

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



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

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

POR:

M.C. SHARLLI RUBI JUAREZ PALAFOX

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.,

JUNIO 2002

2002

3

OP941

M

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



1080124368

TM

QP941

.A3

J8

2002



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



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

TESIS.

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

POR

M.C. SHARLLI RUBI JUAREZ PALAFOX.

SAN NICOLAS DE LOS GARZA. N. L.

JUNIO 2002

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

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

TESIS


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

M.C. SHARLLI RUBI JUÁREZ PALAFOX.

COMISION DE TESIS
APROBADA


Dr. José Santos García Alvarado.
Director


Dra. Norma Laura Heredia Rojas
Co-Director


Dr. Carlos Hernández Luna.
Asesor

San Nicolas de los Garza, N. L.

Junio 2002

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

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

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

DEDICATORIA

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INDICE DE CONTENIDO

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

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

LISTA DE FIGURAS.

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

Figura 8. 50

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

Figura 9. 52

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

Figura 10. 54

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

Figura 11. 55

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

LISTA DE TABLAS

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

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

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

LISTA DE ABREVIACIONES

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

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