

---

## RESUMEN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

## ANTECEDENTES

### GENERALIDADES

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

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

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

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

---

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

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

## MICOTOXINAS

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

Tabla 1. Hongos productores de toxinas

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

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

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

Existen cuatro grupos mayores de aflatoxinas: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y dos productos metabólicos adicionales, M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>. Estas últimas fueron las primeras aisladas de la leche de animales lactando. La designación B resulta de la exhibición de fluorescencia azul bajo la luz UV y la designación G se refiere a la coloración amarillo verdoso también bajo LUV. De *A. flavus* sólo una proporción de los aislados puede producir aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y ácido ciclopiazónico. *A. parasiticus*

produce B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> pero no ácido ciclopiazónico, y casi todos los aislados son toxigénicos. *A. nomius* es morfológicamente similar a *A. flavus* pero, así como *A. parasiticus* produce aflatoxinas B y G sin ácido ciclopiazónico.

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

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

Todos los seres vivos han resultado susceptibles a las aflatoxinas, por ejemplo, algunas bacterias se inhiben en presencia de ellas, ciertas plantas verdes presentan albinismo, y las semillas pierden su capacidad de geminación. El grado de toxicidad varía de acuerdo con la especie afectada por lo que las dosis letales en animales son variables. Se ha reportado que se pueden presentar efectos a dosis que van de 0.5 hasta 20 µg de aflatoxina B<sub>1</sub> por kg de peso corporal (Peña, S. D., *et al.*, 1990). En mamíferos, la aflatoxicosis provoca una amplia variedad de manifestaciones patológicas, como el obstaculizar la síntesis de proteínas, o reaccionar con las macromoléculas y organelos celulares así como de interferir en la producción normal de sistemas enzimáticos, actuando como inhibidores biosintéticos de las rutas metabólicas, "*in vivo*" e "*in vitro*" (Moreau, C., *et al.* 1979). Se ha demostrado que las aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, y M<sub>1</sub> afectan la cadena respiratoria en mitocondrias, además de inhibir la ATPasa lo cual reduce la producción de ATP; además se ha observado que los niveles de glucógeno se reducen (Moss, M. O., *et al.* 1985). El envenenamiento agudo con aflatoxinas causa necrosis y disfunción hepática y extensas lesiones hemorrágicas que resultan letales (Sharma, A., *et al.* 1993; Yeh, *et al.*, 1989; Vargas-Arispu., *et al.*, 1998).

La aflatoxina B<sub>1</sub> es la micotoxina que se ha encontrado con más frecuencia y en altas concentraciones en alimentos. Esta aflatoxina se encuentra dentro de los carcinogénicos más potentes conocidos. La capacidad de la aflatoxina B<sub>1</sub> para producir mutaciones se debe a su habilidad para unirse covalentemente a la guanidina del ADN en la posición N-7 (aducto), afectando a nivel de transcripción; otros investigadores han observado que esta aflatoxina también se une al RNA impidiendo la transcripción (Swensen, *et al.*, 1977).

En 1990, Sabbioni demostró que la aflatoxina B<sub>1</sub> se une con los residuos de lisina encontrados en la albúmina sérica disminuyendo su actividad. También se observó que en el interior de la célula esta aflatoxina se interconvierte en B<sub>2</sub>, la cual se une a aminoácidos libres y enzimas, provocando una reducción de la tasa de producción de proteínas.

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS DE LA AFLATOXINAS

Las aflatoxinas químicamente son compuestos derivados de las isocumarinas (bifuranocumarinas) que pueden estar acopladas a un grupo de ciclopentanona (aflatoxina B<sub>1</sub> y aflatoxina B<sub>2</sub>) ó a un anillo lactónico, (aflatoxina G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>). Presentan la propiedad de fluorecer al ser expuestas a la luz ultravioleta de longitud de 365 nm. Se reconocen actualmente más de 20, siendo las más comunes en los alimentos la aflatoxina B<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub> y aflatoxina G<sub>2</sub>. Estas son solubles en metanol, acetonitrilo, cloroformo pero poco solubles en agua y en hidrocarburos. Son termoestables alcanzando un punto de ebullición por arriba de los 200°C. Todas presentan un efecto teratógeno, mutágeno y cancerígeno, siendo más tóxicas las aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> (Peña, S. D., *et al.*, 1990).

## MÉTODOS DE ANALISIS PARA MICOTÓXINAS

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

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

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

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

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

## MÉTODOS DE DESCONTAMINACIÓN

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

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

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

La biotransformación microbiana es otro método prometedor que ha sido estudiado recientemente, para eliminar aflatoxinas. Esta constituye una forma de degradación no tóxica ya que utiliza microorganismos normales del tracto gastrointestinal. Otros grupos de investigación han estudiado hongos capaces de hidroxilar esteroides para eliminar aflatoxina B<sub>1</sub> (Erber, E. *et al.*, 1995). Los microorganismos que se incluyen son bacterias, actinomicetes, levaduras, moho y algas que pueden degradar aflatoxinas. Por ejemplo, *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, en solución acuosa puede irreversiblemente metabolizar y degradar aflatoxinas B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, y M<sub>1</sub>, o *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* y *L. plantarum* que se usan para prevenir el crecimiento del moho o para degradar aflatoxinas (Ellis, O. W., *et al.*, 1991)

## LEGISLACIÓN

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

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

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

## OCURRENCIA DE AFLATOXINAS EN MÉXICO

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

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

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

## **OTRAS ALTERNATIVAS PARA CONTROLAR AFLATOXINAS**

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

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

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

También existen antioxidantes como selenio, vitamina C, E y A, y carotenoides (caroteno y xantofilita) que actúan contra los daños que provocan las aflatoxinas, ejemplo como quimiopreventivos o protectores contra la formación de aductos (DNA-AFB<sub>1</sub>), antihepatotóxicos, antimutagénicos o anticancerígenos y anticitotóxicos (Shi, *et al.*, 1994; Webster. *et al.*, 1996; Coelho, M., 1996; Okotie, E. *et al.*, 1997; Rauscher, *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que ciertos componentes alimenticios y aditivos también presentan características anti-aflatoxigénicas, como el ácido elágico y el butilato hidroxitoueno, los cuales disminuyen la carcinogenesis y la mutagenesis inducida por aflatoxinas, al igual que otros aditivos alimenticios e ingredientes activos como el tumérico. Se ha encontrado también que compuestos de algunas plantas también tienen efectos inhibitorios sobre AFB<sub>1</sub> como el S-metilmetanotiosulfonato, que se encuentra en el jugo de col y cebolla (Cavin, C. *et al.*, 1998), los diterpenos, cafestol y kahweol y el ácido caféico presente en granos de café tostado y verde que actúan como agentes quimioprotectores contra la unión covalente de metabolitos AFB<sub>1</sub> a DNA de ratas (Manson. *et al.*, 1997). También se encontró que las piperinas y la cumarinas actúan como agentes protectores potenciales contra efectos carcinogénicos provocadas por las AFB<sub>1</sub> (Reen *et al.* 1997; Hault, R. J., *et al.* 1996; Goeger. D. *et al.*, 1998). La clorofila y sus derivados también presentan actividad quimiopreventiva contra AFB<sub>1</sub> (Breholt, V. *et al.*, 1995; Dashwood, R., *et al.* 1998)

## UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMO ANTIFÚNGICOS

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

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

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

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

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

En 1988, Paster y col. observaron que el extracto del tallo de olivo poseía actividad antifúngica y bactericida debido a que contenía ácidos cafeícos, algunas catequinas, cumarinas y ácido p-, o-, ó m- cumárico. Sólo el ácido cafeíco y las o-cumarinas inhibían la producción de aflatoxinas en *Aspergillus flavus*, determinando que la producción de aflatoxinas no está relacionada con el crecimiento del hongo (Paster, N. et al., 1988). En 1999 Mahmoud, al estudiar extractos de plantas Egipcias como *Lupinus albus*, *Ammi visnaga* y *Xanthium pungens*, determinó que se inhibía el crecimiento y la producción de aflatoxinas en *A. flavus*, indicando que eran procesos correlacionados, pero sí afectó la relación en proporción de aflatoxina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Mahmoud, A. L. 1999)

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

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

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

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

Un año después, en 1994 se encontró que los aceites esenciales de canela, tomillo, orégano y comino eran capaces de detener el crecimiento micelial, así como la síntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Tantaoui-Elaraki, A. and L. Beraoud, 1994). En este mismo año se hicieron estudios en sapos (*Bufo regularis*) con tumores inducidos por aflatoxinas, y observaron que al alimentarlos con ajos la incidencia de los tumores se reducía en un 3-9%, por lo que, con este estudio se especuló que uno o mas compuestos del ajo podían inhibir la carcinogenesis inducida por aflatoxina B<sub>1</sub> (el-Mofty, M. *et al.*, 1994). Así también, el extracto de nuez (*Semecarpus anacardium*) demostró ser efectivo en la reducción del hepatocarcinoma inducido por AFB<sub>1</sub> (Premalatha., *et al.* 1997). También se demostró que la administración del extracto metanólico de *Piper argyrophyllum* revertía los efectos genotóxicos de la AFB<sub>1</sub> en las células de ratas, y que extractos de *Thonninga sanguinea* eran capaces de proteger contra la hepatotoxicidad aguda ocasionada por esta aflatoxina a ratas (Kusamram, *et al.*, 1998).

Carnosol y el ácido carnosico, dos polifenoles naturales encontrados en *Rosmarium officinalis* L., son potentes inhibidores de la formación de aductos de DNA inducidos por AFB<sub>1</sub> *in vitro* (Kusamram, *et al.*, 1998).

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

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

Se han reportado que los extractos etanólicos de un concentrado de *Cassia senna* inhibía los efectos mutagénicos *in vitro* de AFB<sub>1</sub> cuando se aplicaba a bajas concentraciones. Además, se estableció que los compuestos responsables de la actividad fueron aglicones-antraquinones y los glicósidos naptopirone (Dankan *et al.*, 1994).

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

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

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

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

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

En el 2000, Kim y col, investigaron la soya coreana la cual poseía ácido linoleico, el cual confiere capacidad para inhibir la síntesis de aflatoxinas sin afectar el crecimiento micelial (Kim, J. G. *et al.*, 2000). En este mismo año se demostró que el kolaviron un antioxidante que es considerado dentro del grupo de flavonoides, podía ser un quimiopreventivo potencial al inhibir la acción citotóxica y genotóxica de la AFB<sub>1</sub> en humanos (Nwankwo, J. O. *et al.*, 2000).

En el 2001, se realizaron investigaciones sobre extractos de la raíz de *Scutellaria baicalensis* y flavonoides sobre la aflatoxina B<sub>1</sub> oxidando enzimas del citocromo P450 en el hongo, y se determinó que tenía un efecto específico sobre CYP1A1/2 (enzima que da lugar a la formación de AFM<sub>1</sub>). También se ha establecido que la *Salvia miltiorrhiza* previene la hepatocarcinogenesis inducida por AFB<sub>1</sub> (Liu, J. *et al.*, 2001). Además, se ha determinado que *Tamarix ramosissima* posee sustancias polifenólicas que actúan como antioxidantes, antibacterianos y antifúngicos (Sultanova, N. *et al.*, 2001).

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

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

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

Los compuestos químicos que contiene esta planta son, aluminio, beta-caroteno, calcio, carbohidratos (60%), clorine, cobalto, grasas (3%), fibras (10%), hierro, magnesio, NDGA (ácido nordihidroguaiarético), fósforo, potasio, proteína (10%), selenio, silicón, sodio, sulfuro y vitamina C. ([http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers\\_2000kromegel.html](http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en570/papers_2000kromegel.html)).

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

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

Además de haber establecido su actividad antiamebiana es debida a que contiene antioxidantes flavonoides ([http://www.bccancer.bc.ca/pg\\_q\\_05.asp?PageID=1677&ParentID=2](http://www.bccancer.bc.ca/pg_q_05.asp?PageID=1677&ParentID=2)).

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

Desde hace mucho tiempo una de las prácticas comunes en la agricultura para solucionar esta problemática, es el uso indiscriminado de plaguicidas que superan los 10 millones de toneladas anualmente; los fungicidas cubren un 18% del volumen total. Sin embargo, un reporte de la Academia Nacional de Ciencia (NAS) de los Estados Unidos sobre residuos de plaguicidas en los alimentos, estableció que los fungicidas poseen mayor riesgo carcinogénico que los insecticidas y herbicidas juntos. Esta situación deja en claro la necesidad de nuevas y mejores alternativas para la erradicación de plagas en cultivos agrícolas con modos de acción que sean más seguros para el hombre y su entorno biológico (Wilson, G., 1998). Entre estas alternativas está el uso de compuestos naturales que pueden ser aplicados en el campo (Reyes, F. R., *et al.*, 1. 2001). Por tal motivo en este trabajo se contempló el estudiar la Gobernadora (*Iarrea tridentata*) y poder establecer si posee compuestos con actividad antifúngica y antiaflatoxigénica.

## HIPÓTESIS

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

## OBJETIVOS

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

## MATERIAL Y MÉTODO

### SE UTILIZARON LAS CEPAS

*Aspergillus flavus* SRRC 1059

*Aspergillus flavus* SRRC 1273

*Aspergillus flavus* SRRC 1299.

*Aspergillus parasiticus* SRRC Su-1

*Aspergillus parasiticus* SRRC 148

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

### PLANTAS Y MAÍZ UTILIZADOS.

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

### INÓCULO.

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

### OBTENCIÓN DEL EXTRACTO.

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

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

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

### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS.**

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

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

Se utilizaron tubos de 18 por 150 mm con 2 ml de medio Czapek-Dox (Difco) y/o A&M (por litro; Sacarosa 50.0 g, 3.0g (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 10.0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.0g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.7mg de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 0.5mg de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10.0 mg de Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.3 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.11 mg de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 17.6 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (Cotty P. J. 1988) y se inocularon con una concentración de conidias de 1X10<sup>3</sup> por ml. A esto tubos se les agregaron diferentes concentraciones de los extractos, iniciando con concentraciones de 1  $\mu$ g/ml con incrementos de 5 $\mu$ g/ml, y después se ajustó la CMI utilizando intervalos de concentraciones bajas. Se

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

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

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

## **EFFECTO DEL EXTRACTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS.**

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

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

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

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

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

Se separaron las fracciones de diclorometano y agua. A la fracción de diclorometano se le añadió 1.5 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y la fracción acuosa se desechó. La fracción con el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  se filtró y concentró con papel Whatman #5 en rotavapor a una temperatura de 30 a 40°C. Este concentrado se resuspendió en 10 ml de acetonitrilo (Wheeler, H. M., D. Bhatnagar and M. G. Rojas., 1989) y se hizo pasar por una columna de 3 ml Supelclean™ LC-18 SPE para su purificación y concentración. De la solución eluida se desechó el acetonitrilo y las aflatoxinas adheridas a la columna se eluyeron con 5 a 6 ml diclorometano, se secó a 45°C, y después se resuspendió en 3 ml de acetonitrilo para realizar su cuantificación por HPLC.

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

## B) EN MAÍZ.

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

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

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

## **CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS POR HPLC.**

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

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

## **SEMICARACTERIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO.**

### **A) BIOAUTOGRAFÍA**

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

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

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

#### B) CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA NORMAL.

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

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

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

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

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

### **CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL ÁCIDO NORDIHDROGUAJARÉTICO (NADG) EN MEDIO A&M.**

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

## RESULTADOS.

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ANALIZADOS.

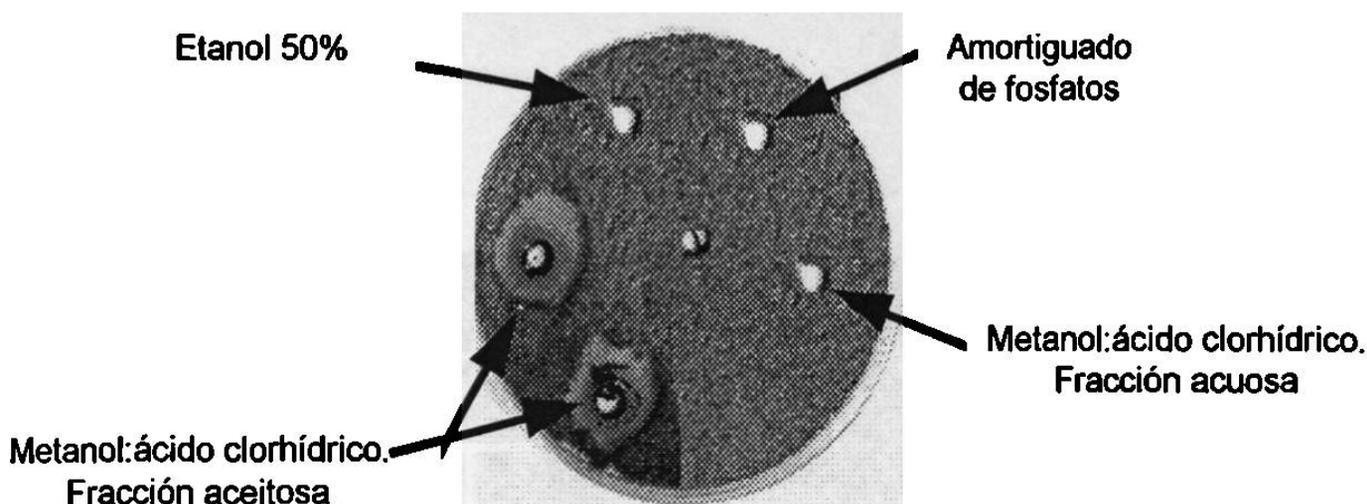
Se probaron 3 tipos de extracciones, con etanol al 50%, amortiguador de fosfatos pH 7 y metanol:ácido clorhídrico 0.1N (3:1), para determinar cual mostraba efecto inhibitorio sobre las cepas analizadas. Se consideraron positivos aquellos extractos que mostraron halos de inhibición del crecimiento alrededor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

Tabla 1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS.

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

ND: No presentó halos de inhibición.

+: Si presento halos de inhibición.



**FIG. 1**

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

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

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

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

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

Tabla 3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN MAÍZ.

Maíz H-437	<i>Aspergillus flavus</i> ( $\mu\text{g/g}$ )			<i>Aspergillus parasiticus</i> ( $\mu\text{g/g}$ )	
	1299	1273	1059	Sv-1	148
Concentración	$21.7 \pm 2.58^*$	$21.7 \pm 3.42$	$20.0 \pm 2.24$	$20.8 \pm 3.03$	$24.2 \pm 1.29$

\*Desviación estándar de la media.

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

### A) CURVA ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS.

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

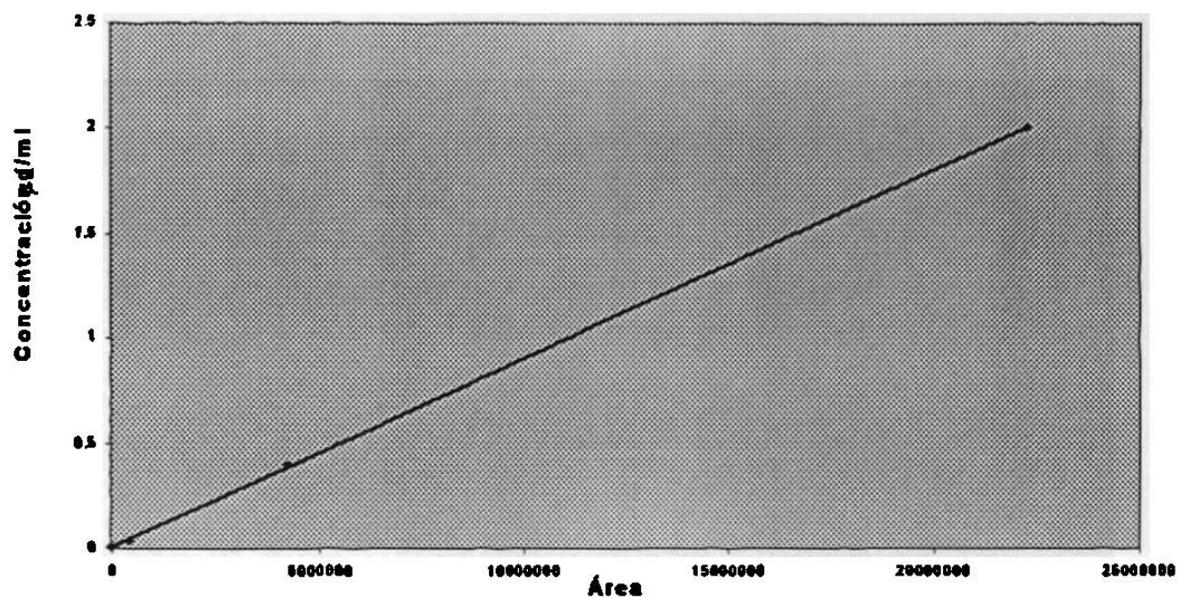


Figura 2. Curva de calibración del estándar de aflatoxina G<sub>1</sub>.

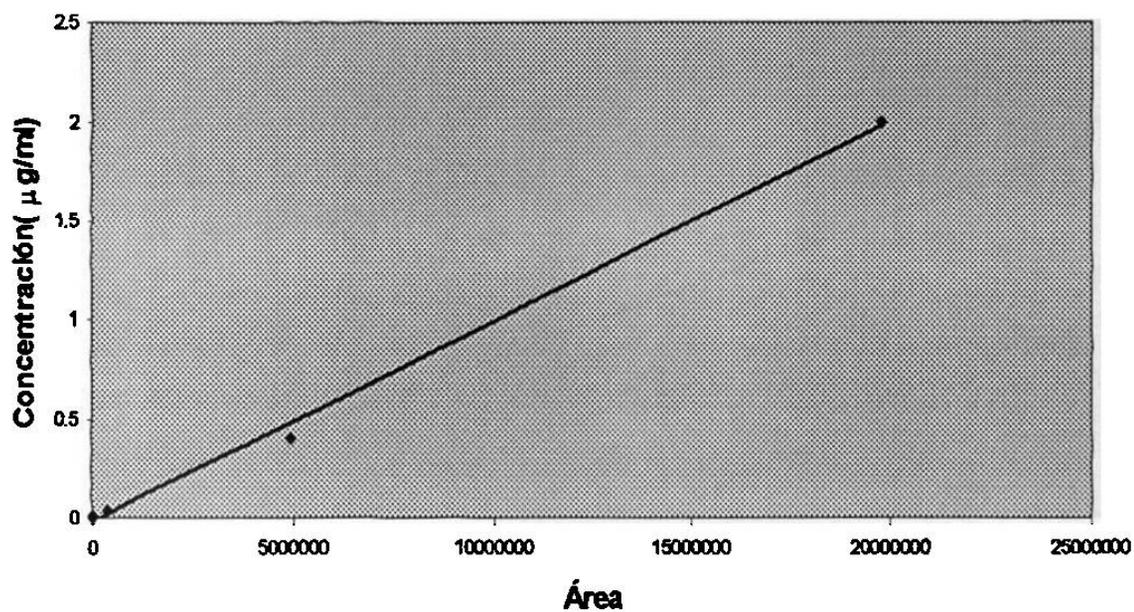


Figura 3. Curva de calibración del estándar de aflatoxina G<sub>2</sub>.

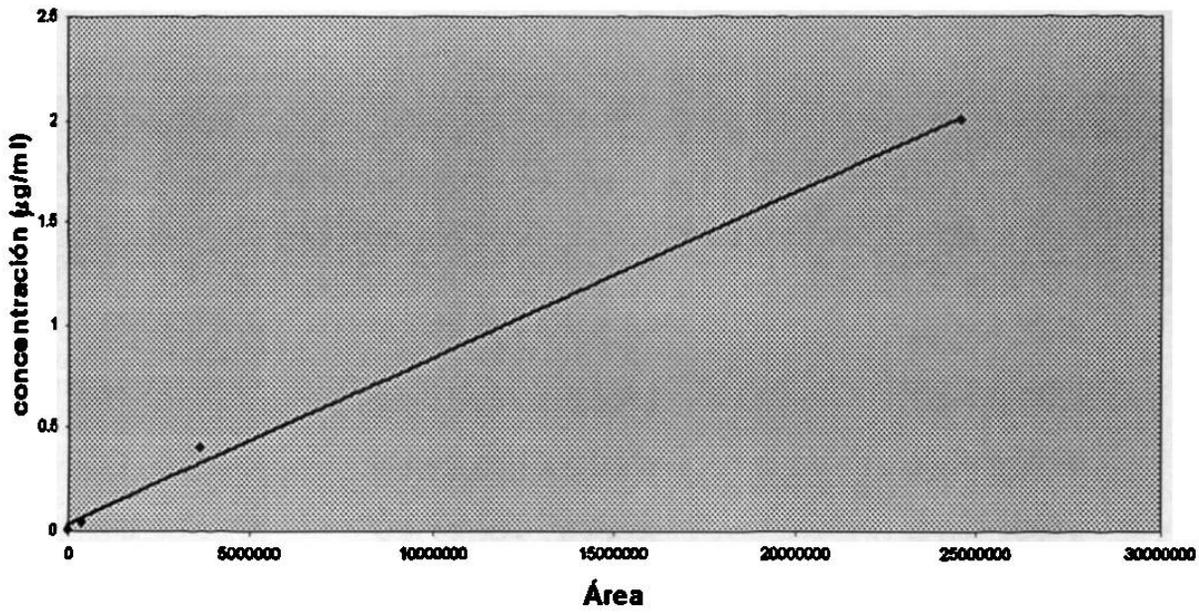


Figura 4. Curva de calibración del estándar de aflatoxinas B<sub>1</sub>.

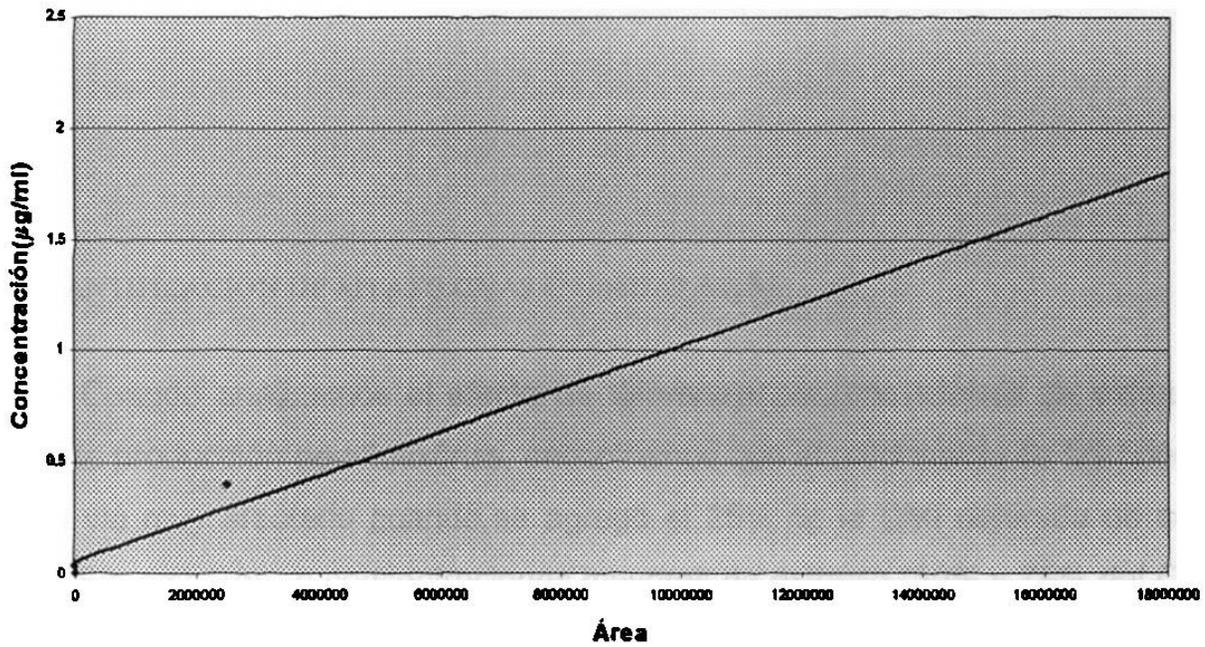


Figura 5. Curva de calibración del estándar de aflatoxina B<sub>2</sub>.