

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

Aflatoxina	Ecuación de la recta.	Coefficiente de correlación.
B ₁	$Y = 8E-08x + 0.0285$	R2 = 0.9975
B ₂	$y = 1E-07x + 0.0486$	R2 = 0.9948
G ₁	$y = 9E-08x + 0.0078$	R2 = 0.9999
G ₂	$y = 1E-07x - 0.0158$	R2 = 0.9971

B) CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN MEDIO A&M.

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

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

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

c) CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN MAÍZ.

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

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

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

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

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

*Desviación estándar de la media.

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

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

*Desviación estándar de la media.

SEMICARACTERIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO.

A) BIOAUTOGRAFÍA.

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

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



Aspergillus flavus 1059
 $R_f = 0.66 \pm 0.07$
Polar

FIGURA 6.

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

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

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

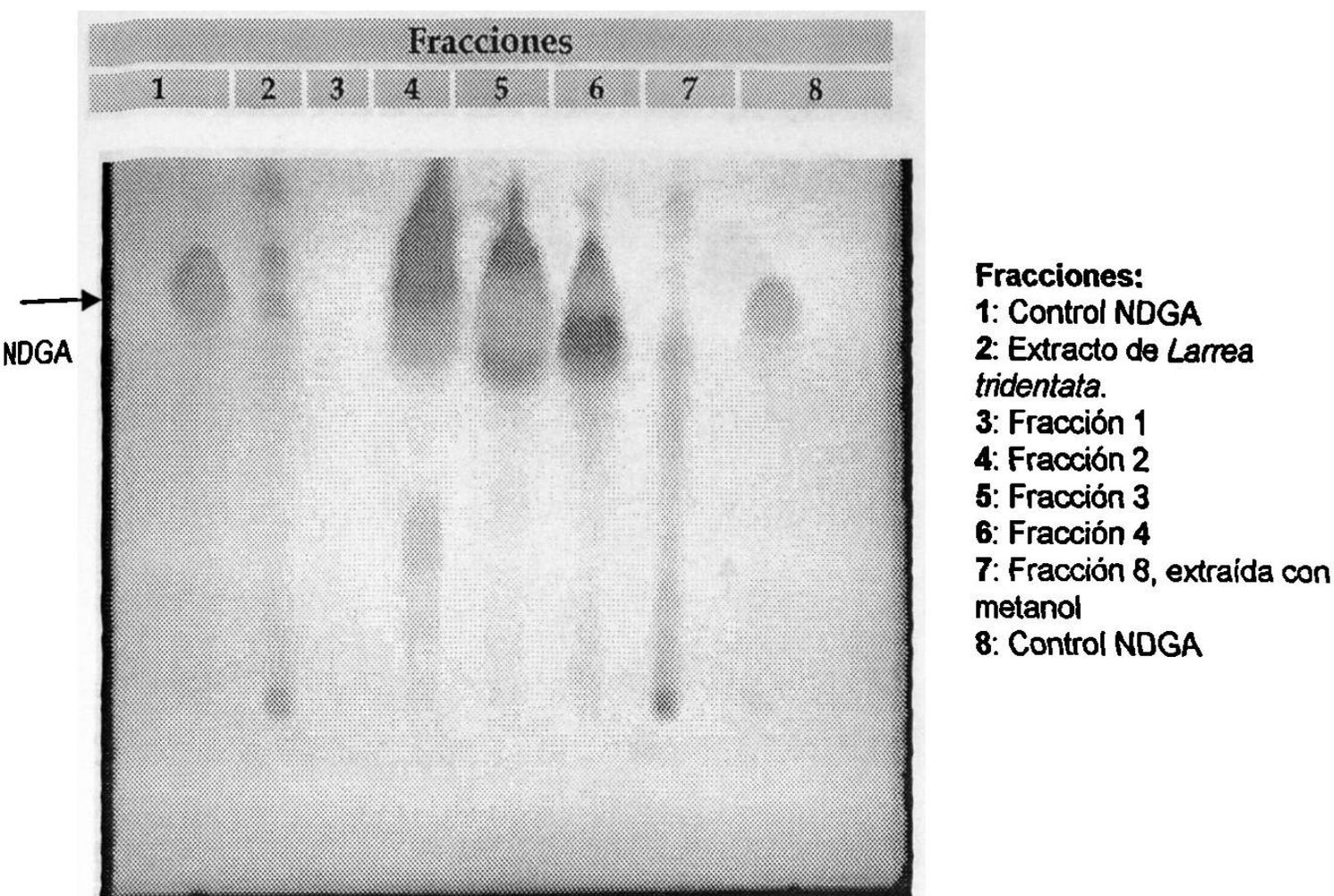


FIGURA 7.

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