1. INTRODUCCIÓN

A principios de 1960 los hongos del grupo de *A. flavus* fueron reconocidos como productores de aflatoxinas (*Aspergillus flavus* toxins). Estas últimas envenenaron a miles de aves de corral, puercos y truchas (Cotty, P. J., *et al*, 1994). Estas micotoxinas son un serio problema para la salud humana y animal (Villarreal, M. H., 1992). Debido a su estructura se les clasifica dentro de las difuranocoumarinas. Los estudios toxicológicos han demostrado su actividad carcinogénica, hepatotóxica, mutagénica, teratogénica e inmunosupresora (Acuña, A. K., 1991).

Las micotoxinas abarcan un amplio espectro de diferencias químicas y estas pueden afectar muchos órganos y sistemas blancos, notablemente al hígado, riñón, sistema nervioso o sistema endocrino y sistema inmune. Su presencia puede algunas veces ser reducida por mejoramientos en prácticas agrícolas, tales como por modificaciones de semillas, proveyendo mejores condiciones de almacenamiento o por procesos de manufactura. No hay evidencia de que los humanos se hayan adaptado a la presencia de estas sustancias químicas naturales en alimentos no más que a la presencia de químicos hechos por el hombre, tales como pesticidas u otros contaminantes químicos de los alimentos (Kuiper-Goodman, T., 1995).

La contaminación de productos agrícolas por mohos es un fenómeno muy frecuente, ya que las esporas de estos microorganismos están ampliamente distribuidos en el ambiente (Garza, R. J. S., 1976). En un principio, los hongos del género *Aspergillus*, eran considerados como de almacén. Posteriormente se ha comprobado su presencia en campo, y más recientemente se ha encontrado que es sistémico en maíz (Villarreal, M. H., 1992).

El maíz es un grano básico en la alimentación de millones de mexicanos. La presencia de AF como contaminantes del maíz es un reto que impone revisar los métodos empleados en su erradicación y crear procesos que liberen a ese cereal del contagio (Peña, D. S., y B. M. Durán, 1990). Se ha demostrado que altos niveles de AF pueden presentarse debido a la contaminación de un número pequeño de semillas. Por ejemplo, se ha estimado que solo una nuez contaminada en 28,250 una almendra en 26,500 y un pistacho en 25,000 pueden originar altos niveles de contaminación de AF. Así, un solo pistacho con una concentración de AF de 60,000 p.p.m. puede contaminar 4.5 Kg. aproximadamente 3,000 nueces. El nivel máximo permitido por la F.D.A. es 20 p.p.m. (Mahoney, N. E. and S. B. Rodriguez, 1996). Tanto la industria como la medicina se interesan respectivamente en estos hongos, por las perdidas económicas debido a la contaminación del grano, o por las enfermedades que producen (Taylor, J. W., 1995).

Las plantas son una gran fuente de nuevos compuestos activos biológicamente. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de las plantas estimadas entre 400,000-500,000 alrededor del mundo ha sido investigado fitoquímicamente y la búsqueda de su efecto biológico aún menor (Hostettmann, K. & J. L. Wolfender, 1997).

Estos componentes pueden ser usados en la preservación de comida almacenada y para el control microbiológico de enfermedades de plantas en cultivos de importancia económica (March, C., *et al*, 1991).

El presente trabajo se realizó para investigar el efecto de varias especies de *Agave* de la región. con el fin de aportar alternativas para obtención de agentes biocidas contra los hongos aflatoxigénicos.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Biología del Género *Aspergillus.*

Por siglos ha sido bien conocido que comer especies particulares de hongos pueden causar daño o muerte, pero es relativamente reciente el reconocimiento de que algunos hongos que dañan los alimentos son responsables de enfermedad o muerte de animales o humanos. Aunque ha sido bien conocido desde 1940 que especies de *Penicillium* fueron la fuente de toxicidad en arroz "amarillo" en Japón. Las toxinas fúngicas y otros agentes semejantes ya se conocían desde hacía tiempo, pero la gran importancia de estas sustancias no fue del todo apreciada, sino hasta la famosa epidemia X del pavo entre 1960 y 1961. En Inglaterra, primero los pavos y después los cerdos, pollos y ganado bovino, fueron afectados con diversas deformaciones y disfunciones de sus sistemas orgánicos (Rippon, J. W., 1990).

La causa de este desastre fue por trazas de harina de cacahuate en el alimento, el cual estaba muy contaminado con *A. flavus*. Los análisis del alimento revelaron que un grupo de compuestos mas tarde denominados AF, fueron responsables de este brote, por la muerte de un gran numero de patos en Kenya, y por hematoma ampliamente distribuido en tortugas en California los cuales ocurrieron mas o menos simultáneamente (Hocking, A. D., 1997).

Aspergillus fue descrito apenas hace 300 años y es un género importante de hongos. Aunque algunas especies han sido usadas en la producción de alimentos (ej.: *A. orizae* en la elaboración de la soya), los miembros del grupo *A. flavus* se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y son regularmente aislados del suelo (particularmente de áreas tropicales y subtropicales), de forraje y vegetación en

descomposición, de semillas almacenadas y granos, y de varios tipos de productos alimenticios (Raper, K. B., and D. I. Fennell.,1965).

Existen alrededor de 900 especies dentro del género *Aspergillus*, siendo los hongos más comunes en todos los ambientes. En forma común están en el suelo y en la vegetación en descomposición de todo el mundo, pero también en todo tipo de desechos orgánicos: alimentos descompuestos, pinturas mojadas, bolsas de diálisis rotas, lentes de contacto blandos, medicamentos cuyo recipiente se abrió, paredes de refrigeradores, líquidos para aseo, polvo de las construcciones, interior de los conductos de aire, aderezos usados, etc. (Rippon, J. W., 1990).

La habilidad del *Aspergillus de* crecer en diferentes substratos bajo un rango amplio de condiciones del medio ambiente le ha permitido a algunos de ellos colonizar tejidos de animales vivos y muertos. Su invasión a tejidos vivos es responsable de muchas formas de enfermedad en animales de sangre fría y caliente incluyendo al hombre, pero su parasitismo debe siempre ser referido como un incidente de su ciclo de vida saprofítico normal en la naturaleza, el cual involucra germinación de la espora, colonización del substrato fructificación y diseminación por aire.

Para que los hongos sobrevivan no es necesario la producción de metabolitos tóxicos para animales o humanos cuando son ingeridos por éstos, ni la reacción alérgica cuando son inhalados o por contacto, ni la colonización del hospedero (Raper, K. B., and D. I. Fennell.,1965).

Casi 50 especies de *Aspergillus* han sido enlistadas como capaces de producir metabolitos tóxicos, pero las micotoxinas de *Aspergillus* de mayor importancia en alimentos para consumo humano y animal son las AF (Hocking, A. D., 1997).

Las AF son derivados de difuranocoumarinas. Las AF B_1, B_2, G_1, y G_2 son producidas en la naturaleza por hongos discutidos anteriormente. Las letras B y G se refieren a los colores con que fluorescen azul (blue) y verde (green), respectivamente observados bajo ondas largas de luz UV, y los sufijos $_1$ y $_2$ son referidos de acuerdo a su patrón de separación en placas de CCD. Las AF M_1 y M_2 son producidas de su respectiva AF por hidroxilacion en animales lactantes y son excretadas en leche (Fig. No. 1) (Ellis, W. O., *et al*, 1991).

Tabla No.1. Micotoxinas, toxicidad y especies productoras.

Micotoxinas	Toxicidad	Especies productoras
AF B_1 y B_2	Daño en el hígado, cirrosis, carcinogenesis (hígado), teratogénesis, inmunosupresor	*A. falvus, A. parasiticus, A. nomius*
AF G_1 y G_2	Efecto similar a las AF B: La toxicidad de G_1 es menos que la de B_1 pero mayor que la de B_2	*A. parasiticus, A. nomius*
Acido ciclopiazónico	Degeneración y necrosis de varios órganos, tremogénicos, baja toxicidad oral.	*A. flavus*
Ocratoxina A	necrosis de riñón (especialmente en puercos), teratogenico, inmunosupresivo, carcinogénico.	*A. ochraceus* y epsecies relacionadas
Esterigmatocistina	Daño agudo al hígado y al riñón, carcinogénico.	*A. versicolor, Emericella spp.*
Fumitremorgenos	Tremorgénicos a ratas y ratones	*A. fumigatus*
Territrems	Tremogénicos a ratas y ratones	*A. terreus*
Triptoquivalinas	Tremorgénicos	*A. clavatus*
Equinulinas	Pérdida de apetito en puercos	*Euritium chevalieri. E. ambstelodami*

2.2. Biología de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus.*

Sin duda, el grupo más importante de *Aspergillus* toxigénicos son los hongos aflatoxigénicos, *A. flavus, A. parasiticus* y el recientemente descrito pero mucho menos común la éspecie *A. nomius,* las cuales todas son clasificadas en *Aspergillus* sección *Flavi.* Aunque estas tres especies son muy relacionadas y tienen muchas similitudes, un número determinado de características pueden ser usadas en su diferenciación (Tabla No 2) (Klich, M. A., and I. Pitt., 1988). *A. flavus* puede producir AF B_1 y B_2 y ácido ciclopiazónico, pero solo una proporción de los aislados son toxigénicos. *A. parasiticus* produce aflatoxinas B_1, B_2, G_1, y G_2 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 AF B y G sin ácido ciclopiazónico (Hocking, A. D., 1997).

Tabla No 2.

Diferencias y homologías de morfología entre especies que productoras de AF.

Especies	Conidios	Esclerocios	Toxinas
A. flavus	Suaves a moderadamente rugosas, variables en tamaño	Largas y globosas	AFB_1, AFB_2, ácido cliclopiazonico
A. parasiticus	Frecuentemente rugosas, ligera variación en tamaño	Largas y globosas	AFB y AFG
A. nomius	Similar a *A. flavus*	Pequeñas, elongadas (forma de bala)	AFB y AFG

2.3. Biología de Aflatoxinas.

2.3.1. Estructura y Biosíntesis.

Fig. No. 1. Estructura de las AF.

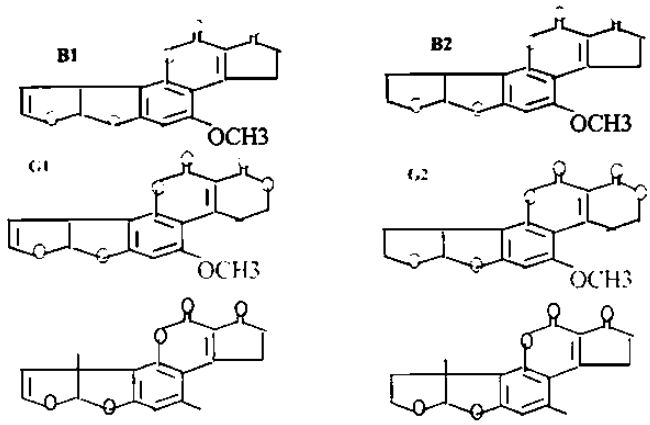
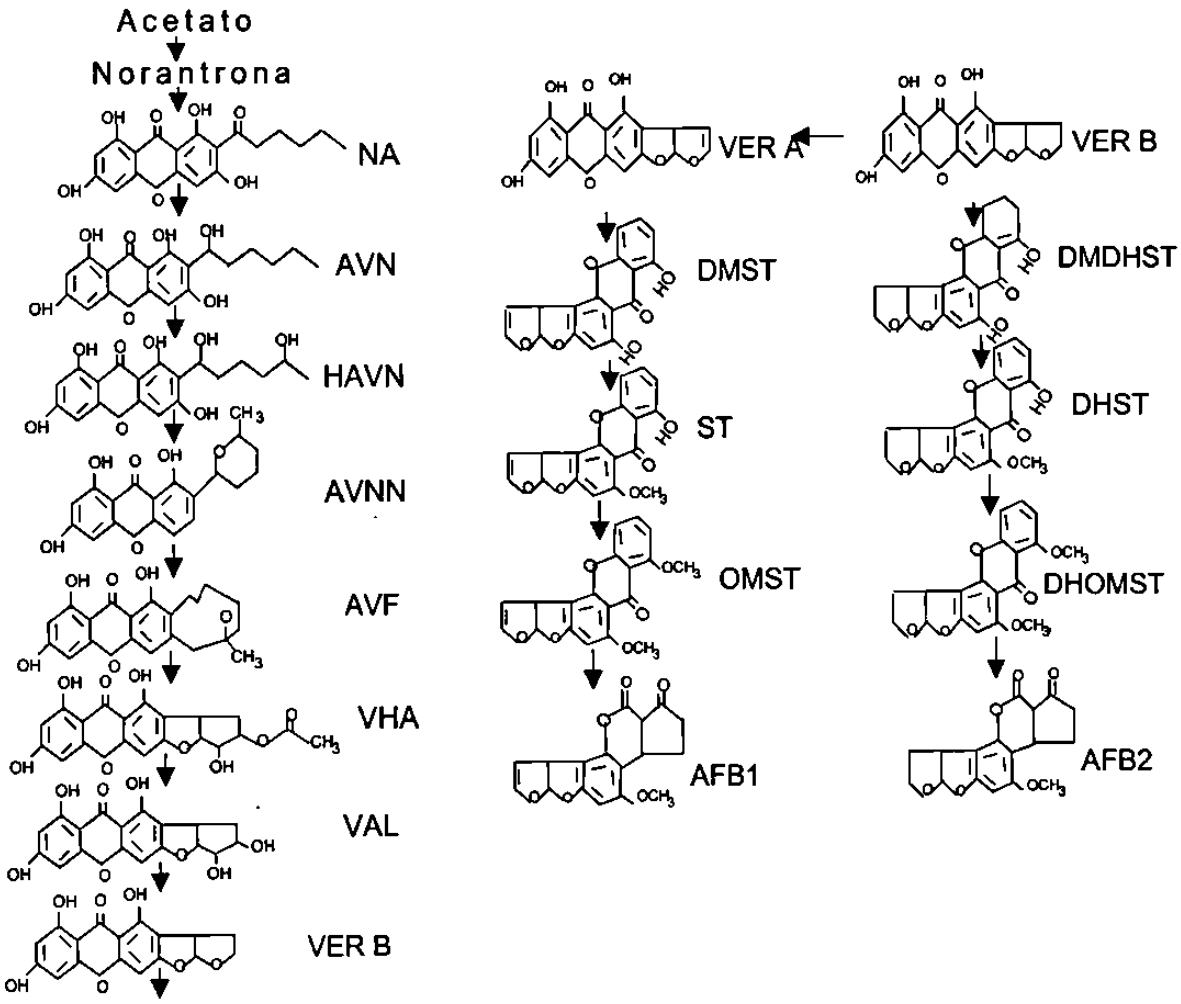


Fig. No. 2. Biosíntesis de las AF.



2.3.2. Toxicidad de AF:

Los efectos de las AF pueden ser divididos en bioquímicos y biológicos. Bioquímicamente las AF pueden afectar al metabolismo energético, al de carbohidratos y lípidos, y al de Ac. Nucleicos y proteínas. Los efectos biológicos (carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos y aflatotóxicos) de las AF son influenciados por la variación de la especie, sexo, edad, nivel nutricional y los efectos de otros químicos.

Las AF son tóxicas aguda o crónicamente tanto para animales como humanos, producen daño agudo al hígado, cirrosis hepática, inducen tumores, son teratogénicas, tienen efectos inmunosupresivos. La aflatoxicosis es el mayor síndrome asociado con AF y puede presentarse en aflatoxicosis primaria (aguda o crónica) y secundaria, las cuales se diferencian en cuanto a las concentraciones de AF ingeridas y los periodos de estas si son frecuentes, moderados, si causan muerte o daño a órganos (Ellis, W. O., *et al*, 1991). Raramente se da la aflatoxicosis aguda en humanos; sin embargo, se han reportado algunos brotes en 1967, 26 personas en dos comunidades granjeras en Taiwan tuvieron daño con un alimento aparentemente envenenado, 19 fueron niños, 3 de los cuales murieron (Hocking, A. D., 1997).

Indiscutiblemente, el mayor impacto de las AF en la salud humana es por su potente inducción al cáncer hepático. Las AF y el virus de la a hepatitis B son aparentemente co-carcinógenos, y la ocurrencia de ambos predispone grandemente la ocurrencia de cáncer de hígado en humano. Hay una correlación positiva entre el nivel de AF en la dieta y el carcinoma hepatocelular primario (PHC) (Chu, F. S., 1991).

2.3.3. Mecanismo de Acción:

La aflatoxina B1 es metabolizada por el sistema de función de oxidación microsomal en el hígado, permitiendo la formación de intermediarios altamente reactivos (carcinogénicos potentes que forman aductos con ADN), frecuentemente resultan mutaciones por transverciones de G a T (Jae-Hyuk, Y., *et al*, 1996), interrumpiendo la transcripción y proliferando células anormales, permitiendo la mutagénesis o carcinogénesis. Las AF también inhiben la toma de oxígeno en los tejidos por actuar en la cadena transportadora de electrones e inhibir varias enzimas, resultando en el decrecimiento de la producción de ATP.

2.3.4. Detección de Toxina:

Las AF pueden ser detectadas por métodos químicos o biológicos. La determinación de AF ha sido estandarizada. Las muestras son extraídas con solventes orgánicos tales como cloroformo o metanol en combinación con pequeñas cantidades de agua. Para su limpieza los extractos son pasados por columnas de silica gel o por cartuchos de separación apropiados. Los extractos son entonces concentrados, usualmente por evaporación bajo nitrógeno, y separados por cromatografía en capa delgada (CCD) o por cromatrografia líquida de alta resolución (CLAR).

En los últimos años se ha simplificado la detección de micotoxinas, debido al reconocimiento oficial de los métodos inmunólogicos. La cuenta de hongos son aún incluidas en los requerimientos de control de calidad para muchos alimentos. Los métodos tradicionales han sido usados para determinar la presencia de hongos que son tardados, trabajosos, y caros; requiere de micólogos expertos; y sobre todo no permite la especificación de las cepas micotoxigénicas. La detección de hongos aflatoxigénicos

en granos por PCR es relativamente rápida, reproducible y altamente específica (Shapira, R., *et al*, 1996).

2.3.5. Ocurrencia de AF:

A. flavus está mas ampliamente distribuido en la naturaleza que *A. parasiticus*. Ambos tienen una gran afinidad por nueces y aceites esenciales. Entre los que figuran de mayor importancia son maíz, cacahuate, y semillas de algodón (Diener, U. L., *et al*, 1987), y en muchas instancias, la invasión toma lugar antes de la cosecha y no durante el almacenaje como se creía.

Los cacahuates se contaminan cuando están aun en el campo, sobre todo si sufren algún estrés o factores relacionados. El daño por insectos de los granos de maíz, permite la entrada de hongos aflatoxigénicos, pero la invasión puede también ocurrir a través de gusanos. Las semillas de algodón son infectadas a través de néctares.

Los niveles de AF son raramente significantes en los cereales y especias, pero la producción de AF en estos productos se facilita por un secado, manejo, o almacenaje deficiente. Cantidades significantes de AF pueden ocurrir en cacahuates, maíz, y otras nueces y semillas de oleaginosas (Diener, U. L., and N. D. Davis, 1966), particularmente en algunos países tropicales donde el maíz puede crecer bajo condiciones marginales y donde las facilidades de secado y almacenaje son limitadas.

2.3.6. Factores que afectan el crecimiento y la producción de AF:

A. flavus y *A. parasiticus* tienen patrones de crecimiento similares. Las AF pueden ser producidas entre 12 a 40 °C, en grandes cantidades a altos valores de Aw (0.98 a 0.99) (Diener, U. L., and N. D., 1970), y a un pH entre 3.0 y 8.9 para *A. parasiticus* y entre 3.0 y 11.2 para *A. flavus*. La reducción de oxigeno disponible en el empacado en atmósferas controladas puede inhibir la formación de AF por *A. flavus* y *A. parasiticus* en alimentos. La luz inhibe la producción de AF (Bennett, J. W., *et al*, 1978).

2.3.7. Inactivación:

Las AF pueden ser particularmente destruidas por varios tratamientos químicos. Se ha demostrado que los agentes de oxidación tales como ozono y peróxido de hidrogeno remueven AF de harina de cacahuate contaminada. El tratamiento con peróxido de hidrogeno resultó en una destrucción de 97% de AF en harina de cacahuate desgrasada.

El método químico con gas de amonia anhidro a elevadas temperaturas y presión es el mas práctico para destrucción de AF, con un 95 a 98 % de reducción de AF total en harina de cacahuate.

2.3.8. Control.

Las AF son una de las pocas micotoxinas verificadas por legislación. En los Estados Unidos la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) prohibe el comercio de derivados de la leche con mas de 20 p.p.b. de AF y que se venda la leche conteniendo mas 0.5 p.p.b. de AF (Bhatnagar, D., *et al*, 1995).

Los límites impuestos por muchos países son de 5 a 20 mg de AF B1 por Kg. en algunos alimentos para humanos, incluyendo cacahuates y productos de cacahuate. La cantidad permitida en alimentos para carne de vaca varía, pero es permitido arriba de 300 mg/Kg en alimento para ganado y oveja en Estados Unidos. No hay límites establecidos para AF en alimentos para humano como animales en el sur oeste de Asia.

2.4. Inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos

En la actualidad, grupos de investigadores han reportado componentes naturales con actividad antifúngica y antibacteriana.

Buddleja cordata (loganiaceae), conocida como tepozan en México, es un árbol el cual puede crecer hasta 20 m. Sus raíces, corteza y hojas son usados ampliamente en la medicina tradicional para diferentes tipos de enfermedades, tales como disentería e inflamación de ojos y piel, así como diurético y antiséptico, y tiene actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* (Avila, J. G., *et al*, 1999).

Byrsonima crassifolia (L) H.B.K. es un árbol tropical de la familia *Malpighiaceae* ampliamente distribuido en algunas regiones de México, América central y Sur y es popularmente conocida como "nache". Su corteza y hojas son usadas en medicina tradicional para tratar la tos, desorden gastrointestinal, infección de piel y piquete de serpiente. El extracto de hojas y corteza tiene actividad antifúngica, antibacterial y contra dermatofitos, en particular contra *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella thyphi, Shigella flexneri, Staphylococcus aureus, Stapylococcus epidermis, Streptococcus* y *Micrococcus luteus* (Martínez-Vázquez, M., *et al*, 1999).

También los extractos etanólicos de *Garcinia gummi-gutta, Anisomeles malabarica, Aegle marmelos, Alangium salviifolium Zizyphus jujuba* y *Terminalia belberica* mostraron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* y los de *T. Bellerica, G. gummi-gutta* y *A. salviifolium* mostraron además actividad contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Valsaraj, R., *et al*, 1997).

El extracto con butanol de *Ononis spinosa* y *Bryonia syriaca* con 4 mg/ disco tuvieron actividad moderada antifúngica contra *Aspergillus flavus, Fusarium moniliforme* y *Candida albicans* relativamente igual al control de nitrato de miconazol a 40 mg/ disco (Mahasneh, A. M., and A. A. El-Oqlah, 1999).

En 1996 Verástegui (Verástegui, M. A., *et al*, 1996), demostró que los extractos etanólicos de *Agave lecheguilla,* de *Larrea tridentata* y de *Baccharis glutinosa* inhibían el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias. Recientemente se demostró el efecto antifúngico de extractos de *Yucca shidigera* y *Larrea tridentata* contra cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus.* También se observó que esos extractos inhibían la producción de toxina, probablemente como resultado de la falta de crecimiento del hongo (Lozano, G. L., 1997).

2.5. Inhibidores del crecimiento de *Aspergillus* y producción de AF.

2.5.1. Plantas.

Muchos compuestos en la naturaleza han mostrado la inhibición de microorganismos. El reciente incremento de la demanda por extender la vida de los alimentos ha renovado el interés en la explotación de antimicrobianos naturales para el uso como preservadores de estos productos. Por siglos se han utilizado como sazonadores de alimentos y bebidas los extractos de algunas plantas con actividad antimicrobiana. Los ancianos egipcios utilizaban extractos de especies y aceites para conservar alimentos. Plinio, Virgilio e Hipócrates mencionaron que para aliviar enfermedades como indigestión, neumonía, heridas e infecciones se podía utilizar al ajo. Así también civilizaciones antiguas reconocían el potencial antiséptico o antimicrobiano de muchos extractos de plantas (Conner, E. D., 1993).

Mas recientemente se han realizado estudios científicos que validan la actividad antimicrobiana de un sinnúmero de plantas. Con respecto a la actividad antifúngica podemos mencionar los siguientes trabajos.

El extracto obtenido con diclorometano de gobernadora (*Larrea tridentata*), inhibió en un 92% y 86% el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente (Lozano, G. L., 1997). El extracto de epazote rojo (*Chenopodium amrosiodes*) obtenido con diclorometano eliminó en 100% la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* (Vargas-Aispuro, I., *et al*, 1998).

2.5.2. Especias.

En 1974 se observó el efecto inhibitorio de la canela en un hongo productor de AF, reportándose que con un nivel de 1-2% de la concentración de extracto de canela en un caldo de cultivo se permitía el crecimiento de *A. parasiticus* pero se inhibía aproximadamente el 99% de la producción de AF (Bullerman, L. B., 1974). La pimienta negra, clavo y semillas de anís estrella tienen efectos fuertemente inhibitorios en los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* (Hitokoto, H., *et al*, 1978).

2.5.3. Aceites esenciales.

El aceite esencial de semillas de neem (*Azadirachta indica*) inhibió la producción de AFB_1 y el crecimiento de *A. flavus* a 1000 p.p.m., así como el aceite esencial de hojas de *Morinda lucida* (Bankole, S. A., 1997). El aceite esencial de pimienta a una concentración de 200 p.p.m. inhibió el crecimiento y la producción de toxina de *A. parasiticus* (Bullerman, L. B., *et al*, 1977). *A. flavus* fue totalmente inhibido por aceites esenciales de *Syzygium aromaticum, Cinnamomum zeylanicum, Origanum vulgare, Teloxys ambrosioides, Thymus vulgaris, Ocimum basilicum* y *Mentha piperita* (Montes-Belmont, R., and M. Carvajal, 1998).

2.5.4. Compuestos volátiles.

Se encontraron compuestos volátiles altamente tóxicos para *A. flavus* en granos de maíz Híbridos Pioneer 3136 obtenidos de la zona media de una planta de maíz, tales como aldehídos C_4-C_6, benzotiazol, metil jasmonato, y 2-furancarboxaldehido (Zeringue, H. J., Jr., 1997). Compuestos volátiles de hojas frescas de neem particularmente aldehídos monoinsaturados C_3 a C_9 resultaron ser altamente antifúngicos; su efecto en el crecimiento de *A. parasiticus* como en la producción de AF resultó diferente del obtenido cuando se licuó o cuando se hirvió las hojas de neem (Zeringue, H. J., Jr., and Bhatnagar, 1994). El alqueno C_6-C_9, trans-2-hexanal, mostró efecto inhibitorio en el crecimiento de *A. flavus*. Este es liberado como compuesto volátil de hojas de algodón sanas y su concentración se incrementa con el daño mecánico de tejidos (Zeringue, H. J., and S. P. McCormick, 1989). El 3-metil-1-butanol es uno de los olores característicos de colonias vivas de *A. flavus,* es también una substancia volátil de hojas de algodón, y es un compuesto que estimula la producción de AF (Zeringue, H. J., Jr., and S. P. McCormick, 1990).

2.5.5. Oleaginosas.

Las semillas de *Sorghum* contienen pequeñas proteínas en cantidades mínimas las cuales son diferentes de otras proteínas almacenadas y pueden inhibir *in vitro* la germinación de esporas y la extensión de la hifa de la especie aflatoxigénica de *A. flavus* (Ghosh, M. And K. Ulaganathan, 1996). Hay un factor (proteína extraída de la fracción acuosa) que es soluble en agua en el tejido del maíz en la variedad resistente a *A. flavus* (yellow creole) que no está en la variedad susceptible (huffman) (Neucere, J. N., 1996).

2.5.6. Fitoalexinas.

Los compuestos de bajo peso molecular producidos por tejidos de plantas en respuesta al estrés, trauma o infección llamadas fitoalexinas tienen actividad antimicrobiana (Beuchat, L. R., and D. A. Golden, 1989). Los extractos de tejido de óvulo de algodón inoculado con *A. flavus* causó una inhibición significativa de la síntesis de AF por *A. flavus* ya que contiene concentraciones considerables de sesquiterpenos que es un metabolito de estrés antifúngico denominado comúnmente como fitoalexinas (Mellon, J. E. 1992).

2.5.7. Compuestos orgánicos:

El fungicida chlobentiazon a concentraciones arriba de 8 mg/ml inhibió la producción de AF por *A. flavus*. Por otra parte a esta misma concentración *A. parasiticus* continuó produciendo AFB_1 y otras AF y a 15 mg/ml de concentración la producción de AFB_1 se vió incrementada (Wheeler, M. H., *et al*, 1991). El "pentachlorobenzyl alcohol", "phtalide" y "pyroquilon" se requieren a bajas concentraciones para inhibir la biosíntesis de AF y no inhiben fuertemente el crecimiento de *A. flavus* de 1 a 8 mg/ml (Wheeler, M. H. and D. Bhatnagar, 1995).

2.6. Biología del Género *Agave.*

A la Familia *Agavaceae* pertenece el género *Agave* el cual es rico en especies, originario de la América central y profusamente difundido por todo el mundo, particularmente en las regiones soleadas de clima árido o semiárido. La planta es de aspecto típicamente xerófilo y está generalmente constituida por un tronco cortísimo o ausente y por una roseta de hojas muy compactas mas o menos ocultas y alargadas, casi siempre dotadas de robustas espinas. Las flores, en gran numero, se hallan sostenidas por un escapo carente de hojas y reunidas en forma de espiga con ramas multiformes. La floración puede acaecer al cabo de diez años desde el nacimiento de la planta y, una vez que ha florecido esta, generalmente muere. Son profusamente cultivadas en América central y en África para aprovechar la fibra obtenida del parénquima foliar (sisal). Algunas especies, como *A. tequilana* es cultivado cerca de Tequila, Jalisco, el cual es fuente del famoso licor destilado llamado tequila, mediante la extracción de la gema central, de un liquido azucarado de agradable sabor, que fermentado se emplea para obtener bebidas con graduación alcohólica variada, muy difundidas en México (Danae, 1981).

De sobra conocida es la gran importancia económica de las plantas supeditadas al género *Agave* cuyo foco principal de vegetación se halla en México, pero si alguna duda cupiese a este respecto, para desvanecerla bastaría mencionar el henequén, el sapupe, la lecheguilla, el pulque, el tequila, el mezcal, muchos amoles y la mayor parte de los magueyes con las tenaces fibras textiles que se extraen de ellos.

La zona noreste de México corresponde a regiones áridas y semiáridas en donde existe una gran variedad de plantas que presentan una diversidad de adaptación a la

sequía, destacando las del género *A. lecheguilla* el cual se desarrolla en condiciones ecológicas que presentan un suelo con una textura que va de migajón arenoso a limoso, con una cantidad de materia orgánica pobre y un pH moderadamente alcalino. *A. asperrima* se encuentra en asociación con *A. lecheguilla* Torrey (Villarreal-Rivera, L., *et al*, 1991). El *A. lechuguilla* del que se extrae una importante fibra textil, es muy abundante en los cerros calizos de Chihuahua, Tamaulipas, Durango y Zacatecas. También se usa como amole para lavar, merced a su abundancia en saponina y sus hojas son un valioso substituto del jabón. El *A. americana* es una planta que se usa como ornamental y se reproduce naturalmente en California (Sonora) y Arizona (Shreve, F., and I. L. Wiggins, 1980). *A. striata* se distribuye en los Estados de Puebla y Nuevo León, y en el Desierto Chihuahuence.

2.6.1. *Agave americana*:

Es una planta fibrosa de hojas grises, agudas encorvadas hacia arriba en la extremidad, de 2.5 m o menos de largo por 15 o 20 cm. de ancho, provista de una espina seduzca, cónica y algo curva (2.5 cm por 5 mm). Y de dientes triangulares más o menos encorvados, sobre prominencias carnosas, con una separación variable de 1.5 a 5 cm entre uno y otro.

2.6.2. *Agave asperrima*:

Maguey de cerro, se describe con muy pocas hojas, verdes-glaucas, acanaladas, de ambas caras, hasta de 130 cm de alto por 15 o 20 cm de ancho, terminadas en una espina morena, acanalada y punzante de 6 cm o menos de largo, y provista de dientes marginales y encorvados de 1 cm o menos de largo por una separación variable entre ellos de 1.5 a 3 cm, sentados en prominencias carnosas más o menos pronunciadas, flor de 7 a 8 cm en un quiote de 3.5 m. de alto, filamentos insertos en la medianía del tubo tan largo como sus segmentos.

2.6.3. *Agave lecheguilla* también conocida comúnmente como *A. lechuguilla*:

Hojas poco numerosas, azuladas o verde claras, muy fibrosas, con una faja pálida en la cara superior y líneas angostas y verdes-obscuras en el dorso, de 50 cm de largo como promedio por 2 o 3 cm de ancho, termina en una punta acanalada de punta aguzada y pardusca que mide 5 cm o menos de largo, dientes reflejos, triangulares en avanzada edad cenicientos y desprendibles con el margen calloso y recto que los une: miden 7 mm de largo por una separación de 2 a 4 cm; quiote de 3 a 4 m de largo; espiga de 40 a 50 cm; flores amarillentas de 3.5 a 4 cm de largo; semillas pequeñas y lustrosas.

2.6.4. *Agave striata*:

Esta especie se describe con hojas grisáceas, extendidas, rómbicamente biconvexas, algo ásperas en unas orillas, de 60 a 90 cm de largo por unos 5 cm de ancho, con su superficie provista de espacios redondos separados por excavaciones angostas, así como de una espina acicular de 1.5 cm de largo; ovario fuerte, prolongado en el interior del periantilo.

2.6.5. *Agave tequilana*:

Se describe como cortamente caulecente, de hojas azúlado-verdosas o glaucas delgadas y casi planas, de 125 cm o más de largo por 8 o 10 cm de ancho, provistas de una espina rojo-obscura, hasta de 2 cm de largo y de dientes rojizos ganchudos y triangulares, de 3 o 4 mm. de largo con una separación de 1 a 1.5 cm uno del otro. Es utilizado para producir por destilación tequila.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis:

Los extractos de *A. americana, A. lecheguilla, A. tequilana, A. striata,* y *A. asperrima* inhiben el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus.*

3.2. Objetivo General:

Determinar la actividad de diferentes extractos de *A. americana, A. lecheguilla, A. tequilana, A. striata,* y *A. asperrima* sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus.*

3.3. Objetivos Específicos:

1) Determinación de la actividad de los extractos crudos en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus.*

2) Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto que inhiba el crecimiento de los hongos.

3) Determinar el efecto de los diferentes extractos de plantas en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus.*

4) Separar las diferentes fracciones de los extractos que presenten actividad antifúngica por cromatografía en capa delgada.

5) Aislar y caracterizar parcialmente las fracciones con actividad antifúngica

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Inóculo:

Las cepas utilizadas fueron *A. flavus* Link ex Fries SRRC 1299, 1273 y *A. parasiticus* Speare SRRC 148. Estas se cultivaron en APD por 7 días a 28°C. Las esporas se cosecharon en solución salina al 0.85% con Tween 20 al 0.05%. La suspensión de esporas se ajustó a $1x10^3$ esporas / ml. La cuenta de esporas se hizo en cámara de Neubawer (Lynch, M. J., *et al*, 1972).

4.2. Plantas:

Las plantas de *A. americana, A. lecheguilla, A. tequilana, A. striata,* y *A. asperrima* fueron colectadas en Mayo 1998 del desierto Chihuahuense e identificadas por personal de la Universidad Autónoma Chapingo y del Departamento de Botánica de la Facultad de C. Biológicas de la U.A.N.L.

4.3. Obtención de extractos:

10 g de hoja limpiada y cortada se licuó con 50 ml de cada uno de los siguientes solventes: agua, metanol, y etanol. La muestra se mantuvo en reposo por un periodo de 24 h a 60°C, con excepción el acuoso que se mantuvo a 4°C. La suspensión obtenida se filtró con papel Whatman No 5. (Hitokoto, H., *et al*, 1978). Las muestras se secaron a 55°C, se obtuvieron cristales de cada extracto, los cuales se colocaron en viales estériles y se mantuvieron a temperatura ambiente en lugar seco. Para analizar el extracto se diluyó en agua destilada estéril en proporción 1:10.

4.4. Análisis preliminar de inhibición:

La actividad inhibitoria del crecimiento de *A. flavus y A. parasiticus* se evaluó utilizando cajas con medio agar papa dextrosa (APD), las cuales fueron inoculadas con los microorganismos en la superficie del agar. Después se realizaron perforaciones en el agar de 0.5 cm de ancho y profundidad. Estos posteriormente se rellenaron con distintos extractos disueltos en agua destilada estéril 1:1. Se consideró como prueba positiva aquellos extractos que presentaron un halo de inhibición o que no permitieron crecimiento sobre el orificio (Verástegui, M. A., 1995).

4.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI):

La concentración mínima de los extractos que inhibieron el crecimiento de los hongos en el análisis preliminar de inhibición se determinó en tubos con 1.8 ml de caldo CD con 0.2 ml de una suspensión de esporas a una concentración final de $1x10^3$ esporas/ml. El extracto se probó a diferentes concentraciones desde 0.25 mg/ml hasta 20 mg/ml en intervalos de 0.25. Los experimentos por duplicado se realizaron con tres repeticiones. El medio de cultivo utilizado fue Caldo CD para producción de micelio y AF El cultivo se mantuvo inclinado y sin mezclarse, y se incubó a 28°C por 7 días. La CMI se definió como la concentración más pequeña del extracto que inhibió el crecimiento del hongo (Verástegui, M. A., *et al*, 1996).

4.6. Separación parcial del compuesto activo.

4.6.1. Cromatografía en capa delgada (CCD):

Se realizó CCD preparando placas de vidrio de 2.5 x 7.5 (portaobjetos) con silica gel 60G, preparando una mezcla con 10 gr de silica y 35 ml de agua destilada se cubrieron los portaobjetos uniformemente, las placas se secaron en estufa a 45°C por 30 min. y se activaron manteniendo una temperatura de 180°C por 1 h, posteriormente se dejaron enfriar en cubas de vidrio con carbonato de calcio como desecante. Por otra parte se prepararon suspensiones de cada extracto a analizar con agua destilada a una concentración de 1:10 y cada suspensión se inoculó en las placas para CCD con ayuda de capilares en forma de banda delgada. Una vez seca la banda inoculada se procedió a colocar las placas en cubas y correr la cromatografia utilizando una mezcla de metanol:cloroformo 1:5 como fase móvil. Se usó éste método con el objeto de separar por diferencia de polaridad los extractos acuosos, metanólicos, y etanólicos de *A. americana, A. asperrima* y *A. striata.*

4.6.2. Autobiografía:

Esta prueba se realizó con el objeto de identificar la banda del extracto activa contra el crecimiento *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las placas cromatográficas con los extractos metanólicos ya separados se colocaron sobre una base dentro de cajas Petri. Sobre la placa se agregó una capa uniforme de APD, y para evitar la deshidratación del medio de cultivo se agregó una torunda de gasa humedecida con glicerol al 10%. Por otra parte se preparó una suspensión de esporas de cada hongo a una concentración de $1x10^3$ esporas/ml y se inoculó 1 ml sobre la capa de agar y se incubó a 28°C por 7 días. Se tomó como banda bioactiva de la placa cromatográfica la que ocasionara una banda

de inhibición visible capaz de evitar el crecimiento del hongo en cuestión (Hamburger, M. O., and G. A. Cordell, 1987).

4.6.3. Cromatografía en capa preparativa (CCP):

Se utilizaron placas de vidrio de 20x20 para cubrirlas homogéneamente con una mezcla de silica gel 60 G al 30%, se secaron a 45°C por 30 min. y se activaron a 180°C por 1 h. Para enfriarse se depositaron en cubas con carbonato de calcio como desecante. Se prepararon soluciones de los extractos metanólicos de *A. americana, A. asperrima* y *A. striata* con agua destilada 1:10, para inocular las placas cromatográficas mediante el uso de capilares en forma de banda. Una vez seco el inóculo de extracto en las placas, se procedió a correr la cromatografia utilizando como fase móvil metanol:cloroformo 1:5. Se raspó la banda identificada como fracción activa en la autobiografía y se mezcló con metanol y se procedió a filtrar para eliminar la silica gel. Posteriormente se vació el filtrado en una caja Petri para secar a 50°C en estufa y obtener cristales los cuales se mantuvieron en un desecador, hasta la realización de pruebas posteriores.

4.6.4. Determinación de saponinas:

4.6.4.1. Prueba de Salkowski:

Similar a la prueba de Liebermann-Buchard, la muestra (1-2 mg) en 1 ml de cloroformo se puso en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, en el caso de saponinas se obtienen coloraciones que van de amarillo a rojo.

4.6.4.2. Prueba de Liebermann-Burchard:

Ha experimentado numerosas modificaciones; así, se mezcló 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió a 0 °C y se les añadió una gota de ácido sulfúrico.

Una porción de este reactivo se puso en contacto con la substancia. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etcétera los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva (Domínguez, A. X., 1988)

4.7. Determinación del efecto del 25, 50, 75 y 100% de la CMI.

Se inocularon tubos con caldo CD con diferentes concentraciones del extracto acuoso, metanólico o etanólico de *A. americana, A. asperrima* o *A. striata* y $1x10^3$ esporas de *A. flavus* o *A. parasiticus* por ml de medio. Se incubó por 7 días a temperatura ambiente. Los efectos de las diferentes concentraciones de extracto en el crecimiento normal del hongo se monitorearon por diferentes bioensayos microbiológicos, y mediciones de parámetros.

4.7.1. Observación por microscopía de luz de cultivos desarrollados en portaobjetos excavados.

Se esterilizaron cajas Petri de 150 x 10 con portaobjetos excavados y cubreobjetos sobre una base de gasa. Por otra parte se preparó una solución de extracto metanólico de *A. striata* diluido en agua destilada a concentración de 1:10 y una suspención de esporas de *A. flavus* 1273 de tal manera que al inocular 50 ml de caldo CD diera una concentración de $1x10^3$ esporas.

Se llenaron los portaobjetos excavados con 50µl de caldo CD, agregando el extracto a diferentes concentraciones 100, 75, 50 y 25 % de la CMI para el crecimiento del hongo y se inoculó con las esporas.

Para evitar una desecación del medio se utilizó glicerol al 10% para humedecer la gasa en el fondo de la caja Petri. Se incubó a temperatura ambiente (28°C) por 7 días en obscuridad, debido a que la luz inhibe la producción de AF (Bennett, J. W., *et al*, 1978).

El control se sembró de igual manera pero con ausencia total del extracto. Una vez cumplido el tiempo de incubación se llevaron los portaobjetos excavados al microscopio de contraste de fases (Carl Zeizz standard 25). Las muestras se observaron con el objetivo de 40X, por medio de un fototubo con 2.5X se tomaron fotografías con un aumento final de 100X para ilustrar la actividad de los extractos en contra del crecimiento del hongo.

4.7.2. Observación de cultivos por microscopía electrónica de barrido

Se prepararon tubos de 13x100 con 2 ml de caldo CD. Por otra parte se preparó una solución de extracto etanólico de *A. americana* diluido en agua destilada a una concentración de 1:10. También se preparó el inóculo de esporas de tal manera que en un volumen de 2 ml diera una concentración de $1x10^3$ esporas Finalmente se agregó el extracto a diferentes concentraciones desde 5 hasta 50 mg/ml a intervalos de 5, y se inocularon con esporas de tres cepas diferentes, en bioensayos por separado. Se incubó a temperatura ambiente (28°C) por 7 días en obscuridad.

Para observar el efecto del 75, 50 y 25 % de la CMI de los extractos metanólicos de *A. striata y A. asperrima* en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* se prepararon tubos con volúmenes de caldo CD de 10 ml, utilizando un inóculo a una concentración final de $1x10^3$ esporas/ml, posteriormente se incubó a 28°C por 7 días. Se prepararon cultivos con extractos metanólicos de *A. americana* aunque éstos no mostraran efecto inhibitorio para compararlos con los extractos que si tuvieran efecto inhibitorio, así como un control sin extracto.

Los cultivos fueron observados por microscopía electrónica de barrido por la técnica de fijación con vapores de osmio, para observar los efectos de los extractos en la morfología del hongo en comparación con el crecimiento del control. Los especímenes se colocaron en un contenedor de vidrio con cristales de OsO_4 o solución de éstos, sin permitir que el osmio se ponga en contacto directo con el objeto (Rosenbauer, K. A, and B. Kegel, 1978).