con 200 ml de diclorometano:metanol (80:20); inmediatamente después se agitó por 5 min y se colocó en un embudo de separación, se dejó reposar por 15 min y después se concentró mediante evaporación hasta obtener un volumen final de 50 ml. Posteriormente se le agregaron 400 ml de diclorometano:agua (2:1), se agitó por 10 min y después se dejó reposar por 30 min en un embudo de separación, transcurrido este tiempo se separó la fase de diclorometano, que contenía las aflatoxinas. Esta fase se evaporó hasta obtener un volumen final de 10 ml, los cuales se filtraron a través de una columna de NaHCO₃ anhidro, el filtrado se concentró de nuevo hasta un volumen de 2 ml que se colocó en viales, en la obscuridad a 30 °C por 16 - 18h (Durackova, Z., *et al* 1976) y posteriormente se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su cuantificación mediante HPLC.

La fase acuosa anterior se mezcló con 100 ml de HCl 5N, se agitó por 5 min y después se mezcló con diclorometano hasta obtener una relación (1:1), la mezcla se agitó por 10 min y la fase de diclorometano se separó, evaporó, filtró y conservó de la misma forma que las aflatoxinas; en esta extracción se obtuvo el ácido ciclopiazónico. La cuantificación de esta toxina se realizó mediante espectrofotometría (Durackova, *et al.*, 1976).

La fase acuosa restante contenía el ácido kójico, de ésta se tomó una alícuota de 10 ml, que fue congelada a -70 °C, para posteriormente ser liofilizada

y conservada como las toxinas anteriores, para su análisis posterior mediante espectrofotometría (Durackova, *et al.*, 1976).

Cuantificación de Aflatoxinas

El extracto se resuspendió en 2 ml de acetonitrilo:agua (9:1), esta mezcla se pasó por columnas de extracción de fase sólida (Supelclean LC- 18), el filtrado fue derivatizado mediante el método oficial 994.08 de la AOAC (Association of Official Analytical Chemist); en la cual se tomaron 200 µl del filtrado y se mezclaron con 700 µl de una solución derivatizadora (10 ml de ácido trifluoroacético, 5 ml de ácido acético glacial y 35 ml de agua desionizada). Esta mezcla se calentó a 65 °C por 8.5 min, pasado este tiempo se enfrió a temperatura ambiente y posteriormente se inyectaron 20 µl de la solución derivatizada en el aparato HPLC, bajo las siguientes condiciones: Se utilizó una fase móvil de acetonitrilo:agua (4:1), con un flujo de 1 ml/min y una columna de 15 cm LC-18 de fase reversa marca Waters. Como protección se utilizó una precolumna LC-18 de fase reversa Waters de 2 cm de longitud.

Una vez corrido el cromatograma se determinaron los picos de aflatoxinas y se compararon con una curva estándar previamente obtenida para determinar la concentración en el medio (AOAC., 1995a).

Cuantificación de Acido Ciclopiazónico

Las muestras fueron resuspendidas en acetona y se corrieron en una placa de cromatografía en capa fina de 20 x 20 cm, previamente la placa se roció con una solución de ácido oxálico en metanol al 15%, inmediatamente después se

colocaron a 100 °C por 6 h. Transcurrido este tiempo se enfriaron a temperatura ambiente y las muestras se colocaron a 1 cm de la parte final. Se usó como solvente de corrida tolueno:etilacetato:diclorometano:ácido fórmico (70:50:50:20). Después de correr las placas se dejaron secar y se les agregó reactivo de Erlich (p-dimetilaminobenzaldehído al 5 % disuelto en HCl 5N), la presencia de ácido ciclopiazónico fue revelada por la aparición de manchas de color púrpura (Rathinavelu, A. and E.R.B. Shanmugasundaram, 1984) las cuales fueron raspadas y resuspendidas en acetona para posteriormente ser leídas a 580 nm en un espectrofotómetro (Chang-Yan y Bidasee., 1990). La concentración fue determinada mediante una curva estándar.

Cuantificación de Acido Kójico

La muestra liofilizada se resuspendió en 200 µl agua desionizada estéril, de esta se colocaron 100 µl en una placa para cromatografía en capa fina de 20 x 20 cm; utilizando como eluentes una mezcla de agua:ácido acético:acetona:acetato de etilo (1:1:3:5); posteriormente se les roció una solución de FeCl₃ al 1% en HCl 2 M. La presencia de ácido kójico fue revelada por la aparición de manchas de color amarillo, estas manchas fueron raspadas y resuspendidas en 3 ml de agua desionizada; finalmente se determinó la absorbancia a 505 nm en el espectrofotómetro (Bentley., 1957). La concentración se determino mediante una curva estándar.

Determinación de la Concentración Mínima Esporicida (CME):

Se usaron tubos de 18 x 150 mm con 10 ml de solución salina 0.85% estéril, cada tubo fue inoculado con conidias del hongo hasta tener una concentración de 1×10^5 conidias/ml. Posteriormente se les agregó el extracto activo en concentraciones de 0 hasta 100 mg/ml primer en rangos de 10 mg/ml y posteriormente en múltiplos de 1 mg /ml y se incubaron a 28 °C por 7 días.

Cada 24 h se realizó un muestreo de los tubos donde se tomaron 200 μ l y se determinó la presencia de conidias viables mediante cultivo en cajas de Petri con PDA (Lozano., 1997).

La CME fue definida como la concentración de extracto mas baja que inhibía la germinación las esporas.

Efecto en la germinación de las esporas

Se colocaron 5 ml de medio Czapek en tubos de 13 x 100 mm, el cual fue inoculado como se ha descrito anteriormente. Después se añadió 25, 50, 75 o 100% de la CME. Posteriormente se incubaron 48 h a 28 °C, haciendo conteos de esporas germinadas cada 24 h en un microscopio de luz (Aderiye y Ogundana., 1996).

Efecto sobre tubo germinativo

Se colocaron 5 ml de medio Czapek en tubos de 13 x 100 mm, el cual fue inoculado como se ha descrito anteriormente. Este se incubó a 28 °C por 24 h; terminado este tiempo se colocaron 25, 50, 75 y 100% de la CME y posteriormente se volvieron a incubar por 48 h mas, haciendo mediciones de los tubos

germinativos al microscopio mediante un micrómetro (Aderiye y Ogundana., 1996).

CMI de los extractos activos en maíz en condiciones de almacén

Se colocaron 50 g de maíz previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 0.5% y secado a 45 °C por 8h en cajas de Petri de 15 x 100 mm; posteriormente se inoculó agregando 1 ml de una solución de conidias con una concentración de 1×10^7 y se les agregó un volumen de agua destilada estéril hasta completar 3 ml, inmediatamente después se les añadió el extracto comenzando desde el 75% CMI para PDA, aumentando y disminuyendo en proporciones de 1 mg/g de maíz.

Sé utilizó agua destilada estéril como control negativo y el positivo Hipoclorito de Sodio al 85%.

La CMI para el maíz fue definida de la misma forma que para medio de cultivo sólido.

Determinar el efecto de dosis subinhibitorias en el crecimiento del hongo en maíz en condiciones de almacén

Se colocó el 25, 50, 75 y 100% de la CMI para maíz, en cajas de Petri de 15 x 100 mm con 50 g de maíz previamente lavado y seco, inoculado como fue previamente descrito; inmediatamente después se incubaron a 28 °C por un período de 14 días en la obscuridad; cada 24 h se tomaban muestras de maíz y se analizaban para determinar aumento o reducción en la cantidad de crecimiento mediante la técnica de conteo en placa. La cual consistió en tomar muestras de

maíz y hacer diluciones seriadas de ellas, para después ser plaqueadas en cajas de Petri con PDA.

Efecto de dosis subinhibitorias en la producción de toxinas en maíz en condiciones de almacén

En cajas de Petri de 15 x 100 mm con 50 g de maíz inoculado como fue previamente descrito, se colocaron el 25, 50, 75 y 100 % de la CMI para maíz; inmediatamente después se incubaron a 28 °C por un período de 14 días en la oscuridad; terminado este tiempo se realizó la extracción para cada toxina.

Extracción de toxinas

Para el caso de las aflatoxinas se utilizó la metodología recomendada por la AOAC; en la que se colocaron 50 g de maíz en una licuadora en la cual se colocaron 100 ml de una solución de acetonitrilo:agua (9:1), se licuó la mezcla por 10 min y se dejó reposar por espacio de 3 h; una vez que pasó este tiempo se tomaron 2 ml y se prosiguió con la metodología antes descrita para la cuantificación de aflatoxinas (AOAC., 1995).

Para el ácido ciclopiazónico y ácido kójico, se tomaron 50 g de maíz y se licuaron con 100 ml de agua, posteriormente se filtró la mezcla y se continuó con la metodología de extracción y de cuantificación antes descrita.

Separación de los compuestos antifúngicos de los extractos.

Se prepararon placas de vidrio de 20 X 20 cm con sílica gel (Kieselgel 60 G marca Merck) al 30%. A un centímetro de la parte inferior de la placa se le colocó una muestra de cada extracto y se probaron diferentes sistemas de

eluentes tomando en cuenta los siguientes solventes: cloroformo metanol, acetona, benceno y butanol (Dominguez., 1988; Verastegui., 1995; Lozano., 1997).

Determinación de la banda activa

Esto se realizó por dos métodos diferentes: uno el raspado de las bandas y el segundo la autobiografía.

En el primer método las bandas separadas mediante cromatografía se rasparon y se resuspendieron en solvente. Posteriormente se decantó el solvente y se secó a 37 °C en un vidrio de reloj. Una vez seco se raspó y se resuspendió en etanol; después se colocó en pozos en placas de PDA como se ha explicado anteriormente y se determinó la actividad antifúngica (Verastegui., 1995; Lozano., 1997).

En el caso de la autobiografía, después de correr una cromatografía en capa fina del extracto, las placas se colocaron bajo luz ultravioleta para evitar contaminación, hasta que el solvente se evaporó totalmente. Posteriormente se agregaron 20 ml de PDA sobre la superficie y se dejó gelificar. Las cepas de *Aspergillus* se inocularon sobre el agar y se incubaron en una cámara húmeda por 3 - 5 días. La banda activa mostró una zona de inhibición sobre el agar (Hamburger y Cordell; 1987). A esta zona se le determinó el R_f y en otras placas se aisló la banda de esta zona para la purificación del compuesto activo.

Purificación del compuesto activo de *L. tridentata*

Para purificar el compuesto de la fracción activa se corrió una placa de cromatografía en capa fina, con cloroformo puro como eluyente. La muestra se

sometió a este procedimiento en cuatro ocasiones. Para finalizar, se raspó la banda, se resuspendió en cloroformo de nuevo y se filtró en papel Whatman No. 4. Posteriormente el filtrado se dejó secar en placas de vidrio. La muestra ya seca se guardó en viales a 4 °C en la obscuridad para posteriormente realizar pruebas químicas (Domínguez., 1988; Lozano., 1997).

Purificación del compuesto activo de *Yucca*

Con la fracción inhibitoria ya aislada se procedió a purificar el compuesto, de forma similar como para *L. tridentata*.

En este caso en particular se usó butanol como solvente eluente en las purificaciones y la muestra se guardó de la misma forma que para el compuesto de *L. tridentata* para posteriormente realizar pruebas químicas para determinar sus características químicas parciales (Domínguez., 1988; Lozano., 1997).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

Determinación de los extractos con actividad antifúngica

Se analizaron 33 extractos de las plantas. Se consideró positivos a aquellos que mostraron halos sin crecimiento alrededor del pozo (Fig. 1), o falta de crecimiento sobre la superficie de los discos de papel (Fig. 2). Los resultados de los extractos probados en este trabajo se encuentran reunidos en las Tablas 1 y 2. De los extractos se seleccionaron solo a dos de ellos por su fuerte actividad inhibitoria sobre todas la cepas, estos fueron el extracto macerado de *Y. rigida* y el aceite de *L. tridentata*.

Tabla 1.- Actividad de los extractos de plantas sobre las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Planta / Extracción	<i>Aspergillus flavus</i>						<i>Aspergillus parasiticus</i>			
	1059		1273		1299		Su-1		148	
	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel
<i>Y. camerosana</i>										
Macerado	0	-/0*	0	-/0	0	+/0	0	-/0	0	+/0
Bidestilación	12	+/0	8	+/0	0	-/0	0	-/0	15	-/0
Cloroformo	0	+/0	0	+/0	0	+/0	0	-/0	0	-/0
Precipitado Clorofórmico	11	-/0	13	-/0	10	-/0	13	-/0	10	-/0
Acido Clorhídrico	0	-/0	0	-/0	0	+/0	0	+/0	0	+/0
Hidróxido de Sodio	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0
<i>Y. filifera</i>										
Macerado	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0
Bidestilación	8	+/0	8	+/0	9	+/0	0	-/0	0	-/0
Cloroformo	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0
Precipitado Clorofórmico	0	-/0	10	+/0	11	+/0	0	-/0	0	-/0
Acido Clorhídrico	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0
Hidróxido de Sodio	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0	0	-/0

*: +: no crecimiento en la superficie del disco; -: crecimiento en la superficie del disco; Número: halo de inhibición en mm

Tabla 2.- Continuación de los resultados de los extractos de las plantas probadas sobre las cinco cepas de *Aspergillus*.

Planta / Extracción	<i>Aspergillus flavus</i>						<i>Aspergillus parasiticus</i>			
	1059		1273		1299		Su-1		148	
	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel
<i>Y. rigida</i>										
Macerado	28	+ / 15*	32	- / 12	35	- / 15	29	+ / 13	33	+ / 12
Bidestilación	0	+ / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Precipitado Clorofórmico	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Acido Clorhídrico	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	+ / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
<i>Y. stricta</i>										
Macerado	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Bidestilación	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Precipitado Clorofórmico	11	+ / 0	12	+ / 0	12	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Acido Clorhídrico	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
<i>Y. thopsoniana</i>										
Macerado	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Bidestilación	0	- / 0	0	- / 0	11	+ / 0	11	+ / 0	12	+ / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Precipitado Clorofórmico	13	+ / 0	13	+ / 0	0	- / 0	+ / 0	+ / 0	0	- / 0
Acido Clorhídrico	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
<i>Larrea tridentata</i>										
Aceite	36	+ / 20	39	+ / 18	41	+ / 19	35	+ / 15	38	+ / 15
Agua	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0
Agua:Glicerol	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0

*: +: no crecimiento en la superficie del disco; -: crecimiento en la superficie del disco; Número: halo de inhibición en mm.

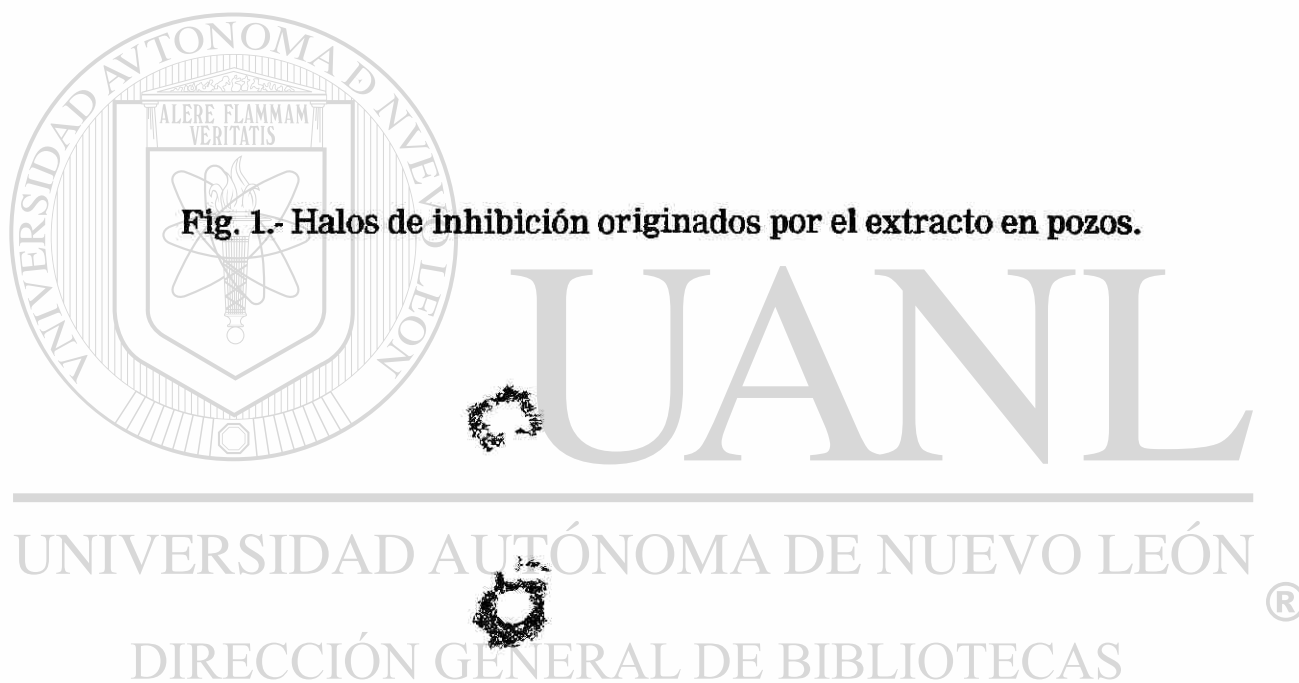


Fig 2.- Halos de inhibición originados por el extracto en discos de papel.

Determinación de la CMI

A los extractos activos seleccionados anteriormente, se les determinó la CMI del crecimiento en medio sólido (Czapek con agar; Figs 3 y 4) y en medio líquido (Caldo Czapek; Figs 4 y 5).

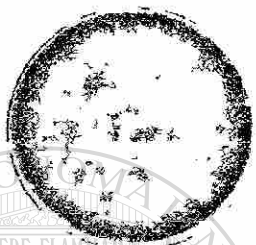


Fig 3.- CMI del crecimiento en medio Czapek con agar para *L. tridentata*

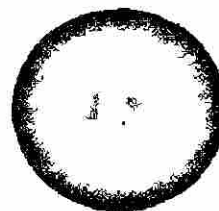


Fig 4.- CMI del crecimiento en medio Czapek con agar para *Y. rigida*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig 5.- CMI del crecimiento de *L. tridentata* medio Czapek.

Fig 6.- CMI del crecimiento en de *Y. rigida* en medio Czapek

El promedio de la CMI para todas las cepas de *Aspergillus* en el medio sólido para el extracto de *Larrea* fue de 32 mg/ml y de 32.6 mg/ml para el extracto de *Yucca*. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre de las CMIs de ambos extractos; además tampoco se encontraron diferencias significativas entre la inhibición en las cepas usadas (Tabla 3).

Aún así, se puede apreciar la cepa SRRC 1273 de *A. flavus*, presentó la CMI mas alta con ambos extractos y las CMIs mas bajas fueron presentadas por las cepas SRRC 148 y SRRC Su-1 de *A. parasiticus* para los extractos de *Larrea* y *Yucca* respectivamente.

Tabla 3.- CMI de los extractos con actividad antifúngica en medio Czapek con agar.

Cepas de <i>Aspergillus</i>	CMI del Extracto de <i>Larrea tridentata</i> (mg/ml)	CMI del Extracto de <i>Yucca rigida</i> (mg/ml)
<i>A. flavus</i> 1059	36 ± 1.2*	35 ± 1.5
<i>A. flavus</i> 1273	43 ± 1.0	35 ± 1.5
<i>A. flavus</i> 1299	29 ± 0.8	34 ± 0.7
<i>A. parasiticus</i> Su-1	27 ± 0.9	29 ± 1.0
<i>A. parasiticus</i> 148	25 ± 1.1	30 ± 1.0

*: Desviación Típica de la Media.

Por otro lado, en el medio líquido se encontró que el promedio de las CMI del extracto de *Larrea* era de 7.8 mg/ml y el de *Yucca* 28.6 mg/ml.

Como podemos apreciar en la tabla 4 para el extracto de *Larrea* la cepas con la CMI mas baja fueron la SRRC 1059 y la SRRC 1273 de *A. flavus*; además de la SRRC 148 de *A. parasiticus* en el extracto de *Yucca*.

La CMI mas alta encontrada fue en la cepa SRRC 1299 de *A. flavus* seguida de ambas cepas de *A. parasiticus* y posteriormente las cepas restantes de *A. flavus*.

Tabla 4.- CMI de los extractos con actividad antifúngica en Caldo Czapek.

Cepas de <i>Aspergillus</i>	CMI del Extracto de <i>Larrea tridentata</i> (mg/ml)	CMI del Extracto de <i>Yucca rigida</i> (mg/ml)
<i>A. flavus</i> 1059	8 ± 0.5*	31 ± 1.0
<i>A. flavus</i> 1273	8 ± 0.5	26 ± 1.0
<i>A. flavus</i> 1299	10 ± 1.1	26 ± 0.8
<i>A. parasiticus</i> Su-1	7 ± 1.2	30 ± 1.1
<i>A. parasiticus</i> 148	6 ± 0.8	30 ± 1.2

*: Desviación Típica de la Media.

En este caso se encontró que no existen diferencias significativas ($P= 0.05$) en las CMI entre las cepas probadas. Sin embargo se encontraron diferencias significativas ($P= 0.05$) entre ambos medios pero solo en el caso del extracto de gobernadora con una ($P= 0.05$).

Efecto de mezclas de los extractos

Se realizaron mezclas de los extractos crudos de ambas plantas, sin embargo, no se encontraron reducciones en las CMI al compararlas con los extractos por separado en el medio Czapek. De forma contraria, la mayoría de las mezclas mostraron CMI ligeramente mayores a las obtenidas anteriormente (Tabla 5). Aunque el análisis estadístico realizado no mostró diferencia significativa ($P= 0.05$) al compararse con las CMI obtenidas anteriormente por los extractos por separado.

Tabla 5.- CMI de las mezclas de los extractos probadas contra las diferentes cepas de *Aspergillus*.

<i>Y. rigida</i> / <i>L. tridentata</i>	<i>A. flavus</i> 1059	<i>A. flavus</i> 1273	<i>A. flavus</i> 1299	<i>A. parasiticus</i> Su-1	<i>A. parasiticus</i> 148
	mg/ml				
1:1	9 ± 0.5*	11 ± 0.4	11 ± 1.0	8 ± 1.1	7 ± 0.9
1:2	10 ± 1.0	14 ± 0.4	12 ± 1.1	7 ± 1.0	8 ± 0.4
1:3	12 ± 0.8	15 ± 1.0	14 ± 0.9	12 ± 0.8	9 ± 0.5
1:4	11 ± 0.7	12 ± 0.4	11 ± 0.5	10 ± 1.2	9 ± 0.7
1:5	9 ± 1.3	11 ± 0.7	13 ± 0.4	12 ± 1.4	8 ± 0.9
1:6	9 ± 1.1	10 ± 0.9	11 ± 0.6	9 ± 1.0	10 ± 1.0
1:7	10 ± 1.0	17 ± 1.1	10 ± 1.0	11 ± 0.9	11 ± 0.5
1:8	10 ± 0.7	11 ± 1.0	11 ± 1.1	10 ± 0.7	9 ± 0.7
1:9	13 ± 0.6	9 ± 0.7	14 ± 1.0	12 ± 1.0	8 ± 0.9
<i>L. tridentata</i> / <i>Y. rigida</i>					
1:1	14 ± 0.9	11 ± 0.6	10 ± 1.0	10 ± 1.2	7 ± 0.7
1:2	11 ± 0.5	10 ± 1.0	12 ± 0.8	10 ± 1.4	9 ± 0.9
1:3	9 ± 0.5	11 ± 1.1	11 ± 0.7	11 ± 1.0	10 ± 1.0
1:4	10 ± 1.0	14 ± 1.0	11 ± 0.6	11 ± 0.9	8 ± 1.1
1:5	12 ± 0.8	11 ± 0.4	10 ± 1.0	14 ± 0.4	7 ± 1.0
1:6	11 ± 0.7	14 ± 0.4	11 ± 1.1	9 ± 0.5	9 ± 0.8
1:7	9 ± 1.3	15 ± 1.0	14 ± 1.0	7 ± 0.7	9 ± 0.8
1:8	17 ± 1.1	12 ± 0.4	10 ± 0.7	13 ± 1.4	10 ± 1.2
1:9	11 ± 1.0	11 ± 0.7	12 ± 1.0	9 ± 1.0	8 ± 1.4

*: Desviación Típica de la Media.

Efecto en el crecimiento del hongo

En este caso se utilizaron el 25, 50 y 75% de la CMI del crecimiento en medio sólido, se midió el diámetro y se observó la morfología de colonia a nivel microscópico.

El extracto de *Larrea* afectó de forma apreciable el diámetro de colonia pero solo en las concentraciones del 50 y 75 % de la CMI. La concentración mas baja no mostró un efecto inhibitorio del crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6.- Efecto del extracto de *Larrea* sobre el diámetro de colonia de cepas de *Aspergillus*.

Extracto de <i>L. tridentata</i>	Diámetro de colonia (mm)				
	<i>A. flavus</i> 1059	<i>A. flavus</i> 1273	<i>A. flavus</i> 1299	<i>A. parasiticus</i> Su-1	<i>A. parasiticus</i> 148
Control	120 ± 8*	112 ± 10	115 ± 9	115 ± 5	115 ± 7
25 % de la CMI	114 ± 5	106 ± 9	110 ± 3	103 ± 9	111 ± 3
50 % de la CMI	99 ± 6	80 ± 3	87 ± 5	92 ± 7	88 ± 3
75 % de la CMI	30 ± 7	22 ± 8	27 ± 6	37 ± 5	34 ± 4

*: Desviación típica de la media

Este extracto, en las concentraciones de 50 y 75 % indujo un cambio en la morfología macroscópica colonial, ya que se perdía la forma característica de la colonia con el micelio de color blanquecino y sin la aparición de conidias (Figs 7, 8, 9 y 10).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Fig. 7 Control de crecimiento de *Aspergillus*.

Fig. 8.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

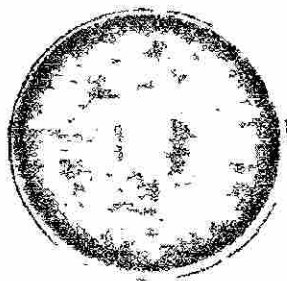


Fig. 9 Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

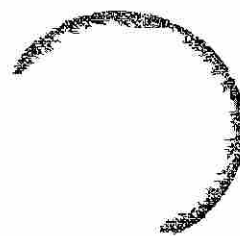


Fig. 10.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

Las observaciones en microscopía de luz, el extracto de *Larrea* generó alteraciones en la estructura morfológica con malformaciones de las hifas, así como también reducción en el número de conidias, además de que las cabezas conidiales se observaron con un número menor de cadenas y esporas (Figs. 11, 12, 13 y 14). Estos efectos pudieron ser apreciados en menor o mayor grado en todas las cepas de *Aspergillus* probadas. Sin embargo, se observó que las cepas de *A. flavus* presentaron mayor proporción de estos defectos que las de *A. parasiticus*.



Fig. 11.- Crecimiento control de *A. flavus* a 40 X.



Fig. 12.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.



Fig. 13.- Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X

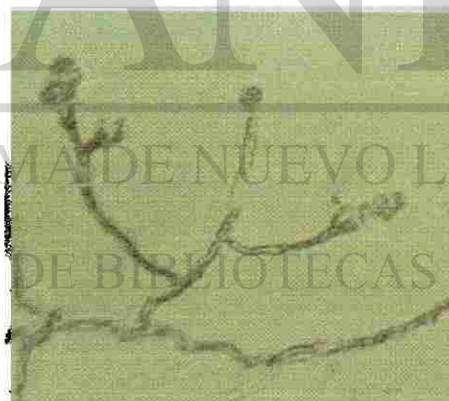


Fig. 14.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

En el microscopio electrónico se apreciaron las alteraciones morfológicas y efectos como reducción en el número y longitud de las cadenas en las cabezas aspergiláres (Figs. 15, 16, 17 y 18).



Fig. 15.- Fotografía al microscopio electrónico del crecimiento control de *A. flavus* a 4000 X.



Fig. 16.- Fotografía al microscopio electrónico del efecto del 25 % de la CMI sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.



Fig. 17.- Fotografía al microscopio electrónico del efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

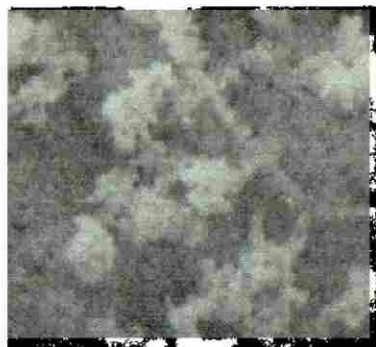


Fig. 18.- Fotografía al microscopio electrónico del efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

De manera similar, el extracto de *Yucca* redujo el diámetro de la colonia en las concentraciones mas altas probadas (50 y 75 % de la CMI). Sin embargo, estos cambios no fueron tan notorios como los presentados con el extracto de *Larrea*. Los resultados completos de este experimento se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7.- Efecto del extracto de *Yucca* sobre el diámetro de colonia de cepas de *Aspergillus*.

Cepas Usadas	Diámetro de colonia (mm)				
	Control	25 % de la CMI	50 % de la CMI	75 % de la CMI	100 % de la CMI
<i>A. flavus</i> 1059	120 ± 8*	117 ± 3	110 ± 2	35 ± 5	0
<i>A. flavus</i> 1273	112 ± 10	106 ± 3	94 ± 6	33 ± 7	0
<i>A. flavus</i> 1299	115 ± 9	110 ± 3	89 ± 5	36 ± 3	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1	115 ± 5	108 ± 2	95 ± 4	36 ± 5	0
<i>A. parasiticus</i> 148	115 ± 7	110 ± 3	90 ± 5	30 ± 3	0

*: Desviación típica de la media.

A simple vista, la morfología colonial de las cepas no fue afectada por ninguna de las concentraciones probadas de manera clara, como se observa en las figuras 19, 20, 21 y 22.

Fig. 19.- Control de crecimiento de *Aspergillus*.

Fig. 20.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

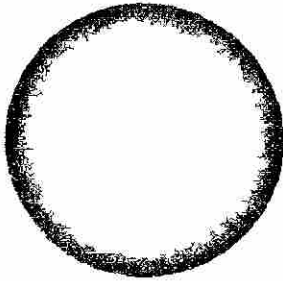


Fig. 21 Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

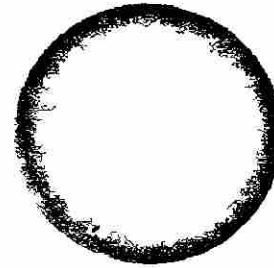


Fig. 22.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

La observación en el microscopio de luz, mostró alteraciones en la estructura morfológica con malformaciones de las hifas, así como también reducción en el número de conidias, además de que las cabezas conidiales se observaron con un número menor de cadenas y esporas. Tal como se aprecia en las figuras 23, 24, 25 y 26.



Fig. 23.- Crecimiento control de *A. flavus* a 40 X.



Fig. 24.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.



Fig. 25.- Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.



Fig. 26.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

En el microscopio electrónico se apreciaron las alteraciones morfológicas y efectos como reducción en el número y longitud de las cadenas en las cabezas aspergílares (Figs. 27, 28, 29 y 30).



Fig. 27.- Crecimiento control de *A. flavus* a 4000 X.



Fig. 28.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.



Fig. 29.- Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

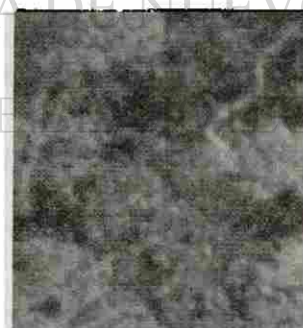


Fig. 30.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

Efecto sobre la producción de toxinas

El crecimiento del hongo no fue afectado de manera significativa por el extracto de *L. tridentata* en medio líquido en las concentraciones del 25, 50 y 75 % de la CMI. Solo se observaron reducciones de un 25 - 35 % del crecimiento en las concentraciones mas altas probadas en todas las cepas (Tabla 8). El análisis de varianza mostró que era similar el efecto del extracto sobre las cepas probadas y entre las especies.

Tabla 8.- Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Larrea* sobre el crecimiento del hongo en caldo Czapek.

Cepas Usadas	Peso Seco del Hongo mg / 25 ml				
	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059	349 ± 6*	293 ± 5	287 ± 6	261 ± 6	0
<i>A. flavus</i> 1273	299 ± 8	285 ± 7	275 ± 5	244 ± 5	0
<i>A. flavus</i> 1299	288 ± 3	279 ± 2	250 ± 3	233 ± 4	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1	282 ± 8	273 ± 4	245 ± 4	230 ± 7	0
<i>A. parasiticus</i> 148	280 ± 2	272 ± 3	238 ± 6	222 ± 2	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Por otra parte, el crecimiento tampoco fue inhibido de forma importante por el extracto de *Y. rigida*, solo se observó una inhibición de un 25- 30 % en comparación con el control en las concentraciones de 50 y 75 % (Tabla 9). Igual al extracto de *L. tridentata*, no se observaron diferencias significativas (P=0.05) entre las reducciones de crecimiento en las cepas en las concentraciones usadas.

Tabla 9.- Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Yucca rigida* sobre el crecimiento del hongo en caldo Czapek.

Cepas Usadas	Peso Seco del Hongo mg / 25 ml				
	Control	Porcentaje de la CMI			
		25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059	349 ± 6*	290 ± 5	277 ± 6	258 ± 6	0
<i>A. flavus</i> 1273	299 ± 8	279 ± 7	266 ± 5	242 ± 5	0
<i>A. flavus</i> 1299	288 ± 3	282 ± 2	244 ± 3	230 ± 4	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1	282 ± 8	270 ± 4	239 ± 4	220 ± 7	0
<i>A. parasiticus</i> 148	280 ± 2	268 ± 3	235 ± 6	218 ± 2	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El análisis estadístico de ambos extractos por grupos, no reveló diferencias de efectividad en los porcentajes de la CMI.

Producción de Aflatoxinas

En el caso del extracto de *L. tridentata* se observó una fuerte inhibición de la producción de aflatoxinas. Aún en la concentración mas baja (25% de la CMI) la inhibición fue de hasta un 79 % y en las concentraciones de 50 y 75 % de la CMI de hasta un 98% (Tabla 10).

Se observaron diferencias significativas entre la efectividad de las concentraciones usadas en especial entre el control y la concentración del 100 % de la CMI en todos los casos con una $P = 0.05$. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el efecto de las diferentes concentraciones y las diferentes especies.

Tabla 10.- Efecto del extracto de *L. tridentata* sobre la producción de aflatoxinas en caldo Czapek.

Cepas Usadas	Concentración de aflatoxina ng /ml				
	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059					
Aflatoxina B ₁	4.1 ± 0.3*	0.9 ± 0.08	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0
Aflatoxina B ₂	2.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.1 ± 0.008	0
<i>A. flavus</i> 1273					
Aflatoxina B ₁	3.9 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0
Aflatoxina B ₂	2.5 ± 0.1	0.6 ± 0.04	0.2 ± 0.02	0.01 ± 0.008	0
<i>A. flavus</i> 1299					
Aflatoxina B ₁	3.7 ± 0.2	1.5 ± 0.04	0.4 ± 0.08	0.3 ± 0.008	0
Aflatoxina B ₂	2.5 ± 0.08	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.04	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1					
Aflatoxina B ₁	4.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	0.1 ± 0.08	0.4 ± 0.04	0
Aflatoxina B ₂	2.8 ± 0.1	2.1 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0
Aflatoxina G ₁	4.1 ± 0.2	2.7 ± 0.04	2.7 ± 0.2	0.5 ± 0.04	0
Aflatoxina G ₂	2.91 ± 0.04	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0
<i>A. parasiticus</i> 148					
Aflatoxina B ₁	4.9 ± 0.3	3.3 ± 0.2	0.9 ± 0.04	0.3 ± 0.004	0
Aflatoxina B ₂	3.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0
Aflatoxina G ₁	5.7 ± 0.04	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.004	0.4 ± 0.1	0
Aflatoxina G ₂	5.3 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.5 ± 0.08	0.3 ± 0.2	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El extracto de *Y. rigida* presentó un efecto inhibitorio mas fuerte que el de *L. tridentata*. En este caso, la concentración del 25 % de la CMI redujo la cantidad de aflatoxinas en un 90 %. De forma similar las demás concentraciones redujeron la producción de aflatoxinas hasta en un 98 % (Tabla 11). En este caso, no se observaron diferencias significativas entre las cepas con una P = 0.05, pero si en la efectividad entre las concentraciones usadas al ser comparadas con el control y la concentración del 100 % de la CMI.

Tabla 11.- Efecto del extracto de *Y. rigida* sobre la producción de aflatoxinas en caldo Czapek.

Cepas Usadas	Concentración de aflatoxina ng / 25 ml				
	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059					
Aflatoxina B ₁	4.1 ± 0.3*	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0
Aflatoxina B ₂	2.3 ± 0.1	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.008	0
<i>A. flavus</i> 1273					
Aflatoxina B ₁	3.9 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0
Aflatoxina B ₂	2.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.008	0.05 ± 0.02	0
<i>A. flavus</i> 1299					
Aflatoxina B ₁	3.7 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.04	0
Aflatoxina B ₂	2.5 ± 0.08	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.08 ± 0.004	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1					
Aflatoxina B ₁	4.0 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0
Aflatoxina B ₂	2.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0
Aflatoxina G ₁	4.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0
Aflatoxina G ₂	2.9 ± 0.04	1.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0
<i>A. parasiticus</i> 148					
Aflatoxina B ₁	4.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0
Aflatoxina B ₂	3.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.004	0
Aflatoxina G ₁	4.5 ± 0.1	1.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.004	0
Aflatoxina G ₂	5.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.06 ± 0.001	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El análisis estadístico de ambos extractos por grupos, no reveló ninguna diferencia entre ellos con la misma probabilidad anterior.

Producción de Acido Ciclopiazónico

Se realizaron ensayos preliminares para determinar cual de las cepas era capaz de producir esta toxina y se observó que solo la cepa de *A. flavus* SRRC 1299 producía esta toxina en cantidades detectables, como se observa en la tabla 12, donde ese comparan las cepas y la producción de sus toxinas.

Tabla 12.- Evaluación de la producción de ácido ciclopiazónico de cepas de *Aspergillus*.

Cepas Usadas	Producción de Acido Ciclopiazónico
<i>A. flavus</i> 1059	ND*
<i>A. flavus</i> 1273	ND
<i>A. flavus</i> 1299	+
<i>A. parasiticus</i> Su-1	ND
<i>A. parasiticus</i> 148	ND

*.- + Presencia de la toxina.

ND No Detectada.

Una vez determinado que la cepa SRRC 1299 de *A. flavus* era capaz de producir esta toxina se procedió a la determinación del efecto de los extractos en la producción de CPA.

Para el caso del extracto de *L. tridentata* se observaron reducciones significativas en la producción de esta micotoxina que van desde el 69 % en la concentración mas baja del extracto hasta el 92.8 % en la mas alta, de forma similar a lo que sucedió con las aflatoxinas, el crecimiento no se vio afectado de manera significativa. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas y el control.

El extracto de *Y. rigida* no fue tan potente como el de *L. tridentata* sin embargo también en este se encontraron reducciones significativas que van desde un 40 % hasta un 79 % dependiendo de la concentración de extracto analizada, cabe mencionar que el crecimiento no fue afectado por el extracto. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas con el control.

De igual manera al anterior el análisis estadístico no reveló diferencias significativas ($P=0.05$) entre los extractos probados.

Producción de Acido Kójico

Se realizaron pruebas preliminares para determinar cual de las cepas era capaz de producir el ácido kójico. Estas pruebas dieron como resultado que la única cepa capaz de producir cantidades detectables de AK era la SRRC 1299 de *A. flavus* (Tabla 13).

Tabla 13.- Evaluación de la producción de AK de cepas de *Aspergillus*.

Cepas Usadas	Producción de Acido Kójico
<i>A. flavus</i> 1059	ND*
<i>A. flavus</i> 1273	ND
<i>A. flavus</i> 1299	+
<i>A. parasiticus</i> Su-1	ND
<i>A. parasiticus</i> 148	ND

*.- + Presencia de la toxina.

ND No detectada.

Después se procedió a realizar los experimentos para determinar el efecto de los extractos en la producción de AK. El extracto de *L. tridentata*, inhibió fuertemente la producción de esta toxina. Se observó que el 25 % de la CMI inhibía en un 35 % la producción de AK y que las concentraciones superiores lo hacían hasta en un 91 %, en comparación con el control. El análisis estadístico mostró claras diferencias ($P=0.05$) entre la efectividad de las concentraciones de extracto usadas.

Por otro lado el extracto de *Y. rigida* presentó una inhibición mas fuerte en la producción de esta toxina que el extracto de *L. tridentata* siendo de 56 % en la concentración mas baja y de hasta 95 % en la mas alta. El análisis estadístico reveló que existían diferencias significativas ($P=0.05$) entre las concentraciones usadas y el control; mientras que no había diferencias entre los extractos probados ($P=0.05$).

Determinación de la Concentración Mínima Esporicida (CME)

De los muestreos realizados se observó que en el extracto de gobernadora presentaba una actividad esporicida que aumentaba a razón de tiempo, es decir entre mas tiempo se dejaba en contacto la solución de conidias con este extracto se veía un aumento en la actividad inhibitoria; este se refleja en la tabla 14.

El estudio estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre las cepas probadas de una u otra especie.

Tabla 14.- Concentración del extracto de *L. tridentata* que inactiva conidias de *Aspergillus* a diferentes tiempos.

Cepas Usadas	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Aspergillus flavus</i> 1059	45 ± 4*	39 ± 5	33 ± 4	25 ± 2	22 ± 1	20 ± 4	20 ± 3
<i>Aspergillus flavus</i> 1273	48 ± 3	38 ± 5	26 ± 2	20 ± 5	18 ± 4	15 ± 3	15 ± 4
<i>Aspergillus flavus</i> 1299	44 ± 5	34 ± 1	25 ± 5	21 ± 4	16 ± 3	16 ± 5	16 ± 2
<i>Aspergillus parasiticus</i> Su-1	45 ± 2	36 ± 4	24 ± 4	19 ± 3	19 ± 5	19 ± 4	19 ± 4
<i>Aspergillus parasiticus</i> 148	43 ± 5	30 ± 2	26 ± 3	20 ± 1	20 ± 2	20 ± 1	20 ± 5

*: mg/ml. Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El extracto de *Y. rigida*, por su parte, mostró mas estabilidad en la CME, es decir, se observó que la CME inicial fue muy similar a la CME al final del experimento (Tabla 15); además, también se observó que inactivó las esporas en menos tiempo que el extracto *L. tridentata*. Se observó que las esporas de las cepas de *A. flavus* fueron mas susceptibles al extracto que las de *A. parasiticus*.

Las pruebas estadísticas mostraron diferencias significativas ($P=0.05$) entre las CMEs de los microorganismos probados. En cuanto a los extractos no se observaron diferencias significativas entre ellos bajo las condiciones probadas con una $P=0.05$.

Tabla 15.- Concentración del extracto de *Y. rigida* que inactiva conidias de *Aspergillus* a diferentes tiempos.

Cepas Usadas	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Aspergillus flavus</i> 1059	42 ± 4*	40 ± 5	35 ± 4	35 ± 3	35 ± 1	35 ± 2	35 ± 4
<i>Aspergillus flavus</i> 1273	36 ± 3	34 ± 5	30 ± 3	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 5	30 ± 2
<i>Aspergillus flavus</i> 1299	35 ± 5	32 ± 1	28 ± 5	28 ± 2	28 ± 3	28 ± 4	28 ± 5
<i>Aspergillus parasiticus</i> Su-1	30 ± 2	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 5	30 ± 3	30 ± 4
<i>Aspergillus parasiticus</i> 148	35 ± 5	35 ± 2	35 ± 1	35 ± 5	35 ± 2	35 ± 1	35 ± 3

*: mg/ml. Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Actividad sobre la germinación de las esporas

Se determinó que los extractos de ambas plantas presentaban inhibición de la germinación de esporas de *Aspergillus*.

Para algunas concentraciones de los extractos de *L. tridentata* se observó que se requerían hasta 48 h para observar una disminución significativa. A las 24 h se observó que los porcentajes de germinación eran mas altos que los del control en las concentraciones mas bajas (25% de la CME). Sin embargo, a las 48 h estos valores se reducían en comparación con el control. Podemos apreciar que las concentraciones de 50 y 75 % de la CME inhibían la germinación al compararlas con el control, tal como se aprecia claramente en la tabla 16.

Estadísticamente existieron diferencias significativas ($P=0.05$) entre la efectividad de las concentraciones probadas. De forma similar se han encontrado diferencias significativas ($P=0.05$) entre los días de muestreo en cada cepa estudiada.

Tabla 16.- Porcentaje de germinación de cepas de *Aspergillus* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *L. tridentata*.

Cepas Usadas	24 h de Incubación				48 h de Incubación			
	Porcentaje de la CME				Porcentaje de la CME			
	0 %	25 %	50 %	75 %	0 %	25 %	50 %	75 %
<i>A. flavus</i> 1059	81 ± 1*	92 ± 2	81 ± 3	22 ± 1	100	100	80 ± 1	33 ± 3
<i>A. flavus</i> 1273	86 ± 3	90 ± 2	80 ± 1	14 ± 2	100	94 ± 2	77 ± 3	20 ± 2
<i>A. flavus</i> 1299	74 ± 4	87 ± 1	74 ± 2	18 ± 3	100	87 ± 3	76 ± 2	17 ± 2
<i>A. parasiticus</i> Su-1	65 ± 2	91 ± 2	61 ± 2	26 ± 1	100	94 ± 2	64 ± 3	31 ± 3
<i>A. parasiticus</i> 148	90 ± 1	94 ± 3	81 ± 1	17 ± 2	100	97 ± 2	80 ± 2	19 ± 1

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Por su parte los extractos de *Y. rigida* presentaron una inhibición importante de la germinación desde un principio y la mantuvieron durante las 48 h del experimento. En las concentraciones mayores este extracto logró reducir casi totalmente la aparición de tubos germinativos de las esporas durante el período de análisis (Tabla 17).

El análisis estadístico realizado mostró que existían diferencias significativas ($P=0.05$) entre la efectividad de las concentraciones probadas con respecto a el control, pero no entre los días de prueba.

Tabla 17.- Porcentaje de germinación de cepas de *Aspergillus* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *Y. rigida*.

Cepas Usadas	24 h de Incubación				48 h de Incubación			
	Porcentaje de la CME				Porcentaje de la CME			
	0 %	25 %	50 %	75 %	0 %	25 %	50 %	75 %
<i>A. flavus</i> 1059	97 ± 2*	25 ± 4	16 ± 4	12 ± 1	100	51 ± 1	15 ± 1	15 ± 3
<i>A. flavus</i> 1273	95 ± 1	50 ± 2	14 ± 1	1 ± 0.2	100	51 ± 4	14 ± 4	3 ± 1
<i>A. flavus</i> 1299	95 ± 3	50 ± 1	15 ± 2	1 ± 0.3	100	56 ± 2	15 ± 1	2 ± 1
<i>A. parasiticus</i> Su-1	93 ± 1	54 ± 4	51 ± 4	23 ± 1	100	68 ± 2	51 ± 3	27 ± 4
<i>A. parasiticus</i> 148	92 ± 2	60 ± 2	62 ± 1	37 ± 4	100	61 ± 4	62 ± 2	36 ± 2

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

En forma general, el análisis estadístico realizado mostró que existían diferencias significativas ($P=0.05$) entre los dos extractos en cualquiera de los días de prueba del experimento con una probabilidad de 0.05%

Efecto sobre tubo germinativo:

El extracto de gobernadora presentó una inhibición del crecimiento del tubo germinativo que era fácilmente observada, esta se presentaba desde el 25 % de la CMI con reducciones de hasta un 25 % en el crecimiento en comparación con el control, además, la concentración del 75 % mostró una reducción de hasta 75 % del crecimiento de este proceso; el 100 % de la CMI no permitió el crecimiento del tubo germinativo al estar en contacto con las cepas probadas; estos resultados se muestran en la tabla 18.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P=0.05$) entre las concentraciones de extracto al ser comparados con el control, sin embargo este análisis no reveló ninguna diferencia ($P=0.05$) entre las cepas, ni las especies del hongo probadas.

Tabla 18.- Porcentaje de reducción del crecimiento de tubo germinativo de *Aspergillus* por extractos de *L. tridentata*.

Cepas Usadas	Porcentaje de Reducción del Crecimiento del Tubo Germinativo				
	Control	Porcentaje de la CMI			
		25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059	0	12 ± 2*	36 ± 1	72 ± 1	100
<i>A. flavus</i> 1273	0	12 ± 1	60 ± 2	65 ± 1	100
<i>A. flavus</i> 1299	0	25 ± 2	42 ± 1	67 ± 2	100
<i>A. parasiticus</i> Su-1	0	13 ± 1	56 ± 1	75 ± 1	100
<i>A. parasiticus</i> 148	0	17 ± 1	50 ± 2	65 ± 1	100

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

De forma similar el extracto de *Y. rigida* presentó una inhibición sobre este proceso. Esta inhibición fue desde un 37 % en la concentración del 25% de la CMI hasta un 77 % en la concentración de 75 % de la CMI (Tabla 19).

Los resultados demostraron diferencias significativas ($P > 0.05$ %) entre las concentraciones probadas del extracto y el control , sin embargo, no se encontraron diferencias ($P = 0.05$) entre las cepas de *Aspergillus* en ninguna de las concentraciones de extracto.

Tabla 19.- Porcentaje de reducción del crecimiento de tubo germinativo de *Aspergillus* por extractos de *Y. rigida*.

Cepas Usadas	Porcentaje de Reducción del Crecimiento del Tubo Germinativo				
	Control	Porcentaje de la CMI			
		25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059	0	18 ± 1*	36 ± 2	73 ± 1	100
<i>A. flavus</i> 1273	0	18 ± 1	41 ± 2	47 ± 2	100
<i>A. flavus</i> 1299	0	17 ± 2	25 ± 2	75 ± 2	100
<i>A. parasiticus</i> Su-1	0	38 ± 2	50 ± 1	81 ± 1	100
<i>A. parasiticus</i> 148	0	34 ± 1	44 ± 2	78 ± 1	100

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El análisis estadístico final entre los dos extractos no mostró diferencias significativas ($P = 0.05$) entre ellos bajo las condiciones usadas para este experimento.

CMI de los extractos activos contra *Aspergillus* cultivado en maíz en condiciones de almacén

Se tomaron como base las CMIs encontradas para medio sólido, se observó que la CMI para maíz era similar a la encontrada en medio sólido. Cabe mencionar que las cepas de *A. flavus* presentaron una CMI mayor que las cepas de *A. parasiticus*, como ya se había visto en el medio Czapek sólido (Tabla 24). De forma similar a la CMI en medio sólido, no se encontraron diferencias significativas ($P=0.05$) entre los extractos, ni tampoco, entre las cepas estudiadas, aun cuando estas fueron agrupadas por especies.

Tabla 20.- CMI de los extractos de *L. tridentata* y *Y. rigida* sobre *Aspergillus* cultivado en maíz.

Cepas Usadas	<i>L. tridentata</i> (mg/ml)	<i>Y. rigida</i> (mg/ml)
<i>Aspergillus flavus</i> 1059	36 ± 1.1*	35 ± 1.3
<i>Aspergillus flavus</i> 1273	43 ± 0.9	35 ± 1.3
<i>Aspergillus flavus</i> 1299	29 ± 1.0	34 ± 1.0
<i>Aspergillus parasiticus</i> Su-1	27 ± 1.2	29 ± 0.9
<i>Aspergillus parasiticus</i> 148	25 ± 1.1	30 ± 1.0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Efectos de extractos de plantas en el crecimiento del hongo en maíz en condiciones de almacén

En este caso se observó que los extractos de ambas plantas no presentaron una reducción significativa ($P=0.05$) del crecimiento en las cepas probadas en las condiciones antes mencionadas (Figs 31 - 35).

Se observó que la cepa mas resistente a ambos extractos fue la SRRC Su-1 de *A. parasiticus* mientras que la mas sensible fue la SRRC 1059 de *A. flavus*. Sin embargo, el análisis estadístico de todas las cepas no mostró ninguna diferencia significativa de crecimiento al agruparlas por especies, además tampoco se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones subinhibitorias de cada extracto usado.



Fig 31.- Cultivo control de maíz contaminado con *Aspergillus*



Fig 32.- Efecto del 25 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz.

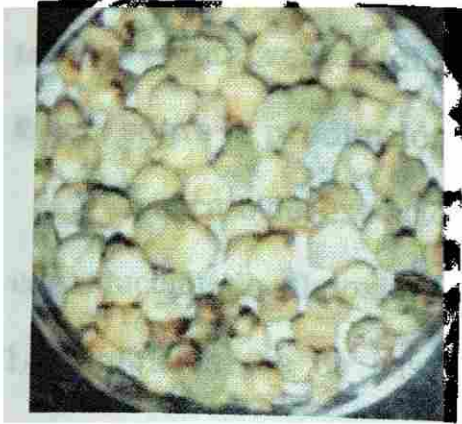


Fig 33.- Efecto del 50 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz



Fig 34.- Efecto del 75 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz.



Fig 35.- Efecto del 100 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ALERE FLAMMAM
VERITATIS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Efecto de dosis subinhibitorias del crecimiento en la producción de toxinas en maíz en condiciones de almacén

Efecto sobre la producción Aflatoxinas

En el caso del extracto de *L. tridentata* se observó una fuerte inhibición de la producción de aflatoxinas, aun en la concentración mas baja (25% de la CMI). La inhibición fue de hasta un 84 %. En las concentraciones de 75 % la disminución fue de hasta un 97% (Tabla 21). No se observaron diferencias significativas ($P=0.05$) entre las concentraciones en cuanto a la producción de aflatoxinas pero si con el control y el 100 % de la CMI. Este comportamiento fue similar para todas las cepas. Aunque, las cepas de *A. parasiticus* presentaron niveles mas bajos de la producción de aflatoxinas en los tratamientos.

La producción de aflatoxinas B fue mas fuertemente inhibida al compararla con las aflatoxinas G.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 21.- Efecto del extracto de *L. tridentata* sobre la producción de aflatoxinas en maíz bajo condiciones de almacén.

Cepas Usadas	Control	Porcentaje de la CMI			
		25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059					
Aflatoxina B ₁	20.2 ± 0.08* ¹	6.6 ± 0.06	5.9 ± 0.1	3.9 ± 0.08	0
Aflatoxina B ₂	11.4 ± 0.06	2.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0
<i>A. flavus</i> 1273					
Aflatoxina B ₁	27.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.0 ± 0.08	1.1 ± 0.08	0
Aflatoxina B ₂	15.0 ± 0.06	4.5 ± 0.02	3.2 ± 0.1	1.1 ± 0.01	0
<i>A. flavus</i> 1299					
Aflatoxina B ₁	35.6 ± 0.1	7.7 ± 0.02	4.4 ± 0.04	1.9 ± 0.04	0
Aflatoxina B ₂	13.4 ± 0.04	5.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.0 ± 0.02	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1					
Aflatoxina B ₁	32.3 ± 0.1	7.4 ± 0.08	1.8 ± 0.04	1.0 ± 0.08	0
Aflatoxina B ₂	5.7 ± 0.06	3.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0
Aflatoxina G ₁	28.6 ± 0.01	4.0 ± 0.02	1.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0
Aflatoxina G ₂	3.4 ± 0.02	2.1 ± 0.06	1.4 ± 0.08	0.4 ± 0.1	0
<i>A. parasiticus</i> 148					
Aflatoxina B ₁	31.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	3.5 ± 0.02	1.0 ± 0.02	0
Aflatoxina B ₂	4.8 ± 0.06	2.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.6 ± 0.06	0
Aflatoxina G ₁	27.3 ± 0.02	3.5 ± 0.1	1.8 ± 0.02	0.3 ± 0.08	0
Aflatoxina G ₂	2.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0.1	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

1: ng/g maíz

El extracto de *Y. rigida* presentó un efecto ligeramente mas fuerte que el de *L. tridentata*. En este caso, la concentración del 25 % de la CMI redujo la concentración de las aflatoxinas hasta en 85 %. De forma similar las demás concentraciones redujeron la producción de aflatoxinas hasta en un 96 % (Tabla 22).

En este caso, no se observaron diferencias significativas ($P=0.05$) entre las cepas. De forma similar al anterior, la producción de aflatoxinas B fue mas inhibida que las aflatoxinas G (Tabla 22).

Tabla 22.- Efecto del extracto de *Y. rigida* sobre la producción de aflatoxinas en maíz bajo condiciones de almacén.

Cepas Usadas	Control	Porcentaje de la CMI			
		25 %	50 %	75 %	100 %
<i>A. flavus</i> 1059					
Aflatoxina B ₁	26.6 ± 0.1* ¹	8.6 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0
Aflatoxina B ₂	7.1 ± 0.08	6.8 ± 0.02	3.9 ± 0.001	1.3 ± 0.004	0
<i>A. flavus</i> 1273					
Aflatoxina B ₁	31.9 ± 0.1	8.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1.3 ± 0.08	0
Aflatoxina B ₂	9.2 ± 0.06	6.2 ± 0.08	2.8 ± 0.04	1.3 ± 0.001	0
<i>A. flavus</i> 1299					
Aflatoxina B ₁	37.8 ± 0.1	6.5 ± 0.1	2.4 ± 0.08	1.0 ± 0.02	0
Aflatoxina B ₂	9.2 ± 0.02	4.4 ± 0.1	2.2 ± 0.06	1.5 ± 0.02	0
<i>A. parasiticus</i> Su-1					
Aflatoxina B ₁	24.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0
Aflatoxina B ₂	7.4 ± 0.08	4.6 ± 0.02	2.7 ± 0.1	1.3 ± 0.06	0
Aflatoxina G ₁	22.0 ± 0.06	9.2 ± 0.04	4.6 ± 0.1	1.9 ± 0.08	0
Aflatoxina G ₂	4.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0
<i>A. parasiticus</i> 148					
Aflatoxina B ₁	44.2 ± 0.1	6.5 ± 0.08	4.2 ± 0.06	1.8 ± 0.1	0
Aflatoxina B ₂	6.5 ± 0.06	2.5 ± 0.08	2.2 ± 0.08	1.2 ± 0.04	0
Aflatoxina G ₁	33.7 ± 0.02	6.7 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.2 ± 0.02	0
Aflatoxina G ₂	2.4 ± 0.1	0.6 ± 0.008	0.2 ± 0.004	0.03 ± 0.001	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

1: ng/g de maíz

Al comparar la efectividad de ambos extractos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con una probabilidad de 0.05.

Efecto sobre la producción de CPA

Para el caso del extracto de *L. tridentata* se observaron reducciones significativas en la producción de esta micotoxina que van desde el 53 % en la concentración de 25 % de la CMI, hasta el 88 % en la concentración del 75 %. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas.

El extracto de *Y. rigida* fue mas activo que el de *Larrea*; el análisis mostró reducciones significativas que van desde un 58 % hasta un 99 % dependiendo de la concentración de extracto usada; se demostraron diferencias significativas ($P=0.05$) entre las concentraciones subinhibitorias.

Efecto sobre la producción de Acido Kójico

El extracto de *L. tridentata*, inhibió la producción de esta toxina observándose que el 25 % de la CMI inhibía un 58 % la producción de AK y que las concentraciones superiores lo hacían hasta en un 91 %, en comparación con el control; se demostraron claras diferencias entre las concentraciones de extracto usadas y el control.

Por otro lado el extracto de *Y. rigida* inhibió mas fuertemente la producción de esta toxina siendo de 68 % en la concentración mas baja y de hasta 99 % en la de 75 % de la CMI, en comparación con los controles que no contenían extracto; se demostró que existen diferencias significativas ($P=0.05$) entre las concentraciones usadas, el control y el 100 de la CMI.

Purificación del compuesto activo de *L. tridentata*

Se probaron 6 fases móviles diferentes, para ver cual de ellas producía una mejor resolución en la separación, de estas la fase móvil de Benceno:Acetona:Metanol fue la que produjo una mejor separación de las bandas (Tabla 23 y Fig 36).

Tabla 23.- Separación del compuesto activo de *L. tridentata* por diferentes fases móviles.

Fase móvil	Número de Bandas Visibles en luz U.V.
Cloroformo	6
Cloroformo:Metanol (1:1)	2
Cloroformo:Acetona:Metanol (3:1:1)	2
Benceno	6
Benceno:Metanol (1:1)	2
Benceno:Acetona:Metanol (3:1:1)	9

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces



Fig 36.- Cromatografía en capa fina del extracto de *L. tridentata* en luz ultravioleta (a) y luz visible (b).

Posteriormente, se procedió a determinar la banda con actividad antifúngica. La técnica de la autobiografía nos mostró que la banda activa presentaba un Rf de 0.88 (Fig. 37); esta banda fue seleccionada y raspada de la placa.

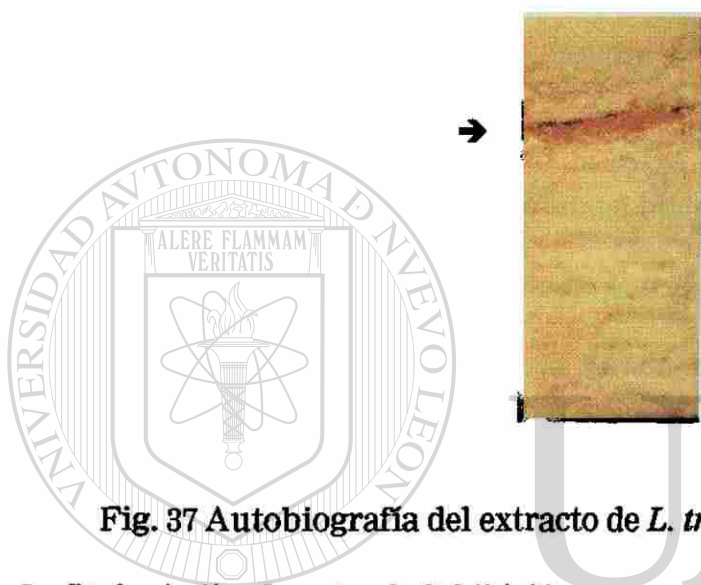


Fig. 37 Autobiografía del extracto de *L. tridentata* contra *Aspergillus*.

La flecha indica la zona de inhibición.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para confirmar, los raspados de las bandas separadas fueron resuspendidos en etanol y se determinó su actividad antifúngica mediante la técnica de difusión; el resultado fue que solo la banda con un Rf de 0.88 presentaba inhibición del crecimiento fúngico (Fig. 38).

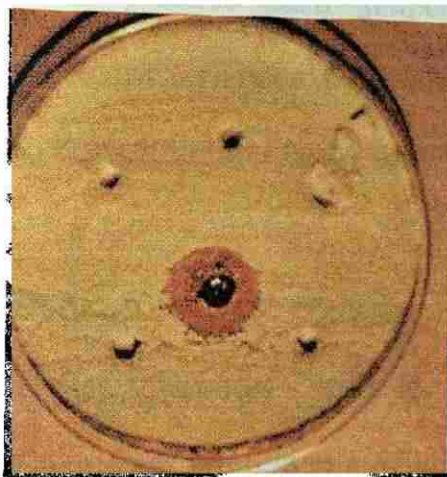


Fig 38.- Comprobación de la actividad biológica de las bandas aisladas del extracto de *L. tridentata*.

Bajo la luz ultravioleta, esta banda mostró un color café-morado. El compuesto activo, presentaba una forma de granos irregulares, un color café-verde y era soluble en etanol, metanol y cloroformo.

Finalmente, se le realizaron diversas pruebas químicas para determinar la naturaleza del compuesto activo (Tabla 24).

Tabla 24.- Pruebas químicas realizadas para determinar la naturaleza del compuesto activo.

Pruebas Realizadas*	Resultado
Cloruro férrico + Acido Sulfúrico	+++
Formol + Acido Sulfúrico	+++
Pentacloruro de antimonio	+++

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces.

Estas pruebas dieron positivo para grupos metilendioxi y anillos aromáticos, los cuales son característicos para los lignanos. Además de la pruebas con pentacloruro de antimonio que es usado para la identificación de este tipo de compuestos.

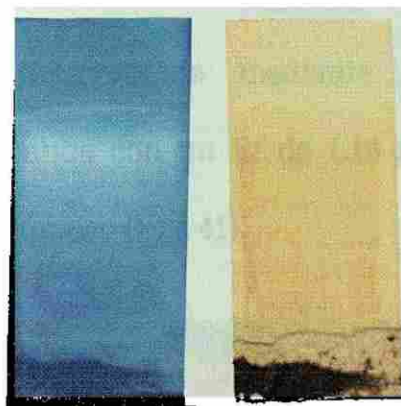
Purificación del compuesto activo de *Y. rigida*

De las 7 fases móviles diferentes (Tabla 25 y Fig. 39) , usadas la de Butanol:Etanol:Agua fue la que nos produjo una mejor resolución.

Tabla 25.- Determinación de la fase móvil mas adecuada para la separación del compuesto activo de *Y. rigida*.

Fase móvil	Número de Bandas Visibles en luz U.V.
Butanol saturado en agua	3
Butanol:Acido Acético: Agua (4:1:15)	5
Butanol:Etanol:Agua (1:1:1)	7
Butanol:Acetato de Etilo: Agua (4:1:5)	4
Cloroformo:Acetona (9:1)	2
Benceno:Acetona (9:1)	4
Benceno:Metanol (9:1)	5

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces



A

B

Fig 39.- Cromatografía en capa fina del extracto de *Y. rigida* en luz ultravioleta (a) y luz visible (b).

Una vez realizado esto, se procedió a determinar la banda con actividad antifúngica. La técnica de la autobiografía fue la primera en usarse, observamos que la banda activa presentaba un Rf de 1.16 (Fig. 40).

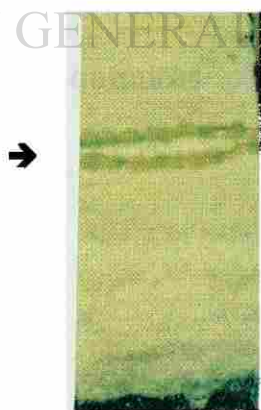


Fig. 40 Autobiografía del extracto de *Y. rigida* contra *Aspergillus*.

La flecha indica la zona de inhibición

Todas las bandas fueron raspadas de la placa, resuspendidas en etanol y se determinó su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión. El resultado fue que solo la banda con un Rf de 1.16 presentaba una actividad inhibitoria del crecimiento fúngico (Fig. 41).

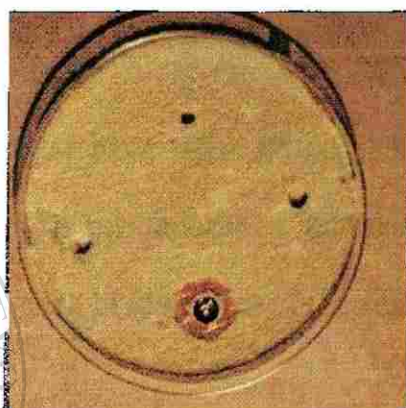


Fig 41.- Comprobación de la actividad biológica de las bandas aisladas del extracto de *Y. rigida*.

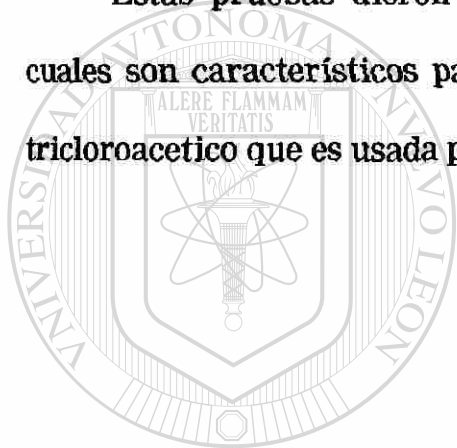
Esta banda mostró un color blanquecino bajo la luz ultravioleta y fue purificada en dos ocasiones. Se observó que presentaba un color blanquecino, en forma de polvo, soluble en agua, etanol e isopropanol. Posteriormente, se le realizaron diversas pruebas químicas para determinar la naturaleza del compuesto activo (Tabla 26).

Tabla 26.- Pruebas químicas realizadas para determinar la naturaleza del compuesto activo.

Pruebas Realizadas*	Resultado
Lieberman-Buchard	+++
Salkowski	+++
Molish	+++
Tricloruro de Antimonio	+++
Acido Tricloroacético	+++

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces

Estas pruebas dieron positivo para grupos esteroides y azúcares, los cuales son característicos para las saponinas, además de la prueba con ácido tricloroacético que es usada para la identificación de este tipo de compuestos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DISCUSION

Actualmente, las plantas son potencialmente una fuente de antimicrobianos y en ultimas fechas compuestos aislados de estas se han usado en la preservación de alimentos como antibacterianos, antifúngicos, etc..

En México se tiene conocimiento del uso empirico de aproximadamente 7000 plantas; sin embargo, los reportes publicados hacen referencia casi exclusivamente al uso tradicional que a cada planta atribuye la población que las consume, mientras que la evidencia científica que valide tales usos es muy escasa.

Se sabe que aproximadamente un 5% de las plantas mexicanas han sido sometidas a investigaciones que demuestren su actividad biológica, aunque en algunos casos, los bioensayos se realizan a nivel extractos crudos, sin llegar al aislamiento de los principios activos puros (Martínez., 1996).

En estudios recientes se demostró que 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 efectos de extractos de las plantas del género *Yucca* y *Larrea tridentata* sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de toxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Como podemos observar entre los resultados de las 5 especies de *Yucca* probada solo una (*Yucca rigida*) es la que presentó actividad importante contra

todas las cepas. En estudios realizados por Zaika y Buchanan en 1987, se determinó que diversos compuestos de plantas podían presentar efectos inhibitorios de la producción de toxinas y que estos compuestos podían ser específicos de una especie en particular de plantas. Pero también, Linton y Wright en 1993 observaron que los compuestos activos de plantas podían estar distribuidos en especies, géneros y hasta familias de plantas; sin embargo ellos mencionan que la presencia del compuesto activo puede depender de las condiciones geográficas y/o de la calidad genética de la planta.

EFECTO EN MEDIO DE CULTIVO

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

Las CMIs del extracto de *L. tridentata*, presentaron diferencias significativas dependiendo del medio sólido o líquido usado. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza química del compuesto activo o a su grado de difusión en el medio sólido usado. De forma similar Lozano en 1997, observó diferencias en las CMIs al usar extractos de *Larrea* en diferentes medios. El extracto de *Yucca* no mostró diferencias significativas en sus CMIs entre los medios usados; estos resultados pueden ser apoyadas con las investigaciones hechas por Jansen *et al* en 1986; donde ellos determinan que existen cuatro factores especialmente importantes para el análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos: la técnica de ensayo, el medio de cultivo, el microorganismo y la naturaleza del compuesto activo.

EFECTO EN EL CRECIMIENTO

Al usar dosis subletales de los extractos pudimos observar que no se encontraron grandes diferencias con los controles en el crecimiento, solo se apreciaron disminuciones del crecimiento y cambios morfológicos en la concentración del 75 % de la CMI. El resto de las concentraciones usadas no produjeron estas diferencias. Este efecto se observó en ambos extractos.

El análisis estadístico no encontró diferencias significativas entre el efecto en el crecimiento de los extractos probados. Resultados similares fueron obtenidos por Ansari y Shrivastava en 1991, además por Bankole en 1997 quienes encontraron que extractos provenientes del eucalipto y de algunas plantas medicinales de Nigeria, respectivamente, en concentraciones subinhibitorias presentaban algunos cambios morfológicos en el crecimiento del hongo; sin embargo, estos solo se observaban en concentraciones cercanas a la mínima inhibitoria.

EFECTO EN LA PRODUCCION DE TOXINAS

De forma general ambos extractos inhibieron fuertemente la producción de todas las toxinas analizadas (aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y ácido kójico) aun a concentraciones tan bajas como el 25 % de la CMI. No fueron encontradas diferencias significativas entre la efectividad de los extractos con una $P=0.05$.

AFLATOXINAS

El extracto de gobernadora inhibió la producción de aflatoxinas desde un 79 % hasta un 90 % en concentraciones menores a la mínima inhibitoria, por su parte el extracto de *Yucca* inhibió mas fuertemente que el extracto de *Larrea*. En este caso; la inhibición fue de hasta un 90 % en la concentración mas baja y de un 98 % en la mas alta. Aún así, el análisis estadístico no mostró diferencias entre los extractos.

Como ya se mencionó anteriormente no se encontraron reducciones importantes en el crecimiento del hongo que pudieran afectar estos resultados.

Otros estudios han mostrado comportamientos similares en la producción de aflatoxinas; como los realizados por Farag *et al* en 1989 y Bankole en 1997 donde también observaron una reducción en la producción de las aflatoxinas pero no en el crecimiento.

ACIDO CICLOPIAZONICO

La producción de CPA se determinó en todas la cepas de *Aspergillus* y se detectó en la cepa SRRC 1299 de *A. flavus*. En estudios realizados por Luk *et al*, en 1977, se demostró que esta toxina es coproducida con aflatoxinas por algunas especies de *Aspergillus*, de manera similar, Gallagher *et al*, en 1978, reportaron que la mayoría de las cepas aisladas coproducen esta toxina en forma natural. Finalmente se ha reportado también que *A. parasiticus* no produce esta micotoxina (Dorner, *et al.*, 1984).

Los extractos de gobernadora redujeron de forma significativa la producción de CPA aún en las concentraciones del 25 % de la CMI donde se encontraron reducciones de hasta un 69 % y en la concentración del 75 % de la CMI se encontraron reducciones del 93 %. Estos resultados al ser sometidos a el análisis estadístico mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

El extracto de *Yucca*, en este caso, no fue tan efectivo como el de *Larrea*; se encontraron reducciones del 40 % en el 25 % de la CMI y de 79 % en el 75 % de la CMI. De forma similar al anterior, el análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los tratamientos al ser comparados con el control.

Finalmente, un análisis estadístico entre la cantidad inhibidora de la producción de CPA de los extractos reveló que estos no tenían diferencias significativas.

ACIDO KOJICO

Esta toxina al igual que la anterior fue producida solo por la cepa SRRC 1299 de *A. flavus*. Estudios realizados en 1981 y posteriores determinaron que esta toxina se produce principalmente en cepas de *A. flavus* Link (Bajpai, *et al.*, 1981; Bajpai, *et al.*, 1982) y que regularmente es coproducida junto con las aflatoxinas (Megalla, *et al.*, 1987; Madihah, *et al.*, 1993).

De forma similar a las demás toxinas, la producción del ácido kójico fue inhibida significativamente por ambos extractos. El extracto de *Larrea* inhibió su producción desde un 35 % en la concentración mas baja hasta un 91 % en la

del 75 % de la CMI. Se encontraron diferencias significativas ($P=0.05$) al comparar el control con los tratamientos.

El extracto de *Yucca* inhibió de manera mas fuerte la producción de esta toxina; el 25 % de la CMI la redujo hasta en un 56 % y el 75 % hasta en un 95 %. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los tratamientos al compararlos con el control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos extractos ($P=0.05$).

Finalmente cabe destacar que no existe literatura (hasta la fecha) donde se analice el efecto de extractos de plantas sobre la producción de ácido ciclopiazónico y de ácido kójico.

CONCENTRACION MINIMA ESPORICIDA

La CME para el extracto de *L. tridentata* mostró una disminución a razón del tiempo; es decir que a mayor tiempo de exposición al extracto menor la CME requerida.

Para este caso, las cepas de *A. parasiticus* alcanzaron la CME en un menor lapso de tiempo que las de *A. flavus*, sin embargo las cepas de *A. flavus* presentaron una CME menor a las encontradas en *A. parasiticus*.

Este comportamiento había sido encontrado y descrito anteriormente por Lozano en 1997, donde se observó una disminución gradual de la CME a razón del tiempo. El análisis estadístico encuentra diferencias significativas entre el tiempo requerido para matar esporas, pero no lo hace entre las cepas usadas.

El extracto de *Y. rigida* no mostró reducciones importantes en la CME durante el monitoreo, a diferencia del extracto anterior la CME se alcanzó desde los primeros días de muestreo y esta no varió durante todo el experimento.

Esto se puede explicar por la naturaleza del compuesto. Algo similar fue descrito por Lozano en 1997 con un extracto de *Y. shidigera* el cual presentaba estas características.

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre las cepas ni tampoco entre el tiempo requerido para matar esporas con una $P > 0.05$ %.

EFFECTO EN LA GERMINACION

Para este caso ambos extractos presentaron efectos inhibitorios significativos en la germinación de esporas de *Aspergillus*. El extracto de gobernadora presentó la inhibición las 48 h después de estar en contacto con el extracto. Esto es que durante las primeras 24 h no se observaron reducciones en

la cantidad de esporas germinadas, contrariamente se observó un ligero aumento en la germinación; sin embargo a las 48 h la reducción fue apreciada de forma significativa. El análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre los tratamientos y el control a las 24 h de incubación pero si a las 48 h.

Para el extracto de *Y. rigida* se encontraron reducciones considerables en la germinación en los tratamientos al compararlos con el control desde las 24 h de incubación y esto se mantuvo hasta el fin del experimento. Se encontraron

diferencias significativas entre los tratamientos y el control en ambos días de muestreo.

Finalmente se encontraron diferencias significativas entre los extractos usados pero solo a las 24 h de incubación; a las 48 h no se encontraron tales diferencias con una $P=0.05$.

Estudios realizados por Aderide y Ogundana en 1996 mostraron que extracto de otras plantas usadas en la medicina tradicional como *Dioscorea alata* presentaban efectos inhibitorios de la germinación de esporas de *Aspergillus*, pero estos extractos lo hacían a las 24 h de incubación.

EFECTO SOBRE EL TUBO GERMINATIVO

En este caso en particular el extracto de gobernadora creó reducciones en la velocidad de crecimiento del tubo germinativo que van desde un 25 % hasta un 75 % dependiendo de la concentración usada. El análisis estadístico mostró

diferencias significativas entre los tratamientos y el control con una $P > 0.05\%$.

El extracto de *Y. rigida* mostró una reducción un poco mas fuerte que el extracto de gobernadora, la concentración del 25 % de la CMI redujo el crecimiento hasta un 37 % y hasta un 80 % en el caso del 75 % de la CMI. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control con una $P = 0.05$. Sin embargo; no se mostraron diferencias significativas entre los extractos probados.

Aderide y Ogundana en 1996 mostraron que extractos de *Dioscorea alata* presentaban inhibición del crecimiento de los tubos germinativos de

Aspergillus, pero estos extractos lo hacían a las 24 h de incubación; tal como en el caso anterior.

EFFECTO EN MAIZ

CMI

En este caso, observamos que la CMI de medio sólido era similar a la CMI encontrada para el maíz; podemos pensar que esto se debe principalmente a que en el medio sólido no existe una buena difusión de los compuestos activos y por eso es fácilmente extrapolables al maíz, sin embargo se debe tomar en cuenta que no existen estudios comparativos en los cuales se tomen como puntos base los efectos de extractos de plantas en maíz y medio de cultivo.

Las CMIs del extracto de *L. tridentata*, eran un poco más altas que las encontradas en el extracto de *Y. rigida*; sin embargo el análisis estadístico no reveló diferencias entre ambos extractos.

EFFECTO EN EL CRECIMIENTO

Al usar dosis subletales de los extractos en el maíz pudimos observar que no se encontraron diferencias con los controles en cuanto a el crecimiento del hongo, de igual forma como se había determinado anteriormente en medio de cultivo; solo la concentración del 75 % y 100 % de la CMI, presentaron efectos significativos; estos efectos fueron observados en ambos extractos. No se encontraron diferencias significativas entre los extractos probados.

En estudios realizados en 1997 por Vargas-Arispuro *et al*, se determinó que extractos de plantas usados en la medicina tradicional presentaban efectos

inhibidores del crecimiento y de la producción de aflatoxinas en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en maíz; sin embargo, los extractos inhibieron fuertemente pero no totalmente el crecimiento de los hongos.

EFECTO EN LA PRODUCCION DE TOXINAS EN MAIZ

Al igual como se observó en el medio de cultivo los dos extractos redujeron la producción de todas las toxinas muestreadas (aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y ácido kójico) aún en las concentraciones del 25 % de la CMI. Además de ellos podemos decir que el extracto de *L. tridentata* presentaba una inhibición mayor que el de *Y. rigida*. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ellos con una $P > 0.05$ %.

AFLATOXINAS EN MAIZ

El extracto de gobernadora inhibió la producción de aflatoxinas desde un 84 % hasta un 97 % en concentraciones menores a la mínima inhibitoria, por su parte el extracto de *Yucca* inhibió hasta en un 85 % en la concentración mas baja y en un 96 % en la mas alta. No se demostraron diferencias entre los extractos. En estos casos no se encontraron reducciones importantes en el crecimiento del hongo que pudieran afectar estos resultados.

El grupo de Vargas-Arispuro, en 1997 determinaron que extractos de plantas presentaban efecto inhibitor de la producción de aflatoxinas en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en maíz; observando que dosis subletales de los extractos de estas plantas inhibieron en un 86 % la producción de estas toxinas.

ACIDO CICLOPIAZONICO EN MAIZ

El extracto de gobernadora redujo de forma significativa la producción de esta toxina aún en la concentración del 25 % de la CMI que originó una disminución de un 53 % y mientras que las concentración del 75 % de la CMI se encontraron reducciones del 88 %. Estos resultados al ser sometidos a un análisis estadístico mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

En el extracto de *Yucca*, se encontraron reducciones del 58 % para la concentración del 25 % de la CMI y de 99 % para el 75 % de la CMI, de forma igual al anterior el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos al ser comparados con el control. Un análisis estadístico entre los extractos reveló que estos no tenían diferencias significativas en las reducciones ocasionadas por los extractos a esta toxina.

ACIDO KOJICO EN MAIZ

De forma similar a las demás toxinas, la producción de AK fue inhibido significativamente por ambos extractos. El extracto de *Larrea* inhibió el AK desde un 58 % en la concentración mas baja hasta un 91 % en la del 75 % de la CMI; se encontraron diferencias significativas, al comparar el control con los tratamientos.

El extracto de *Yucca* inhibió de manera mas fuerte la producción de esta toxina; el 25 % de la CMI la disminuyó hasta un 68 % y el 75 % la inhibió hasta en un 99 %; Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos al

compararlos con el control. Por su parte no se encontraron diferencias significativas al comparar ambos extractos con una probabilidad del 0.05.

Se observó también que en caldo Czapek fueron inhibidas un poco mas fuerte estas toxinas que en maíz, esto tal vez se deba a las diferencias de composición química de ellos, la cantidad de agua, la naturaleza y difusión de los compuestos activos en ambos como ya se ha mencionado.

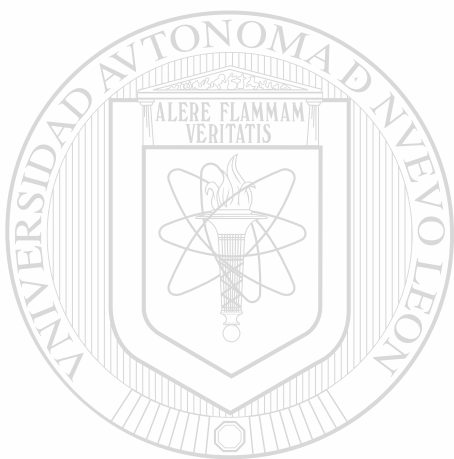
COMPUESTO ACTIVO

Debido al tipo de extracción y las reacciones a pruebas químicas realizadas (Cloruro férrico + Acido Sulfúrico, Formol + Acido Sulfúrico, Pentacloruro de antimonio para el caso del compuesto de gobernadora y Lieberman-Buchard, Salkowski, Molisch, Tricloruro de Antimonio y Acido Tricloroacético para el caso del compuesto de *Yucca*) podemos sospechar que el compuesto con actividad antifúngica proveniente de gobernadora es un lignano,

y una saponina de tipo esteroideo como el compuesto activo de la yuca.

La gobernadora contiene muchos tipos de sustancias químicas entre las que destacan los lignanos por sus diversos efectos biológicos, estos compuestos presentan grupos metilendioxi y anillos aromáticos, lo que les da una fluorescencia característica (Domínguez., 1988), dentro de los lignanos mas importantes de esta planta podemos mencionar al ácido guaiarético y el nordihidroguaiarético (Gisvold y Thaker., 1974), ambos han sido reconocidos por su amplia actividad biológica en plantas, animales, bacterias, hongos y virus (Gisvold y Thaker., 1974; Parry., 1993).

Para el caso del extracto de *Yucca*, las pruebas químicas fueron positivas para formas esteroideas y azúcares (Domínguez., 1988). Dentro de los compuestos mas comunes con estas características y actividad biológica conocida de este tipo de plantas están las saponinas esteroideas; las cuales han sido aisladas de diversas especies de este genero (Backer, *et al.*, 1972; Domínguez., 1988)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

Solo dos de 33 extractos presentaron inhibición importante en las cinco cepas de *Aspergillus* probadas en este estudio.

Las concentraciones mínimas varían dependiendo de la composición del substrato de crecimiento del hongo, de la naturaleza del compuesto activo y del medio de cultivo.

Las dosis subletales no afectaron significativamente el crecimiento del hongo ni en el maíz ni en el medio de cultivo.

Las dosis menores a la mínima inhibitoria de crecimiento redujeron significativamente la producción de todas las toxinas analizadas tanto en medio de cultivo como en maíz bajo condiciones de almacenaje.

Los extractos presentaron un efecto esporicida, que es aumentado a razón de tiempo.

Las concentraciones subletales de los extractos inhibieron la germinación de las esporas de las especies de *Aspergillus* y redujeron el crecimiento del tubo germinativo.

De acuerdo a pruebas químicas preliminares se sugiere que el compuesto activo del extracto de gobernadora es un lignano perteneciente al grupo de ácido guaiarético; mientras que el compuesto activo del extracto de yuca es una saponina de tipo esteroidea.

PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACION

La tendencia mundial al consumo de alimentos mas saludables y sin el uso de sustancias químicas, han colocado a la investigación con extractos de plantas y/o microorganismos como una de las principales estrategias para el control de bacterias y hongos, es por ello que este trabajo se dedico a la búsqueda de compuestos de plantas de la zona norte de la República Mexicana que presentaran un efecto inhibitorio del crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

Este estudio solo representa una pequeña parte de la diversa flora mexicana y los resultados muestran que el uso de estos extractos para evitar la contaminación con estos hongos pueden ser adecuados; sin embargo, muchos estudios faltan por hacer; como los estudios toxicológicos en animales y semillas, las pruebas de campo, los efectos en las poblaciones de insectos, entre otros. Sin embargo podemos decir que este tipo de investigaciones abre alternativas para el uso de extractos de plantas en muchas áreas no solo en la alimentaria y/o agrícola para el control de este tipo de microorganismos sino también en la medica, entre otras, como una alternativa para el control de organismos patógenos para plantas y/o animales incluyendo al ser humano.

La investigación de extractos de plantas apenas comienza y el desarrollo de esta dependerá mucho de las tendencias mundiales para el consumo de alimentos mas sanos.

BIBLIOGRAFIA

Aderiye, B.I. and S.K. Ogundana, 1996. "Antifungal Properties of Yam (*Dioscorea alata*) Peel Extract". *Folia Microbiol.* 41(5): 407 - 412.

Anderson, H.W., E.W. Nehring and W.R. Wicher. 1975. "Aflatoxin Contamination of Corn in the Field". *J. Agric. Food Chem.* 2: 775 - 782

Andriole V.T., 1993. "Infections with *Aspergillus* Species". *Clin infect. Dis* 17 (Suppl2) S481 - S486

Ansari, A.A. and A.K. Shrivastava. 1991. "The Effect of Eucalyptus Oil on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus*". *Letters Appl. Microb.* 13: 75 - 77.

Amin M., F. Kurosaki and A. Nishi. 1988. "Carrot Phytoalexyn Alters the Membrane Permeability of *Candida albicans* and Multilamellar

Liposomes". *J. Gen. Microbiol.* 134: 241 - 246.

A.O.A.C. Official Methods, 1995. "Natural Toxins: Aflatoxins in Corn, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts and Pistachio (49.2.19A)". Chapter 49 pp: 24 - 25

Applebaun, R.S. and E.H. Marth, 1980. " Inactivation of Aflatoxin M₁ by Hydrogen Peroxide". *J. Food Prot.* 43: 820 - 825.

Ariff, A.B., M.S. Salleh, B. Ghani, M.A. Hassan, G. Rusul and M.I.A. Kairm, 1996. "Aeration and Yeast Extract Requirements for Kojic Acid Production by *Aspergillus flavus* Link". *Enz. and Microbial Tech.* 19: 545 - 550.

Ariff, A.B., M. Rosfarizan, L.S. Heng, S. Madihah and M.I.A. Karim, 1997. "Kinetics and Modeling of Kojic Acid Production by *Aspergillus flavus* Link in Batch Fermentation and Resuspended Mycelial System". World J. of Microb. and Biotech. 13: 195 - 200.

Asao, T., G. Buchi, M.M. Abdel-Kadel, S.B. Chang, E.L. Wick and G.N. Wogan, 1965. "The structures of Aflatoxins B₁ and G₁". J. Am. Chem. Soc. 87: 882 - 886.

Backer, R.C., E. Bianchi and J.R. Cole, 1972. "A Phytochemical Investigation of *Yucca schottii* (Liliaceae)". J. Pharm. Sci. 61 (10): 1665 - 1666.

Bajpai, P., P.K. Agrawala and L. Vishwanathan, 1981. "Enzymes relevant to Kojic Acid Biosynthesis in *Aspergillus flavus*". J. Gen. Microb. 127: 131 - 136.

Bajpai, P., P.K. Agrawala and L. Vishwanathan, 1982. "Production of Kojic Acid by Resuspended Mycelia of *Aspergillus flavus*". Can J. of Microb. 28: 1340 -

1346.

Balan Chandran, C. and K.R. Parthasarathy, 1995. "Occurrence of Cyclopiazonic Acid in Feeds and Feed stuff in Tamil Nadu, India". Appl. Environ Microbiol. 104: 177 - 180

Bankole, S.A., 1997. "Effect of Essential Oils from Two Nigerian Medicinal Plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on Growth and Aflatoxin B₁ Production in Maize Grain by Toxigenic *Aspergillus flavus*". Lett. Appl. Microb. 24: 190 - 192.

Beelik, A., 1956. "Kojic Acid" Advan. Carbohydrate Chem. 2: 145 - 186.

Bentley, R., 1957. "Preparation and Analysis of Kojic Acid". *Methods in Enzymology*. **3**: 238 - 241.

Beaten, V., 1989. "Micotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects". Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. 19 - 27.

Betto P., C. G. Casino, R. G. Gabriele, G. Grandolini and F. Menichini. 1988. "Estudio Sistemático de los Componentes Menores de la *Artemisia arborescens* L. (Compositae)". *Rev. Latinam. Quím.* **19**: 40 - 42.

Beuchat, L.R., 1987. "Food and Beverage Mycology", 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York. 28

Bilgrami K.S., K.K. Sinha and A.K. Sinha. 1992. "Inhibition of Aflatoxin Production & Growth of *Aspergillus flavus* by Eugenol & Onion & Garlic Extracts". *Indian J. Med. Res.* **96**: 171 - 175.

Block, E., 1983. "Química del Ajo y la Cebolla". Prensa Científica p. 86 - 92

Bodey, G.P. and S. Vartivarian, 1989. "Aspergillosis". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **8**: 413 - 437.

Brekke, O.L., A.J. Peplinski and E.B. Lancaster, 1977. "Aflatoxin Inactivation in Corn by Aqueous Ammonia" *Trans. Soc. Agric. Eng.* **20**: 1160 - 1165.

Buchi, G. and I.D. Rae, 1985. "The Structure and Chemistry of Aflatoxins" in *Aflatoxins*, Goldblatt, L.A. Ed. Academic Press, New York. 55

Bullerman, L., 1974. "Inhibition of Aflatoxins by Cinnamon" *J. Food Prot.* **39**: 1163 - 1165.

Bullerman, L.B., 1979. "Significance of Mycotoxins to Food Safety and Human".
J. Food Protec. 42: 65 - 70.

Bullerman, L.B., F.Y. Lieu and S.A. Seier, 1977. "Inhibition of Growth and
Aflatoxin Production by Cinnamon and Clove Oils, Cinnamic Aldehyde
and Eugenol". J. Food Sci. 42: 1107 - 1109.

Bullerman, L.B., 1979. "Significance of Micotoxins to Food Safety and Human
Health". J. Food Protect. 42: 65 -86.

Caceres, A., O.Cano, B. Samayoa and L. Aguilar, 1990a. "Plants Used in
Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders - Screening of
81 Plants Against Enterobacteria". J. Ethnopharmacol. 30: 35 - 73.

Caceres, A., E. Jauregui, D. Herrera and H. Logemann, 1990b. "Plants Used in
Guatemala for the Treatment of Dermat mucosal infections 1. Screening
of 38 Plant Extracts for Anticandidal Activity". J. Ethnopharmacol. 33:

277 - 283.

C.A.S.T., 1989. Council for Agricultural Science And Technology." Economic and
Health Risks Report". Report 116

Chang-Yan, I. and K. Bidasee, 1990. "Improved Spectrophotometric
Determination of Cyclopiazonic Acid in Poultry Feed and Corn". J.
A.O.A.C. 73(2): 257 - 259.

Chen, J.S., C. Wei, and M.R. Marshall, 1991. "Inhibition Mechanism of Kojic Acid
on Polyphenol Oxidase". J. Agric. Food Chem. 39 (11): 1897 - 1901.

Ciegler, A., E.B. Lillehoj, R.E. Peterson and H.H. Hall, 1966. "Microbial Detoxification of Aflatoxin". *Appl. Microbiol.* **14**: 934 - 937.

Clifford, J.I., K.K. Rees and M.E.M. Steven, 1967. "Effect of Aflatoxins B₁, G₁ and G₂ on Protein and Nucleic Acid Synthesis in Rat Liver". *Biochem. J.* **103**: 258 - 305.

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.

Corral, C.J., W.G. Merz, K. Rekedal and W.T. Huges, 1982. "*Aspergillus* Osteomyelitis in an Immunocompetent Adolescent: A Case Report and Review of Literature". *Pediatrics.* **70**: 455 - 461.

Cocker, R., 1995. "Controlling Mycotoxins in Oilseeds and Oil Seed Cakes". *Chem. Ind.* **7**: 260 - 264.

Coupland, K. and W.G. Niehaus Jr., 1987. "Effect of Nitrogen Supply, Zn²⁺ and Salt Concentration on Kojic Acid and Versicolorin Biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*". *Exp. Mycology.* **11**: 206 - 213.

D'Andrea, A.D. and W.H. Haseltine, 1978. "Modification of DNA by Aflatoxin B₁ Creates Alkali-labile Lesions in DNA at Positions of Guanine and Adenine". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 4120 - 4126.

Delaha, E.C. and V.F. Garagusi. 1985. "Inhibition of Mycobacteria by Garlic Extract (*Allium sativum*)". *Antim. Agents and Chemot.* **27**: 485 - 490.

Dhuley, J.N., 1998. "Therapeutic Efficacy of Ashwagandha Against Experimental Aspergillosis in Mice". *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **20**(1): 191 - 198.

Dollear, E.G., G.E. Mann, L.P. Codifer, H.K. Gardner, S.P. Koltum and H.L.E. Vix, 1968. "Elimination of Aflatoxin from Peanut Meal". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **45**: 862 - 866.

Dominguez, X.A., 1988. "Metodos en Investigación Fitoquímica" 4ta. Reimpresión. Ed. Limusa. México D.F.

Dorner, J.W., R.J. Cole, L.G. Lomax, H.S. Goser and U.L. Diener, 1983. "Cyclopiazonic Acid Production by *Aspergillus flavus* and its Effects on Broiler Chickens". *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 698 - 709

Dorner, J.W., R.J. Cole and U.L. Diener, 1984. "The Relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with Reference to Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid". *Mycopathologia.* **87**: 13-15.

Dowd, P.F., 1988. "Synergism of Aflatoxin B₁ Toxicity with the Co-occurring Fungal Metabolite Kojic Acid in two Caterpillars". *Entomol. Exp.* **47**: 69 - 71.

Doyle, M.P., R.S. Applebaum, R.E. Bracket and E.H. Marth, 1982. "Physical, Chemical and Biological Degradation of Mycotoxins in Foods and Agricultural Commodities". *J. Food Prot.* **45**: 964 - 970.

Durackova, Z., V. Betina and P. Nemeč, 1976. "Systematic Analysis of Mycotoxins by Thin Layer Chromatography". *J. Chrom.* **116**: 141 -154.

Dvorackva, L., 1990. "Aflatoxins and Human Health." Boca Ratón, F.L. CRC Press

Dwarakanath, C.T., E.T. Rayner, G.E. Mann and F.G. Dollear, 1968. "Reduction of Aflatoxin Levels in Cottonseed and Peanut Meals by Ozonization". J. Am. Oli Chem. 45: 93 - 100.

Dwyer, M.R. and L.F. Kubera. 1997. "Effects of Innorganic Adsorbents and Cyclopiazonic Acid in Broiler Chickens". Poultry Sci. 76(8) 1141 - 1149.

Dyche-Teague, F.C. 1924. "Effect of Essential Oils Used in Perfumery on Growth of Pathogenic Bacteria. Perf. Essent. Oil Record. 1:6 - 15.

Eberhardt, T.L. and R.A. Young, 1994. "Conifer Seed Cone Proanthocyanidin Polymers Characterization by C- 13 NMR Spectroscopy and Determination of Antifungal Activities". J. Agric. Food. Chem. 42: 1704 - 1708.

Elias R., A. M. Diaz, E. Vidal-Ollivier, and G. Balansard 1991. "Triterpenoid Saponins from the Leaves of *Hedera helix*". J. Nat. Prod. 54: 98 - 103.

Ellis, W.O., J.P. Smith, B.K. Simpson and J.H. Oldman, 1991. "Aflatoxins in Food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control". Critical Rev in Food Sci. and Nutr. 30(3): 403 - 439

El-Gammal, A. and R.M. Mansour, 1986. "Antimicrobial Activity of Some Flavonoid Compounds". Zentrabl. Mikrobiol. 141: 561 - 565.

Fabry, W. and P. Okemo, 1996. "Fungistatic and Fungicidal Activity of East African Medicinal Plants" Mycoses 39(1-2): 67 - 70.

Farag, R.G., Z.Y. Daw and S.H. Abo-rya, 1989. "Influence of Some Spice Essential Oils on *Aspergillus parasiticus* Growth and Production of Aflatoxins in a Syntethic Medium". J. Food Sci. 54: 74 - 76.

Farr, D.F., G.F. Billis, G.P. Chamuris and A.Y. Rossman, 1989. " Fungi on Plants and Plant Products in the United States St. Paul M.N." APS Press 578

FDA, Food and Drug Administration: Compliance Policy Guides; 1977. Ibid: 42: 61630.

FDA, Food and Drug Administration: Compliance Policy Guides; 1982. Ibid: 47: 33007.

FDA, Food and Drug Administration: Compliance Policy Guides; 1994. Ibid: 59: 17383.

Fennell, H.K., 1966." Aflatoxins in Groundnuts. IV. Problems of Detoxification". Trop. Sci. 8: 61 - 72.

Frank, H.K. and T. Grunewald, 1970." Radiation Resistance of Aflatoxins". Food. Irrad. 11: 15 - 20.

Friedeman, T.E., 1934. "Chemical and Physiological Properties of Kojic Acid". Science 80: 34- 35.

Fujimoto, N., H. Watanabe, T. Nakatani, G. Roy and A. Ito, 1998. "Induction of Thyroid Tumors in (C57Bl/6N x C3H/N)F₁ Mice by Oral Administration of Kojic Acid". Food Chem. Tox. 36: 697 - 703.

- Gallagher R.T., J.L. Richard, H.M. Stahr and R.J. Cole, 1978. "Ciclopiazonic Acid Production by Aflatoxigenic and Non-aflatoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*." Mycopathologia. **66**: 31 - 36.
- Ginesta-Peris, E. F.J. García-Breijo and E. Primo-Yufera, 1994. "Antimicrobial Activity of Xanthanin from *Xanthium spinosum*". Lett. Appl. Microbiol. **18**: 206 - 208
- Giroir, L.E., W.E. Huff, L.F. Kubena, R.B. Harvey, M.H. Elissalde, D.A. Witzel, A.G. Yersin and G.W. Ivie, 1991. "The Individual and Combined Toxicity of Kojic Acid and Aflatoxin in Broiler Chickens". Poultry Sci. **70**: 1351 - 1356.
- Gisvold, O. and E. Thaker, 1974. " Lignans of *Larrea divaricata*". J. Pharm. Sci. **63** (12): 1905 - 1907.
- Glotzbach, R.E., 1982. "*Aspergillus terreus* Infection of Pseudoneurysm of Aortofemoral Vascular Graft with Contiguous Vertebral Osteomyelitis". Am. J. Clin. Pathol. **77**: 224 - 227.
- Goldblatt, L.A., 1971. "Control and Removal of Aflatoxin" J. Am. Oil Chem. Soc. **48**: 605 - 608.
- Goldblatt, L.A. and F.A. Dollear, 1977. "Detoxification of Contaminated Crops". In Micotoxins in Human and Animal Health. Rodricks, Hesselstine and Mahlman Eds. Pathotox. Pub. Park Forest, IL. 139.
- Gonzalez de Mejia, E and M. Ramos-Gomez, 1997. "Antimutagenic Activity of Natural Xanthophylls Against Aflatoxin B₁ in *Salmonella typhimurium*". Environ. Mol. Mutagen. **30**(3): 346 - 353.

- Goodrich-Tanrukulu, M., N.E. Mahoney and S.B. Rodriguez, 1995. The Plant Regulator Metil-Jasmonate inhibits Aflatoxin production by *Aspergillus flavus*". Microbiol. 141: 2831 - 2837.
- Gourama, H. and L.B. Bullerman, 1995. " *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods And Feeds: A review." J. Food Protec. 58:(12) 1395 - 1404.
- Gqaleni, N., J.E. Smith, J. Lacey and G. Gettingby, 1997. "Effects of Temperature, Water Activity and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture." App. Environ. Microbiol. 63:(3) 1048 - 1053.
- Gurtoo, H.L. and L. Motycka, 1976. "Effect of Sex differences on the *in vitro* and *in vivo* Metabolism of Aflatoxin B₁ by the Rat". Cancer Res. 36: 4663 - 4670.
- Guzmán, D. 1994. "Influencia del Genotipo de Maíz en la expresión Genética de Síntesis de Aflatoxina por *Aspergillus flavus*. Tesis Facultad de Ciencias Biológicas; U.A.B.C.
- Gyamfi, M.A. and Y. Aniya, 1998. "Medicinal Herb, *Thonningia sanguinea* Protect Against Aflatoxin B₁ Acute Hepatotoxicity in Fisher 344 Rats". Hum Exp. Toxicol. 17(8): 418 - 423.
- Hamburger, M.O. and G.A. Cordell, 1987. "A Direct Bioautobiographic TLC Assay for Compounds possessing Antibacterial Activity". J. Nat. Prod. 50(1): 19 - 22.

Hartley, R.D., B.F. Nesbitt and J. O'Kelly, 1963. "Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*". *Nature (London)* **198**: 1056 - 1058.

Hashim, S. and V.S. Aboobaker, 1994. "Modulatory Effects of Essential Oils from Spices on the Formation of DNA Abduct by Aflatoxin B₁ *in vitro*". *Nutr. Cancer* **21(2)** 169 - 175.

Hesseltine, C.W., 1965. "A Millenium of Fungi". *Food and Ferment. Mycologia.* **57**: 149 -197.

Hesseltine, C.W., O.L. Shotwell, J.J. Ellis and R.D. Stubblefield, 1966. "Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*." *Bacteriol. Rev.* **30**: 795 - 805.

Holzappel, C.W., 1968. "The Isolation and Structure of Cyclopiazonic Acid, a Toxic Metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling". *Tetrahedron.* **24**: 2101 - 2119.

Inouye S. and M. Watanabe, 1998. "Antisporulating and Respiration-Inhibitory Effects of essential Oils on Filamentous Fungi". *Mycoses* **41(9 - 10)**: 403 - 410.

Ito, Y. and Y. Nakamura, 1997. "Supression of Aflatoxin B₁- or Methyl Methanesulfonate - Induced Chromosome Aberrations in rat Bone Marrow Cells Treatment with S-methyl Methanesulfonate". *Matat. Res.* **393(3)** 307 - 316.

Jassen A. M, J.J.C. Scheffer, and A. Baerheim., 1986. "Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986. Literature Review Aspects of the Test Methods". *Planta Medica.* **49**:150-153

- Jaskiewicz, K., P.M. Close, P.G. Thiel and R.J. Cole, 1988. "Preliminary Studies on Toxic Effects of Cyclopiazonic Acid Alone and in Combination with Aflatoxin B₁ in Non-Human Primates". *Toxicology*. **52**: 297 - 307.
- Jelinek, F.C., A.E. Pohland and G.E. Wood, 1989. "World wide Occurrence of Micotoxins in Foods and Feeds --- An Update". *J. Assoc. Anal Chem.* **72**: 223 - 230.
- Juan-López M., Carvajal M. and Ituarte B. 1995. "Supervising Program of Aflatoxins in Mexican Corn. Food Additives and Contaminants". **12**: 297-312
- Karunaratne, A.E., Wezenberg and L.B. Bullerman, 1990. "Inhibition of Mold Growth and Aflatoxin Production by *Lactobacillus* sp." *J. Food Prot.* **53**: 230 - 236.
- Kinosita, R., T. Ishiko, S. Sugiyama, S. Igarasi, and I.E. Goetz, 1968. "Mycotoxins in Fermented Food". *Cancer Res.* **28**: 2296 - 2311
- Kumar, S. and G. Prasad, 1992. "Efficacy of Medicinal Plant (*Andrographis peniculata*) Extract on Aflatoxin Production and Growth of *Aspergillus flavus*". *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 112 - 114.
- Landsen, J.A. and J.I. Davison, 1983. "Occurrence of Cyclopiazonic Acid in Peanuts". *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 766 - 769.
- Larhsini, M. and H.B. Lazrec, 1996. "Investigation of Antifungal and Analgesic Activities of Extracts from *Suim nodiflorum*". *J. Ethnopharmacol.* **53**(2): 105 - 110.

Le Bars, J., 1979. "Ciclopiazonic Acid Bioproduction by *Penicillium camemberti* Thom: Effect of temperature on Individual Strains". *Appl Environ. Microb.* **10**: 601 - 602.

Le Bars, J., 1990. "Detection and Occurrence of Cyclopiazonic Acid in Cheeses". *JEPTO* **10**(3): 136 - 137.

Le Blanc, D.T. and H.A. Akers, 1989. " Maltol and Ethylmaltol from Larch Tree to Successful Food Additive". *Food Technol.* **26**: 78 - 84.

Lee, H.F., B. Boltjes, and W. Eisenman, 1950. "Kojic Acid as an inhibitor of Tubercle Bacilli". *Am. Rev. Tuberc.* **61**: 738 - 741.

Leistner, L. and J.I. Pitt, 1977. "Miscellaneous *Penicillium* Toxins". In *Micotoxins in Human and Animal Health*. Eds. J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman. Park Forest South, Ill.: Pathotox. 639 - 653.

Lillehoj, E.B., R.D. Stubblefield, G. Shannon and O.L. Shotwell, 1971. "Aflatoxin

M₁ Removal from Aqueous Solutions by *Flavobacterium aurantiacum*".

Mycopathol. Mycol. Appl. **45**: 259 - 266.

Linton, C.J. and S.L. Wrigh, 1993. " Volatile Organic Compounds: Microbiological Aspects and Some Technological Implications". *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 1 - 12.

Lis-Balchin, M. and S.G. Deans, 1996. "Antimicrobial Effects of Hydrophilic Extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae)". *Lett. Appl. Microbiol.* **24**(4): 205 - 207.

Lomax, L.G., Dorner, J.W. and R.J. Cole, 1984. "The Toxicity of Cyclopiazonic Acid in Weaned Pigs". *Vet. Path.* **21**: 450 - 462.

Lopes L. M., V. S. Bolzani and L.M. Trevisan 1988. "Lignans from Brazilian Aristolochiaceae". *Rev. Latinam. Quím.* **19**: 113 - 117.

Lozano, L., 1997. "Efecto de Extractos de Plantas Sobre el Crecimiento y la Producción de Aflatoxinas de *Aspergillus flavus* Link Ex Fries y *Aspergillus parasiticus* Speare". Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

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; URUZA.

Luk, K.C., B. Kobbe and J.M. Townsend, 1977. " Production of Cyclopiazonic Acid by *Aspergillus flavus* Link". *Appl. Environ Microbiol.* **33**: 211 - 212.

Macht, D.I. and W.M. Kunkel. 1920. "Antimicrobial Effect of Plants of Mediterranean Area". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **18**: 68 - 73.

Madihah, M.S., A.G. Baharuddin, M.I. Abdul Karim, M.A. Hassan, K. Mitsugi, T. Tano, I. Sugio, M. Tada and H. Kansaki, 1993. " Cultivation Characteristics During Kojic Acid fermentation by Local Fungus, Mutant Strain 44-1". Second UNESCO; National Workshop on Promotion of Microbiology in Malasya, University Pertanian Malasya, Serdang, Selangor D.E. Malasya

Mahmoud, A.L., 1994. "Antifungal Action and Antiaflatoxigenic Properties of Some Essential Oil Constituents". *Lett. Appl. Microb.* **19**(2) 110 - 113.

Mann, G.E., L.P. Codifer and F.G. Dollear, 1976. "Effects of Heat on Aflatoxins in Oilseed Meals. *J. Agric. Food Chem.* 15: 1090 - 1095.

Mannon J. and E. Johnson, 1985. "Fungi Down the Farm". *New Sci.* 105: 12 - 16.

March, C., I. Sanz and E. Primo, 1991. "Antimicrobial Activities on Mediterranean Plants". *Zentralb. Microbiol.* 146: 291 - 295.

Masimango, N., J. Remacle and J.L. Ramaut, 1978. "The Role of Adsorption in the Elimination of Aflatoxin B₁ from Contaminated Media". *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 6: 101 - 105.

Martínez; M., 1996. "Atlas de Plantas Medicinales de México", Ed. Limusa. Mexico D.F. 6ta Edición

Megalla, S.E., A.Y. Nassar and M.A.S. Gohar, 1987. "The Role of Cooper (I), Nicotinic Acid Complex on Kojic Acid Biosynthesis by *Aspergillus flavus*". *J. Basic Microb.* 27. 29 - 33.

Micheli, P.A., 1729. "Nova Plantarum Genera". Florentiae 13- 20.

Mishra, A.K. and N.K. Dubey, 1994. "Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity Against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities". *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4): 1101 - 1105.

Mitscher, L.A., W.-N. Wu, R.W. Doskotch and J.L. Beal. 1971. "Antimicrobial agents from higher plants. *Thalictrum rugosum*. New bisbenzylisoquinoline alkaloids active against *Mycobacterium smegmatis*". *Chem. Common.* 589 - 591.

Mitscher, L.A., R.P. Leu, M.S. Bathala, W.Wu and J.L. Beal, 1972. "Antimicrobial Agents from Higher Plants 1. Introduction, Rationale and Methodology". *Planta Medica*. **35**: 157 - 166.

Mitsumori, K. and H. Onodera, 1999. "Promoting Effects of Kojic Acid due to Serum TSH Elevation Resulting from Reduced Serum Thyroid Hormone Levels on Development of Thyroid Proliferative Lesions in Rats Initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine". *Carcinogenesis* **20**(1): 173 - 176.

Montes-Belmont, R. and M. Carvajal, 1998. Control of *Aspergillus flavus* in Maize with Plant Essential Oils and their components". *J. Food Prot.* **61**(5): 616 - 619.

Moore, G.S. and R.D. Atkins, 1977. "The Fungicidal and Fungistatic Effects of an Aqueous Garlic Extract an Medically Important Yeast-like Fungi". *Mycologia*. **69**: 341 - 348.

Moreau, C. and M. Moos Eds., 1979. "Molds, Toxins and Food" John Wiley and Sons, Chichester. 43.

Morris, A., A. Khettry and E.W. Seitz. 1978. "Antimicrobial Activity of Aroma Chemicals and Essential Oils". *J. American. Oil Chem. Soc.* **56**: 595 - 603.

Morrissey, R.E.; R.J. Cole and J.W. Dorner, 1984. "The Effects of Cyclopiazonic Acid and Fetal Development of Fischer Rats". *J. of Tox. Environ. Health.* **14**: 585 - 594.

Morton, H.E., W. Kocholaty, R. Jonowicks-Kocholaty and A. Kelner, 1945.

"Toxicity and Antibiotic Activity of Kojic Acid Produced by *Aspergillus luteo-virescens*". J. Bacteriol. 50: 579 - 584.

Moss, M.O. and J.E. Smith., 1985. "Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance". John Wiley and Sons, Chichester, 7.

Nandan, R. and H. Polasa, 1985. " Inhibition of Growth of Kojic Acid Biosynthesis in *Aspergillus* by Some Chlorinated Hydrocarbons, Indian Journal Microb. 25(1 y 2): 21 - 25.

Nesbitt, B.F., J. O'Kelly, K. Sargeang and A. Sheridan, 1962. "Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*". Nature (London) 195: 1062 - 1063.

Newberne, P.M., 1985. " Chronic Aflatoxicosis". J. Am. Vet. Med Assoc. 163: 1262 - 1268.

Norton, R.A., 1995. " A novel Glass Fiber Disc Culture for Testing of Small

Amounts of Compounds on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus*". Mycopathologia. 129: 103 - 109.

Nwosu, M.O. and J.I. Okafor, 1995. "Preliminary Studies of the Antifungal Activities of Some Medicinal plants Against *Basidiobolus* and Some Other Pathogenic Fungi". Mycoses 38(5-6): 191 - 195.

Offord, E.A. and K. Mace, 1997. " Mechanisms Involved in the Chemoprotective Effects of Rosemary Extract Studied in Human Liver and Bronchial Cells". Cancer Lett. 114(1-2): 275 - 281.

Ohashi K., H. Kojima, T. Tanikawa, Y. Okumura, K. Kawazoe, N. Tatara, H. Shibuya and I. Kitagawa. 1994. "Indonesian Medicinal Plants. Chemical Structures of Gongganosides A, B and C, Three New Quinovic Acid Glycosides from the Bark of *Bhesa paniculata*." Chem. Pharmac. Bulletin 42: 1596 - 1600.

Ohyama, Y. and Y. Mishima, 1990. "Melanogenesis-Inhibitory Effect of Kojic Acid and Its Mechanism". Fragrance J. 6: 53 - 58.

Orth, R., 1977. "Micotoxins of *Aspergillus oryzae* Strains for Use in Food Industry as Starters and Enzyme Producing Molds". Ann Nutr. Aliment. 31: 617 - 624.

Ostry, V. and M. Polster, 1989. "Detection of Cyclopiazonic Acid and its Producers in Food". Vet. Med. Praha. 34: 421 - 430.

Ouf S.A., F.K.A. Hady, M.H. Elgamal, and K.H. Shaker. 1994. "Isolation of

Antifungal Compounds from some *Zygophyllum* Species and their

Bioassay Against Two Soil-borne Plant Pathogens". Folia Microbiol. 39: 215 - 221.

Pai, S. And M.W. Platt, 1995. "Antifungal Effects of *Allium Sativum* (garlic) Extract Against the *Aspergillus* Species Involved in Otomycosis". Lett. Appl. Microbiol. 20(1): 140 - 148.

- Parry, E.W., 1993. "Ciclohexamide on Nordihidroguaiaretic Acid Protects Mice Against the Lethal and Hepatocytotoxic Effects of a Combined Challenge with D-Galactosamine and Bacterial Endotoxin". *J. Comp. Path.* 108: 185 - 190.
- Patkar, K.L., C.M. Usha, H.S. Shetty, N. Paster and J. Lacey, 1993. "Effects of Spice Essential Oils on Growth and Aflatoxin B₁ Production by *Aspergillus flavus*". *Lett Appl. Microbiol.* 17: 49 - 51.
- Petr, J. and J. Rozinek, 1997. "Cyclopiazonic acid Induces Accelerated Progress of Meiosis in Pig Oocytes". *Zygote* 5 (3): 193 - 205.
- Peers F.G. and C.A. Linsell, 1975. " Aflatoxin Contamination and its Heat Stability in Indian Cooking Oils". *Trop. Sci.* 17: 229 - 232.
- Philips, T.D., L.F. Kubena, R.B. Hayvey, D.R. Taylor and N.D. Hiedelbaugh, 1988. "Hydrated Sodium-Calcium Alluminosilicate: A High Affinity Sorbent for Aflatoxin". *Poultry Sci.* 67: 243 -251.
- Pier, A.C., E.L. Belden, J.A. Ellis, E.W. Nelson and L.R. Maki, 1989. "Effects of Cyclopiazonic Acid and Aflatoxin Singly and in Combination on selected Clinical pathological and immunological Responses of Guinea Pigs." *Mycopathologia.* 105: 135 - 142.
- Pier, A.C., J.L. Richard and J.R. Thusrton, 1985. "The Influence of Mycotoxins on Resistance and Immunity.- In Interactions of Mycotoxins in Animal Production". National Academy of Sciences, Washington, D.C. 56.

- Polacheck I., U. Zehavi, M. Maim, M. Levy and R. Evroni 1986. "Activity of Compound G2 Isolated from Alfalfa Roots Against Medically Important Yeast". *Antimicrob. Agent. Chemother.* **30**: 290 - 294.
- Pons, W.A. Jr., A.F. Cucullu, L.S. Lee, H. Janssen and L.A. Goldblatt, 1972. "Kinetic Study of Acid-catalyzed Conversion of Aflatoxins B₁ and G₁ to Aflatoxins B_{2a} and G_{2a}". *J. Am. Oil Chem. Soc.* **49**: 124 - 130.
- Prasad G. S.S. Sahay and A. Masood. 1994. "Inhibition in Aflatoxin Biosynthesis by the Extract of *Amorphophallus campanulatus* (OL) and Calcium Oxalate". *Lett. App. Microbiol.* **18**: 203 - 205.
- Preston, R.S., J.R. Hayes and T.C. Campbell, 1976. "The Effect of protein Deficiency on the *in vivo* Binding of Aflatoxin B₁ to rat Liver Macromolecules". *Life Sci.* **19**: 1191 - 1200.
- Purchase, I.F.H., 1971. "The Acute Toxicity of the Micotoxin Cyclopiazonic Acid to Rats". *Toxic. Appl. Pharmac.* **18**: 114 - 124.
- Rao, B.L. and Hussain A., 1985. "Presence of Cyclopiazonic Acid in Peanuts". *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 766 - 769.
- Rathinavelu, A. and E.R.B. Shanmugasundaram, 1984. "Simple Colorimetric Estimation of Cyclopiazonic Acid in Contaminated Food and Feeds". *J. A.O.A.C.* **67**(1): 38 - 40.
- Raymond, G.L., E.L. Wenth and G. Kotsanas, 1995. "Force and Intracellular Ca²⁺ During NANA-mediated relaxation of Rat Anococcygeus Muscles and the Effects of Cyclopiazonic Acid." *Clin. Exp. Pharm. Phys.* **22**(10): 717 - 723.

- Recio, M.C. and J.L. Rios, 1989. "A Review of Some Antimicrobial Compounds Isolated from Medicinal Plants Reported in Literature 1978 - 1988". *Phytother. Res.* 3(4): 117 - 125.
- Reyes-Méndez C. 1995. "Control de Aflatoxinas en el Maíz en Tamaulipas". *Apuntes del Curso Pre Congreso Patogenicidad de Aflatoxinas.*
- Richard, J.L. and R.T. Gallagher, 1979. "Multiple Toxin Production by an Isolated of *Aspergillus flavus*." 67: 161 - 163.
- Rinaldi, M.G., 1983. " Invasive Aspergillosis " *Rev. Infect. Dis.* 5: 1061 - 1077.
- Ross, P.F., L.G. Rice, H.H. Casper, J.D. Crenshaw and J.L. Richard, 1991. " Novel Occurrence of Cyclopiazonic Acid in Sunflower Seeds". *Vet. Hum. Toxicol.* 34: 421 - 430.
- Rovalo, M. *et al* , 1983. "La Barreta o Barreto: *Helietta parvifolia*". Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos, Xalapa Veracruz.
-
- Sabbioni, G., 1990. "Chemical and Physical Properties of the Major Serum Albumin Adduct of Aflatoxin B₁ and their Implications for the Quantification in Biological Samples". *Chem Biol. Interact.* 75: 1 - 10.
- Sánchez-García, C.A., 1995. "Efecto de Extractos de 33 Plantas Sobre el Crecimiento de 11 Especies Bacterianas Causantes de Enfermedades Gastrointestinales". Tesis Licenciatura, Fac de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Sánchez-García, C.A., 1997. "Efecto de Extractos de Plantas Sobre el Crecimiento, y la Producción de Toxinas de *Clostridium perfringens* Tipo A". Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias Biológicas; U.A.N.L.

Saito, K., 1907. "New Compound Founded in *Aspergillus*". *Botan. Mag.* **21**: 7

Sergeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly and R.B.A. Carnaghan, 1961. "Toxicity Associated with Certain Samples of Ground Nuts". *Nature (London)* **192**: 1095 - 1097.

Serra-Baldrich, E.M. and M.J. Tribo, 1998. "Allergic Contact Dermatitis from Kojic Acid". *Contact Dermatitis* **39** (2): 86 - 87.

Shibuya, T., T. Murota, K. Sakamoto, S. Iwahara and M. Ikeno, 1982. "Mutagenicity and Dominant Lethal Test of Kojic Acid". *J. Toxicol. Sci.* **7**: 255 - 262.

Sinha K.K., A.K. Sinha and G. Prasad. 1993. "The Effect of Clove and Cinnamon Oils on Growth of and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus*". *Lett. Appl. Microbiol.* **16**: 114 - 117.

Singh H. N., M.M. Prasad and K. K. Sinha. 1993. "Efficacy of Leaf Extracts of Some Medicinal Plants Against Disease Development in Banana". *Let. Appl. Microbiol.* **17**: 269 - 271.

Smith, J.E. and M.O. Moss, 1985. "Micotoxins: Formation, Analysis and Significance" John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom

Spector, W.S. (Ed), 1957. "Handbook for Toxicology" Vol 2. W.B. Saunders Co. Philadelphia

Sporston, T., J.E. Little and M.W. Foote. 1948. "Antibacterial and Antifungal Substances from Vermont Plants". Vermont Agric. Exp. Sta. Bull. 543: 3 - 11.

Sreenivasamurthy, V., H.A.B. Parpia, S. Srikanta and A. Shankarmurti, 1967. "Detoxification of Aflatoxin in Peanut Meal by Hydrogen Peroxide". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50: 350 - 354.

Stark, A., 1980. "Mutagenicity and Carcinogenicity of Micotoxins: DNA binding as a Possible Mode of Action". Annu. Rev. Microbiol. 34: 235 - 262.

Still, P., C. Eckardt and L. Leistner, 1978. "Bildung von Cyclopiazonsaure Drush *Penicillium camemberti* - Isolate von Kase". Fleischwirtschaft 58: 876 - 878.

Swensen, D.H., J.K. Lin, J.A. Miller and E.C. Miller, 1977. "Aflatoxin B₁-2,3-epoxide as a Probable Intermediate in the Covalent Binding of Aflatoxins B₁ and B₂ in Rat Liver DNA and RNA in vivo". Cancer Res. 37:

172 - 1801

Tack, K.J., F.S. Rhame, B. Brown and R.C. Thompson, 1982. "*Aspergillus* Osteomyelitis: Report of Four Cases and a Review of Literature." Am. J. Med 73: 295 - 300.

Tan, R.X. and L.D. Kong, 1997. "Secoiridoids from *Gentiana siphonantha*". Phytochemistry. 46(6): 1035 - 1038.

Tantaoui-Elaraki, A. and L. Beraoud, 1994. "Inhibition of Growth and Aflatoxin Production in *Aspergillus parasiticus* by Essential Oils of Selected Plant Materials". J. Environ. Pathol Toxicol. Oncol. 13(1): 67 - 72.

Te-Paske M.R. and J.B. Gloer, 1992. "Aflavarina and B-aflatrem: New Anti-insectan Metabolites from Sclerotia of *Aspergillus flavus*." *J. Nat Prod.* **55**: 1080 - 1086.

Torres, E., 1995." Historia e Importancia de las Aflatoxinas" Memorias del Curso Precongreso de la Investigación Biomédica, Fac. de Medicina; U.A.N.L.

Trail, F. N., Mahanti and J. Linz, 1995. "Molecular Biology of Aflatoxin Biosynthesis". *Microbiology.* **141**: 755 -765.

Urano, T., M.W. Trucksess, R.W. Beaver, D.M. Wilson, J.W. Dorner and F.E. Dowell, 1992. " Co-occurrence of Cyclopiazonic acid and Aflatoxins in Corn and Peanuts". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **75**: 838 - 844.

Valsaraj, R. and P. Pushpangadan, 1997. "Antimicrobial Screening of Selected Medicinal Plants from India". *J. Ethnopharmacol.* **58**(2): 75 - 83.

Van Hoof L., D.A. Vaden and A. J. Vlietinok. 1980. "Screening of Poplar Trees for Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activity." *Biologia Plantarum.* **22**: 265 - 273.

Vargas-Arispuro, I., S. Araujo-Bernal, M.A. Martinez-Téllez 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.

Verastegui, M.A., 1995. "Análisis del Efecto Antifúngico de 20 Extractos de Plantas". Tesis de Maestría; Fac. de Ciencias Biológicas; U.A.N.L.

Verastegui, M.A., C.A. Sánchez, N.L. Heredia and J.S. García-Alvarado, 1996.

"Antimicrobial Activity of Extracts of Three Major Plants from the Chihuahuan Desert". *J. Ethnopharmacol.* **52**: 175 - 177.

Wei, C.I., T.S. Huang, S.Y. Fernando and K.T. Chung, 1991. "Mutagenicity Studies of Kojic Acid". *Tox. Lett.* **59**: 213 - 220.

Werch, S.C., Y.T. Oster and T.E. Friedemann, 1957. "Kojic Acid.: A Convulsant." *Science.* **126**: 450 - 451.

Widaistuti, R., R. Maryam, B.J. Blaney and S. Salfina, 1988. " Cyclopiazonic Acid in combination with Aflatoxins, Zearalenone and Ochratoxin A in Indonesian Corn. *Mycopathologia.* **104**: 153 - 156.

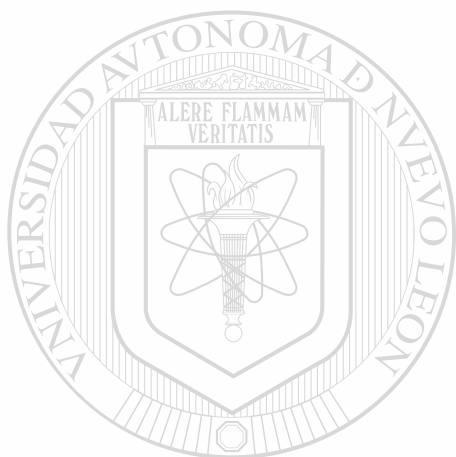
Wilson B.J. and C. Wilson, 1964." Toxins from *Aspergillus flavus*: Production, on Food Materials Causing tremors in Mice". *Science.* **144**: 177 -178.

Wilson, B.J., 1966. "Toxins other than Aflatoxin Produced by *Aspergillus flavus*" *Bacteriol. Rev.* **30**: 478 - 484.

Yin, M.C. and W.S. Cheng, 1998. "Inhibition of *Aspergillus flavus* by Some Herbs and Spices". *J. Food Prot.* **61**(1): 123 - 125.

Yokota, T., A. Sakurai, S. Iriuchijima and N. Takahashi, 1981." Isolation and ¹³C NMR Study of Cyclopiazonic Acid, a Toxic Alkaloid Produced by Muscardine Fungi *Aspergillus flavus* and *A. orizae*". *Agric. Biol. Chem.* **45**: 53 - 56.

Zaika, L.L. and R.L. Buchanan, 1987. "Review of Compounds Affecting the
Biosynthesis or Bioregulation of Aflatoxins". J. Food Protect. 50 (8): 691 -
708.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

