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 saprofíticos, 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, cacahuate, 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. Ademas 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 LD_{50} 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 sobrevenía días después. La LD_{50} 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 LD_{50} 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 lísis 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; el 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 un regulación formal para el ácido ciclopiazónico ni para el ácido kójico y por lo tanto no se tienen medidas de control adecuados 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 mas tarde, Asao *et al* (1965) determinaron la estructura química de las aflatoxinas B_1 y G_1, posteriormente descubrieron que las AF B_2 y G_2 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 mas comunes son la B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2 (Beuchat., 1987; Ellis, *et al.*, 1991). De estas, la B_1 y la G_1 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 M_1 y M_2 las cuales son hidroxilados de las AF B_1 y B_2 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 cacahuate 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 cacahuate que mostró una incidencia de AF 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 B_1 es la mas potente de todas, seguida de la M_1, la G_1, la B_2 y finalmente la G_2 (Gourama y Bullerman., 1995). Como ya se ha mencionado las aflatoxinas son potentes carcinógenos, la AF B_1 esta considerada como el principal hepatocarcinógeno en animales, aunque, se ha visto que también las aflatoxinas B_2 y G_1 presentan este efecto pero en menor grado (Moss y Smith, 1985; Ellis, *et al.*, 1991). Se cree que la toxicidad de la AF B_1 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, perdida 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 B_1, G_1 y M_1 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 B_1 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 B_1 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 B_1 y G_1 (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 B_2 y G_2 (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 B_1 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; Sporoston *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 *Helieta 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 *Fusaruium 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, obteniendose 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 B_1 (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.

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 x 10^7 conidias por ml. La concentración de esporas se determinó mediante una cámara de Newbauer 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 obscuridad 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. Sé 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 x 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 cm^2 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.

145323

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 $NaHCO_3$ 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 solida (Supelclean LC- 18), el filtrado fue derivatizado mediante el método oficial 994.08 de la AOAC (Association of Offical 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 trifluoracético, 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-dimetilaminobenzaldehido 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 cromatrografía en capa fina de 20 x 20 cm; utilizando como eluentes una mezcla de agua:ácido acético:ácetona:acetato de etilo (1:1:3:5); posteriormente se les roció una solución de $FeCl_3$ 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 x 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 µl 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 x 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 obscuridad; 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 (Domínguez., 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 Rf 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 eluente. 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).