

# ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE PLANTAS SOBRE FUSARIUM VERTICILLIOIDES (SACC.) NIRENB. Y PRODUCCIÓN DE FUMONISINA B<sub>1</sub>

Reyna Isabel Sánchez Mariñez<sup>1</sup>, Guadalupe Miroslava Suárez-Jiménez<sup>2</sup>, Armando Burgos-Hernández<sup>2</sup>, Maribel Plascencia-Jatomea<sup>2</sup> y Mario Onofre Cortez-Rocha<sup>2</sup>

1. Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. México

2. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.

## Introducción

El maíz (*Zea mays* L) es originario y ampliamente cultivado en México. A nivel mundial, este cereal representa 5.4% de las fuentes alimenticias de la población humana; ocupa el tercer lugar en producción después del trigo y el arroz. Es considerado el alimento de mayor importancia en México, ya que es básico en la alimentación. En el campo, este cereal es colonizado por una diversidad de hongos entre los que se encuentran algunas especies micotoxigénicas, en donde las dominantes son *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium* spp. (Sánchez-Rangel et al., 2005; Gallardo-Reyes et al., 2006; Figueroa-Gómez et al., 2006; Montes et al 2009). La colonización por *Fusarium* puede ocasionar la producción de micotoxinas como las fumonisinas (Sydenham y col., 1990; Chulze, y col., 1996, Ramírez y col., 1997, Cortez-Rocha 2003 y 2005). La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) es la toxina más abundante producida por *F. verticillioides*. Su incidencia en alimentos es una preocupación de salud, ya que se ha demostrado que causa leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en puercos, y está incluida en el grupo 2B (posible carcinogénico en humanos) de acuerdo a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 2002).

Para evitar la invasión por hongos, el grano de maíz es frecuentemente tratado con fungicidas químicos sintéticos. Sin embargo, se han asociado muchas desventajas al uso de estos y existe una tendencia mundial a limitar su empleo en granos y productos derivados. El uso de sustancias naturales para prevenir la producción de micotoxinas es una alternativa con grandes posibilidades de uso. Se ha observado que algunos compuestos naturales de origen vegetal como aceites esenciales, extractos, y otros de origen animal como el quitosano, inhiben el crecimiento de ciertos hongos filamentosos (Verástegui y col., 1996; Plascencia-Jatomea, y col., 2003; Rabea y col., 2003; Kordali y col., 2005). Existe evidencia de que extractos alcohólicos de plantas desérticas como *Baccharis glutinosa* y *Larrea tridentata* tienen efecto en el crecimiento de hongos. Los extractos alcohólicos de *Larrea tridentata*, *Baccharis glutinosa* y *Ambrosia confertiflora* inhiben el crecimiento de *F. verticillioides* (Tequida-Meneses y col., 2002), por lo que se puede aprovechar su abundancia y utilizarlas en el control de *F. verticillioides* y en consecuencia la producción de FB<sub>1</sub>. Es por ello que el objetivo del estudio fue determinar el efecto de extractos metanólicos de *A. confertiflora*, *B. glutinosa*, *L. tridentata* y *Azadirachta indica* sobre el crecimiento y germinación de esporas de *F. verticillioides*.

## Materiales y Métodos

Las plantas del estudio se colectaron en dos regiones del estado de Sonora, México. Se secaron en la sombra y se molieron en un tamaño de 0.5-1 mm. Se prepararon extractos de cada una al 6% con metanol al 70%. Se utilizó una cepa de *F. verticillioides* productora de FB<sub>1</sub> aislada de maíz que fue cultivada en PDA a 25°C con ciclos de 12 h luz-oscuridad. Se preparó una suspensión de esporas con Tween 20 (0.1%) y se estimó su concentración de esporas por conteo en cámara de Neubauer. Cada extracto vegetal se añadió a agar PDA a 45-50°C en 5.6, 11.1, 13.9 y 16.7 % (v/v) y se vertieron en placas Petri. El control fue agar PDA y metanol al 70%. Esto para cada una de las pruebas:

**Germinación de esporas.** Las placas fueron inoculadas con  $1 \times 10^5$  esporas e incubadas a  $25^\circ\text{C}$ . Se muestreó cada 2 h y se contó de cada placa al azar 200 esporas. Cada tratamiento fue por duplicado.

**Crecimiento radial.** Las placas se inocularon con  $1 \times 10^5$  esporas por la técnica de pozo en el centro de la placa. Se midió el diámetro de la colonia cada 24 h y se graficó el crecimiento radial vs tiempo de incubación. Cada tratamiento se hizo por triplicado.

**Biomasa.** Se tomó al azar una placa de cada tratamiento cada 24 horas, se fundió el medio con el micelio, se filtró y el papel filtro con el micelio se secó en estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 2 h, se enfrió y el peso de la colonia se expresó en  $\text{mg}/\text{cm}^2$  de placa. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

## Resultados

Los extractos de *B. glutinosa* y *L. tridentata*, en todas sus concentraciones fueron efectivos para inhibir la germinación de *F. verticilliooides* (Fig. 1), mientras que los extractos de *A. indica* y *A. confertiflora* solo inhibieron a concentraciones de 11.1 y 16.7 %, respectivamente. En la figura 2 se observa que *B. glutinosa* y *L. tridentata* inhiben efectivamente el crecimiento de la colonia. Sin embargo, en los extractos de *A. indica* y *A. confertiflora* se observó lo contrario, figuras 3 y 4. Se determinó la  $\text{CI}_{50}$  (Probit) en la etapa de crecimiento radial para los extractos de *B. glutinosa* y *L. tridentata*, la cual fue de 7.44% y 4.00% (v/v), respectivamente.

Fig.1 *Baccharis glutinosa*

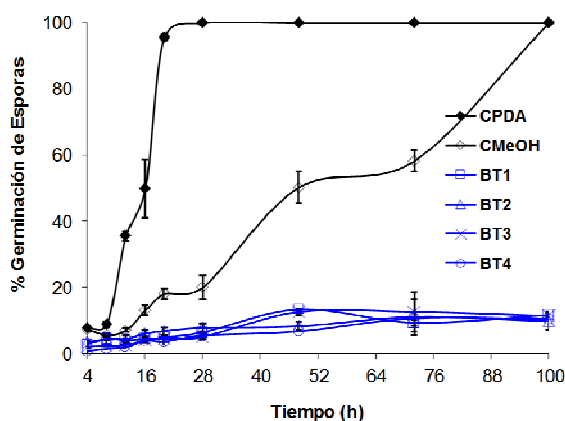


Fig. 2 *Azadirachta indica*

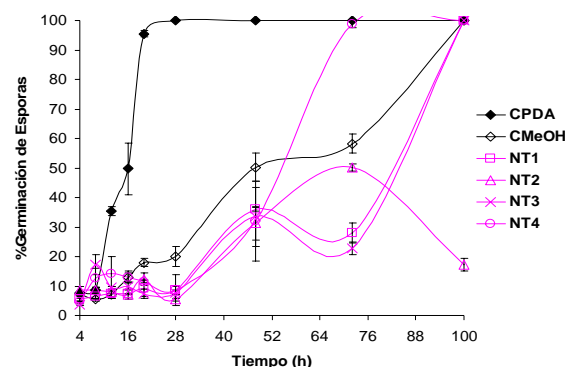


Fig.3 *Larrea tridentata*

*confertiflora*

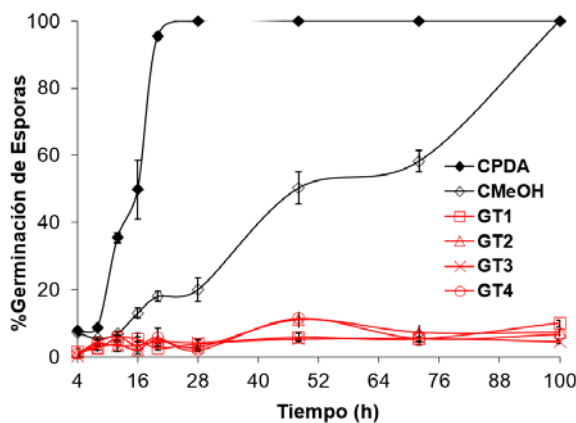
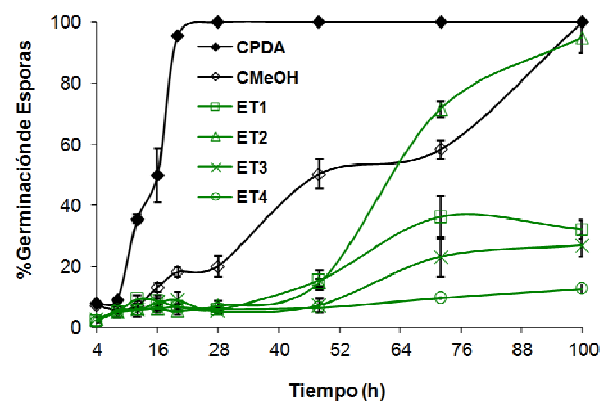


Fig. 4 *Ambrosia*



Figuras 1-4. Porcentaje de germinación de esporas de *Fusarium verticillioides* en los medios control y con extracto de cada planta a las diferentes concentraciones a través del tiempo de incubación. CPDA= control con agar papa dextrosa, CMeOH = control con metanol, T1= 5.6%, T2= 11.1%, T3= 13.9%, T4 = 16.7%

**Producción de Biomasa.** La evaluación de la producción de biomasa muestra una idea de cómo es la segunda etapa de crecimiento del hongo, determinando si los diferentes compuestos inhibidores producen un efecto a nivel fisiológico del hongo. El análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. En la tabla 1 se puede observar una tendencia muy similar a la del crecimiento radial para los extractos de *B. glutinosa* y *L. tridentata*, los cuales fueron de mayor efecto inhibitorio tanto en el crecimiento radial como en la producción de biomasa. Sin embargo, en el extracto de *A. confertiflora* se observó buen efecto inhibitorio en la producción de biomasa (mayor del 50%) únicamente en la concentración de 11.1%, mientras que en el extracto de *A. indica* el porcentaje de inhibición fue casi nulo. Con estos resultados podemos observar que el extracto de *A. indica* tiene poco efecto inhibitorio en el crecimiento radial, pero ninguno en la producción de biomasa, es decir, el hongo tiende a producir mayor cantidad de micelio y a evitar el contacto directo con el compuesto inhibitorio presente en el medio de cultivo.

Tabla 1. Inhibición de producción de biomasa de *F. verticillioides* a 336h en los tratamientos con respecto al control con metanol.

Tratamiento	Inhibición (%)
<i>B. glutinosa</i> 5.6 %	90.12 ± 11.46 <sup>cd</sup>
<i>B. glutinosa</i> 11.1%	96.39 ± 11.46 <sup>cd</sup>
<i>B. glutinosa</i> 13.9%	100.00 ± 11.46 <sup>d</sup>
<i>B. glutinosa</i> 16.7%	98.05 ± 11.46 <sup>cd</sup>
<i>A. indica</i> 5.6 %	0.00 ± 11.46 <sup>a</sup>
<i>A. indica</i> 11.1%	3.66 ± 11.46 <sup>a</sup>
<i>A. indica</i> 13.9%	0.00 ± 11.46 <sup>a</sup>
<i>A. indica</i> 16.7%	0.00 ± 11.46 <sup>a</sup>
<i>A. confertiflora</i> 5.6%	39.12 ± 11.46 <sup>abc</sup>
<i>A. confertiflora</i> 11.1%	66.67 ± 11.46 <sup>bcd</sup>
<i>A. confertiflora</i> 13.9%	29.32 ± 11.46 <sup>ab</sup>
<i>A. confertiflora</i> 16.7%	22.25 ± 11.46 <sup>ab</sup>
<i>Larrea tridentata</i> 5.6%	95.74 ± 11.46 <sup>cd</sup>
<i>Larrea tridentata</i> 11.1%	100.00 ± 11.46 <sup>d</sup>
<i>Larrea tridentata</i> 13.9%	95.15 ± 11.46 <sup>cd</sup>
<i>Larrea tridentata</i> 16.7%	99.20 ± 11.46 <sup>cd</sup>

Valores expresados como el promedio de tres réplicas. Diferentes superíndices indican diferentes grupos estadísticos. Prueba de Tukey  $p < 0.05$  (JMP 4.0.4).

**Producción de Fumonisina B<sub>1</sub>.** Los valores promedio de FB1 detectados en las muestras fueron de 585.8, 417.3, 1110.4 y 1602 para el control, control MeOH, *L. tridentata* y *B. glutinosa*, respectivamente. Estos indican que no hubo inhibición en la producción de la toxina, más aún, ésta aumentó en los tratamientos con los extractos de *B. glutinosa* y *L. tridentata*. El análisis estadístico determinó que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

## Conclusiones

Los extractos de *B. glutinosa*, *L. tridentata* y *A. indica* inhiben la germinación de esporas y el crecimiento radial de *F. verticillioides* *in vitro*. Los de mayor potencial son los de *B. glutinosa* y *L. tridentata*, ya que inhiben el crecimiento tanto radial como apical del hongo.

Se necesita realizar estudios *in vivo* para probar la efectividad de estos extractos en maíz y también determinar si los extractos efectivos en el control del crecimiento de *F. verticillioides* son efectivos para inhibir la producción de fumonisinas.

## Referencias.

- Chulze, S.N., Ramirez, M.L, Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A. y March, G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2797-2801. 1996.
- Cortez-Rocha, M.O., W.R. Ramírez-Astudillo, R.I Sánchez-Mariñez, E.C. Rosas-Burgos, F.J. Wong-Corral, J. Borboa-Flores, L.G. Castellón-Campaña, and M. Tequida-Meneses. Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull. Environ. Contam Toxicol*, 70(4): 668-673. 2003.
- Cortez-Rocha, M.O; M.E Gil-León, G.M. Suárez-Jiménez, E.C. Rosas-Burgos, R.I. Sánchez-Mariñez, A. Burgos-Hernández, J. Lozano-Taylor; F.J. Cinco-Moroyoqui. Occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and hydrolyzed fumonisin B<sub>1</sub> in Mexican nixtamalized cornmeal. *Bull. Environ. Contam Toxicol*, 74(1): 73-77. 2005.
- Gallardo-Reyes, E.D., G.M. Ibarra-Moreno, R.I. Sánchez-Mariñez, G. Cuamea-Cruz, D. Molina Gil, N.V. Parra-Vergara, E.C. Rosas-Burgos y M.O. Cortez-Rocha. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisin B<sub>1</sub> por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1):27-34. 2006.
- International Agency for Research on Cancer. Fumonisin B<sub>1</sub>. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Traditional Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC, 82: 301–366. 2002.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., y Yildirim, A. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. *J. Agric. Food Chem*, 53(5): 1408-1416. 2005.
- Montes, G.N., Reyes, M.C.A., y Cantú, A.M.A. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *CyTA Journal of Food*, 7(2): 119-125. 2009.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniestra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M., y K. Shirai. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol. Biosci*, 3(10): 582-586. 2003.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V. Smagghe, G., Steubart, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6): 1457-1465. 2003.
- Ramírez, M.L., Torres, A., Rodríguez, M., Castillo, C., y Chulze, S. *Fusarium* and fumonisins in corn at harvest time: effect of fertilization and planting area. *Cereal Research Communications*, 25: 381-383. 1997.
- RM Figueroa-Gómez, MM Reynoso, CE Castro-Zambrano y WP Reyes-Velázquez. Estudio de las poblaciones de *Fusarium* (Sección Liseola) aisladas de híbridos de maíz cultivados en México. *Scientia – CUCBA*, 8(2):181-192. 2006.
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A., y Plasencia, J. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem*, 53: 8565-8571. 2005.
- Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Gordon, S., Van Schalkwyk, D.J., y Koch, K.R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from high

esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem*, 38(10): 1900-1903. 1990.

Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E.C., López-Sandoval, S., y Corrales-Maldonado, C. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoam. Micol*, 19, 84-88. 2002.

Verástegui, M.A., Sánchez, C.A., Heredia, N.L., y García-Alvarado, J.S. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *J. Ethnopharmacol*, 52(3):175-177. 1996.