

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Efecto de Fracciones Antifúngicas de las Plantas *Baccharis glutinosa* y *Jacquinia macrocarpa* sobre la Viabilidad y Morfometría de los Hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Daniel Fernando Valenzuela Cota

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia y a Dios por estar conmigo en la culminación de una etapa de mi vida. A mis abuelos, tios y primos, que siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente y por los momentos que pasamos juntos. Muchas gracias.

Agradezco también a mis amigos y amigas de la Universidad, Aaron, Neto, Yeyel, Pablo, Martin, Juan, Otero, Gerson, Jaime, Nancy, Esme, Daniela, Lezlie, Karenth, Paty y los que faltan. Gracias porque siempre me brindaron su amistad desde el primer día que los conocí.

A mi mejor amiga Kiria, que siempre estuvo pendiente de mí en todo momento, por escucharme y ser una de las personas que han marcado mi vida para bien.

A mi novia Marlene, por el cariño y comprensión que me has brindado. Porque además de ser mi novia, eres una mejor amiga. Muchas gracias por todo preciosa. Te quiero mucho!

A Génesis y John, que siempre estuvieron pendientes de mi en el laboratorio, ayudándome y soportando las muchas preguntas que hacía día con día.

Agradezco a mi Asesora de tesis, la Dra. Carina Rosas, por el apoyo brindado durante todo este tiempo, pero sobre todo por su paciencia y comprensión.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto PROMEP/103.5/11/4463 y por la beca otorgada.

**A todos ellos y a los que me faltaron les agradezco por ser parte de mi vida.
MUCHAS GRACIAS!**

DEDICATORIA

A mis padres Mary y Fernando, por todo su esfuerzo, apoyo, confianza y sobre todo el amor que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, Alejandro, Arturo y Lupita que al igual que mis padres, siempre me motivan para salir adelante y que a pesar de tiempos difíciles siempre lograban sacarme una sonrisa. No tengo las palabras para agradecerles todo el amor que he recibido de ustedes. Los amo familia, sin duda, son lo mejor que puedo tener en esta vida, espero que se sientan orgullosos de mi.

Muchas gracias!

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO.....	5
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
OBJETIVOS.....	9
General.....	9
Particulares.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
ANTECEDENTES.....	13
Características del Género <i>Aspergillus</i>	13
Características del Género <i>Fusarium</i>	16
Principales Micotoxinas.....	18
Aflatoxinas.....	18
Fumonisinias.....	20
Antifúngicos Sintéticos.....	22
Clasificación.....	23
Mecanismos de Acción.....	23
Antifúngicos que actúan sobre la membrana celular del hongo.....	23
Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo.....	24
Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica.....	24
Estructura.....	25
Anfotericina B complejo lipídico (ABLC).....	25
Fluconazol.....	25
Voriconazol.....	26
Ketoconazol.....	27
Alternativas al Uso de Antifúngicos Sintéticos.....	27
<i>Baccharis glutinosa</i>	29
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32

Fracciones Antifúngicas.....	32
Elaboración de Suspensiones de Esporas.....	32
Cinética de Crecimiento Radial.....	32
Germinación de Esporas.....	33
Efecto sobre Estructuras.....	33
Número de Septos de las Hifas.....	33
Número de Divisiones Mitóticas.....	34
Diámetro de Esporas.....	34
Longitud y Diámetro de Hifas.....	34
Análisis de Viabilidad de Esporas.....	34
Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Cinética de Crecimiento Radial.....	36
Germinación de Esporas.....	39
Efecto sobre Estructuras.....	41
Número de Septos de las Hifas.....	41
Número de Divisiones Mitóticas.....	42
Diámetro de Esporas.....	43
Longitud y Diámetro de Hifas.....	45
Análisis de Viabilidad de Esporas.....	46
CONCLUSIONES.....	48
RECOMENDACIONES.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Número de células de <i>Aspergillus flavus</i> que contuvieron el número de núcleos indicado a las 21 horas de incubación.....	42
2.	Número de células de <i>Fusarium verticillioides</i> que contuvieron el número de núcleos indicado a las 30 horas de incubación.	42
3.	Porcentaje de reducción del diámetro y longitud de hifas apicales de <i>A. flavus</i> y <i>F. verticillioides</i> a las 72 h de desarrollo en PDA conteniendo fracciones antifúngicas.	46
4.	Porcentajes de viabilidad de esporas de <i>A. flavus</i> a diferentes tiempos de incubación en los controles PDA, metanol, <i>B. glutinosa</i> y <i>J. macrocarpa</i>	47
5.	Porcentajes de viabilidad de esporas de <i>F. verticillioides</i> a diferentes tiempos de incubación en los controles PDA, metanol, <i>B. glutinosa</i> y <i>J. macrocarpa</i>	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Formas diferentes de conidióforos del género <i>Aspergillus</i>	14
2.	Estructuras microscópicas características del género <i>Fusarium</i>	17
3.	Estructura molecular de los diferentes tipos de aflatoxinas.....	19
4.	Estructura de la anfotericina B.....	25
5.	Estructura del fluconazol.	26
6.	Estructura del voriconazol.....	26
7.	Estructura del ketoconazol.....	27
8.	Hojas y flores de <i>Baccharis glutinosa</i>	29
9.	Árbol, flores y hojas de <i>Jacquinia macrocarpa</i>	31
10.	Crecimiento radial de <i>A. flavus</i> en medio PDA con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> y <i>B. glutinosa</i> , control metanol y control PDA.....	37
11.	Crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en medios con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> y <i>B. glutinosa</i> , control metanol y control PDA.....	37
12.	Porcentaje de esporas germinadas de <i>A. flavus</i> en medio PDA con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> , <i>B. glutinosa</i> , control PDA y control metanol.....	40
13.	Porcentaje de esporas germinadas de <i>F. verticillioides</i> en medio PDA con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> , <i>B. glutinosa</i> , control PDA y control metanol.....	41
14.	Diámetro de esporas de <i>A. flavus</i> en medio PDA con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> , <i>B. glutinosa</i> , control metanol y control PDA.....	44
15.	Diámetro de esporas de <i>F. verticillioides</i> en medio PDA con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> , <i>B. glutinosa</i> , control metanol y control PDA.....	44
16.	Longitud de esporas de <i>F. verticillioides</i> en medio PDA con fracciones antifúngicas de <i>J. macrocarpa</i> , <i>B. glutinosa</i> , control metanol y control PDA.....	45

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de las fracciones antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* y *Baccharis glutinosa* sobre parámetros morfométricos y viabilidad de los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*.

Particulares

- Corroborar la actividad de las fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa* y *B. glutinosa* sobre el crecimiento radial de los hongos.
- Determinar el efecto de las fracciones antifúngicas sobre la germinación de las esporas fúngicas.
- Determinar el efecto de las fracciones antifúngicas sobre las estructuras celulares de los hongos.
- Determinar la viabilidad de esporas de los hongos tratados con las fracciones antifúngicas.

RESUMEN

La producción de maíz sufre cuantiosas pérdidas a causa de diferentes factores entre los que sobresalen los hongos. Es bien conocido que los hongos fitopatógenos y micotoxigénicos son causantes de grandes pérdidas económicas y de daños a la salud de animales y humanos. Tradicionalmente, el combate a estos organismos ha sido mediante el empleo de fungicidas sintéticos los cuales son efectivos, sin embargo, pueden causar serios problemas de contaminación ambiental, dañando a organismos benéficos e incluso a humanos. Son causantes también de la proliferación de hongos fitopatógenos resistentes a los compuestos activos. En búsqueda de alternativas menos perjudiciales, se han estudiado fuentes naturales de antifúngicos como son las plantas. *Jacquinia macrocarpa* y *Baccharis glutinosa* son plantas nativa del noroeste del país que ha demostrado capacidad para inhibir el crecimiento radial de *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de fracción antifúngica obtenidas de estas plantas sobre algunos parámetros morfométricos y la viabilidad de esporas de los hongos fitopatógenos y micotoxigénicos *A. flavus* y *F. verticillioides*. Las fracciones antifúngicas obtenidas por técnicas cromatográficas fueron utilizadas para evaluar el efecto sobre el crecimiento radial, germinación de esporas, diámetro de esporas, diámetro y longitud de hifas, número de divisiones mitóticas, así como sobre la viabilidad de las esporas de los dos hongos en estudio. Los resultados obtenidos mostraron un efecto de inhibición significativo en los parámetros evaluados sobre cada hongo, evidenciando un mayor efecto de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* sobre *A. flavus* y de *B. glutinosa* sobre *F. verticillioides*. Aparentemente, la distinta composición química de las fracciones antifúngicas y las diferencias entre los hongos estudiados, ocasionan que éstos presenten distinta susceptibilidad a ser inhibidos.

INTRODUCCIÓN

Los problemas que causan los hongos a los cereales han causado pérdidas importantes en las cosechas desde que los seres humanos comenzaron a practicar la agricultura (Cota y col., 2007). Estos hongos afectan grandes cantidades de cereales en el mundo, principalmente en el maíz causando grandes pérdidas; esta situación es preocupante, debido a que los derivados que se obtienen de estos granos, constituyen la base de alimentación de muchas personas del todo el mundo incluyendo a México.

Según estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la agricultura mundial pierde al año 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que cualquier otro agente (Agris, 2005). Los cereales están propensos a contaminarse en la etapa de precosecha y poscosecha, por una variedad de hongos toxigénicos capaces de producir sustancias tóxicas naturales llamadas micotoxinas ocasionando pérdidas económicas y problemas de salud animal y humana. Entre los principales hongos responsables de dicha contaminación podemos mencionar a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* siendo los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* los que predominan en las cosechas de maíz en el estado de Sonora (Cortez-Rocha y col., 2003).

Estos hongos pueden producir toxinas como resultado de su metabolismo secundario, las que luego son secretadas al exterior, contaminando el ambiente. La contaminación por micotoxinas puede ocurrir en cualquier punto en la cadena de producción, almacenamiento o industrialización (Bucio-Villalobos y col., 2005).

Las especies más importantes de los géneros mencionados son: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, debido a su capacidad potencial de producir fumonisinas y aflatoxinas, respectivamente (Gelderblom y col., 1988; Goldblatt, 1969). Además existen otros tipos de micotoxinas que están presentes principalmente en los cereales para consumo humano como ocratoxina A, patulina, zearalenona y algunos tricotecenos, particularmente el deoxinivalenol. Algunas de estas micotoxinas son mutagénicas y cancerígenas, otras ocasionan lesiones renales, inmunosupresión y anorexia, entre otros (Lamplugh y col., 1988).

El control de hongos fitopatógenos se ha realizado mediante la aplicación de dosis crecientes de productos sintéticos, pero éstos han presentado inconvenientes como contaminación tanto a los seres vivos como al medio ambiente, así como también ha habido un

aumento de poblaciones de patógenos resistentes y la presencia y acumulación de residuos químicos en los alimentos, lo que conlleva a problemas en la salud humana y animal.

Con base a lo anterior, actualmente se buscan métodos alternos de conservación y una alternativa es el uso de plantas así como también algunos aceites esenciales y productos orgánicos como el quitosano (Sánchez-Domínguez y col., 2007),

En el estado de Sonora existen algunas especies de plantas a las cuales se les ha encontrado actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos del maíz. *Baccharis glutinosa* y *Jacquinia macrocarpa* son dos especies de plantas endémicas del noroeste de México, de cuyos extractos metanólicos se ha logrado obtener fracciones con actividad inhibitoria del crecimiento de los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. verticillioides* (Rosas-Burgos y col., 2009; Buitimea-Cantúa y col., 2010). Sin embargo aún se desconocen los mecanismos por los cuales estas fracciones actúan, por lo que, para coadyuvar en su esclarecimiento, el presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de las fracciones antifúngicas de estas plantas sobre parámetros morfométricos y viabilidad de los hongos *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticillioides*.

ANTECEDENTES

Entre los principales géneros de hongos que frecuentemente se encuentran contaminando a granos de cereales y en particular al maíz se encuentran *Aspergillus* y *Fusarium*. Sus características morfológicas tanto macroscópicas como microscópicas han sido perfectamente estudiadas (Torres-Chávez y col., 2008).

Características del Género *Aspergillus*

Los hongos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas (Kozakiewicz, 1989).

Estos hongos son ubicuos, encontrándose ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Debido a la facilidad de suspensión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en el ambiente por largo tiempo, por lo que son un vector importante de contaminación de alimentos y de enfermedades al hombre (Kozakiewicz, 1989). Se encuentran presentes generalmente en el suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición (Razzagh-Abyaneh y col., 2006) y el medio ideal para su desarrollo son ambientes oscuros, húmedos y cerrados; dichas características han llevado a clasificarlos como hongos de almacén; sin embargo, también pueden contaminar productos desde el campo (Kozakiewicz, 1989).

En cuanto a la morfología, el color es la principal característica macroscópica para la identificación de las especies de *Aspergillus*. Poseen tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris o negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato (Kozakiewicz, 1989).

En el género *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunas especies de *Aspergillus* hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células soporte. Algunas especies poseen una o dos series de células

sobre la vesícula, o bien presenta simultáneamente cabeza de ambos tipos (Figura 1) (Kozakiewicz, 1989).

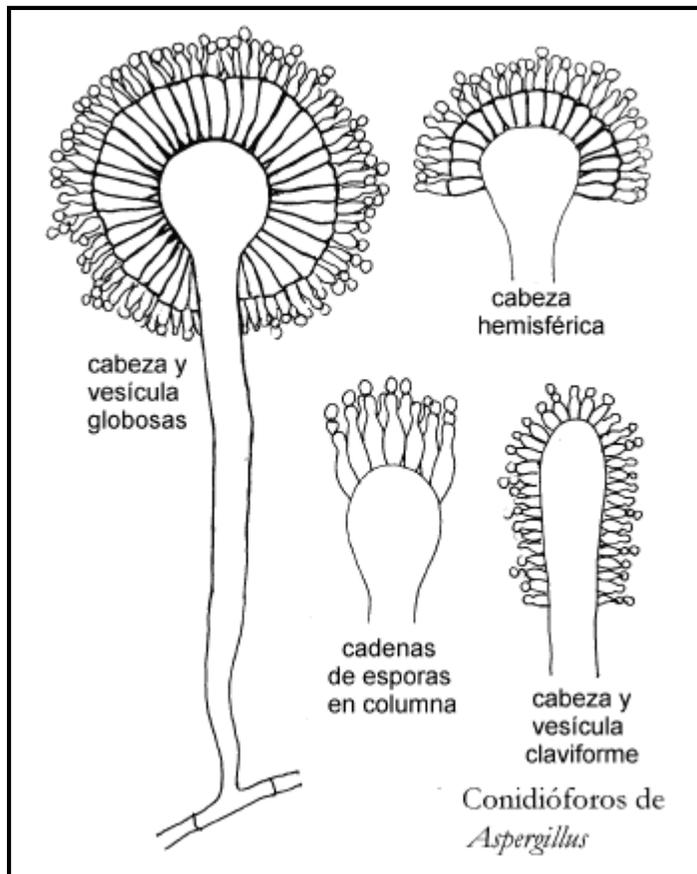


Figura 1. Formas diferentes de conidióforos del género *Aspergillus*.

Fuente: Carrillo (2007).

Las características macro y micromorfológicas, tales como el color de los conidios, la forma de la cabeza, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas, han permitido agrupar a las especies en secciones o en grupos. Algunas especies pueden formar células de Hülle, que son células sencillas o en cadenas, gruesas y de paredes suaves o esclerotia, es decir, masa de hifas firme o aglobada (Samson y col., 1995).

Las especies de *Aspergillus* son contaminantes comunes de varios tipos de sustratos orgánicos, normalmente en regiones tropicales y subtropicales. El interés en el estudio de *Aspergillus*, se debe a que ciertas especies son patógenas y tienen la habilidad de producir metabolitos tóxicos, mientras que otras especies son importantes en la fermentación de

productos alimenticios, o a nivel industrial, en la producción de ácidos orgánicos o enzimas (Samson y col., 1995).

La mayoría de las especies crecen o se desarrollan sobre medio de cultivo Czapek-20 % sacarosa. La temperatura de incubación corriente es de 25°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras (Kozakiewicz 1989).

Las colonias de *Aspergillus flavus* suelen formar una densa capa de color amarillo verdoso con un diámetro de 3-5 centímetros al incubarse a 25 °C en agar Czapek. Las cabezas de las colonias típicamente son radiales, y después se dividen en varias columnas que van desde amarillo verdoso claro a oscuro. Los conidióforos son ásperos y pueden crecer de 1 a 2.5 mm de longitud. Las vesículas tienen un diámetro de 25-45 µm, las fiálides crecen en las vesículas o en la métulas y miden de 6 a 10 µm por 4 a 6 µm. Las métulas miden de 6 a 10 µm por 3.5 µm, además las conidias miden 3.6 µm de diámetro y son de color verde pálido. La esclerotia se produce separada, de forma y dimensiones variables, de color café a negro (Samson y col., 1995).

A. flavus generalmente crece en nueces, especies, semillas, cereales y ocasionalmente en frutos secos. Dentro de los metabolitos tóxicos de este hongo se encuentran los siguientes: ácido 3-nitropropiónico, ácido ciclipiazónico y aflatoxinas B (Samson y col., 1995).

Biológicamente las aflatoxinas B, son la forma más activa de las aflatoxinas. Muchos animales incluyendo los seres humanos, son susceptibles a los efectos de esta micotoxina. El órgano más afectado por las aflatoxinas es el hígado y la toxicidad provoca necrosis hepática, coagulopatía, hemorragias y hasta la muerte. Además, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado a las aflatoxinas B como sustancias cancerígenas en humanos (IARC, 1987), a las cuales se les ha atribuido actividades teratogénicas y mutagénicas (Hayes, 1981).

Debido a la carcinogenicidad de las aflatoxinas en humanos, la FDA ha desarrollado un sistema de vigilancia de los niveles de acción para estas toxinas en varias condiciones. Se debe tener cuidado de la presencia de aflatoxinas, así como controlar sus niveles en los alimentos para evitar los efectos de la aflatoxicosis, como el cáncer y posteriormente la muerte (Pier y Richard, 1992).

Características del Género *Fusarium*

Fusarium es un género de hongos distribuido a nivel mundial, que se encuentran caracterizados por ser hongos hialinos, filamentosos, usualmente saprofitos de suelo, asociados a materia orgánica en descomposición e insectos (Giani, 1997; Tosti y col., 2000; Summerell y col., 2001).

Las características morfológicas que permiten la identificación del género *Fusarium* se determinan macroscópica y microscópicamente. Estas son agrupadas en características primarias y secundarias que son utilizadas para separar las especies en los 7 grupos taxonómicos existentes. Entre las características primarias se incluyen la forma de los macroconidios, origen y forma de los microconidios, tipo de conidióforo y por último la presencia o ausencia de clamidosporas: mientras que en las características secundarias se encuentran la presencia o ausencia de esporodoquio, y la morfología y pigmentación de la colonia (Nelson y col., 1994; Pardo y Duran, 1999).

Los conidios (Figura 2) son esporas asexuales producidas por células conidiógenas formadas por la diferenciación del extremo de la hifa. La diferenciación de estas estructuras han permitido la utilización de esta característica para la clasificación de los hongos (Moore, 1996).

Los macroconidios de *Fusarium* son curvados, hialinos, con una célula apical más o menos puntiaguda y una célula basal en forma de pie que constituye la base para la identificación. Son esporas típicas de *Fusarium*, están constituidas por 3 ó 5 células que se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos.

Los microconidios son producidos en el micelio aéreo, solo o en cadenas, comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes o subglobosos, similares al ancho de los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por la general formando cabezuelas mucosas o cadenas biseptadas. Tiene de una a dos células y son esporas que el hongo produce con mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones. Estas esporas son las que forma el hongo con más frecuencia en el interior de los vasos de las plantas infectadas o en el torrente sanguíneo en caso de animales y humanos (Díaz de Castro y col., 2007). No siempre se producen los dos tipos de esporas (Moore, 1996; Alexopoulos y col., 1996; Agrios, 2005).

Las colonias del género *Fusarium* presentan diversos colores: blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna, pardo o no presentan pigmento, aunque al reverso de la colonia puede presentar colores pardo, oscuro o negro. (Summerell y col., 2001; Carrillo, 2007).

Fusarium crece en agar papa dextrosa a 25 °C, produciendo un micelio algodonoso e incoloro al principio, pero conforme madura, adquiere un color crema o amarillo pálido, y bajo

ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa pálido, rojo o púrpura (Díaz de Castro y col., 2007).

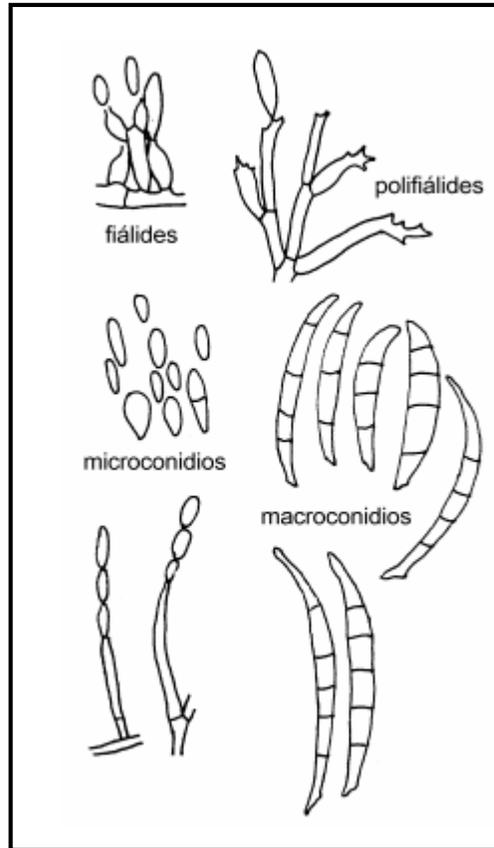


Figura 2. Estructuras microscópicas características del género *Fusarium*.

Fuente: Carrillo (2007).

El género *Fusarium* afecta gran variedad de cultivos que afectan económicamente grandes extensiones de cultivo en el mundo (Ortoneda y col., 2004). Aunque su actividad como patógeno de plantas ha sido bien estudiada, *Fusarium* es conocido actualmente como un patógeno emergente en animales y seres humanos; haciendo de esta forma en el caso de los humanos, que se incremente el número de casos reportados (Bushelman y col., 1995).

Principales Micotoxinas

Aflatoxinas

Los hongos del género *Aspergillus* se desarrollan en los granos alimenticios principalmente durante su almacenamiento, sin embargo se han encontrado también presentes en los granos de maíz recién cosechado en el estado de Sonora (Cortez-Rocha y col., 2003). Además se les puede encontrar también en frutos secos en condiciones de humedad y a temperaturas elevadas, y constituyen un riesgo para la salud humana (Peraica y col., 1999). Las principales micotoxinas producidas por este género son las aflatoxinas, que son compuestos naturales sintetizados por la vía poliquétida y que desde su descubrimiento han sido objeto de numerosos estudios debido a los efectos tóxicos agudos y crónicos que presentan en animales y humanos. El cáncer en el hígado es la principal enfermedad que está asociada a la exposición con aflatoxinas en humanos (González, 1995; Larondelle, 2000; Carrillo, 2003).

La historia de las aflatoxinas inicia a principios del año 1960 en Inglaterra, cuando más de 100,000 pavos murieron después de comer harina de maní importada de África y América del Sur, lo que se llamó enfermedad X de los pavos, debido al desconocimiento de su causa. Dicha enfermedad se caracterizó por necrosis hepática aguda con hiperplasia del conducto biliar, letargo, pérdida del apetito y muerte. A partir de este suceso, se inició una ardua investigación para conocer las causas de dichas muertes y años más tarde, Philip Calvert Spensley, descubrió que las causantes eran compuestos producidos por el hongo *Aspergillus flavus*, a las que llamó aflatoxinas (toxinas de *Aspergillus flavus*) (Santacroce y col., 2008).

Las aflatoxinas son compuestos poliacéticos producidos por varios hongos del género *Aspergillus* sección flavi, principalmente por las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, aunque también se han encontrado en presencia de *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* entre otros hongos, siendo éstos de menor importancia, ya que no son predominantes en la naturaleza (Razzaghi-Abyaneh y col., 2006).

La contaminación por aflatoxinas se presenta principalmente en productos agrícolas como el maíz, cacahuate, algodón, frutos secos, arroz, higo, tabaco y especias, entre otros. La FAO ha estimado que al menos 25% de granos de cereales del mundo están infectados por aflatoxinas (Prieto-Simon y Campas, 2009).

Las consecuencias económicas y para la salud por la presencia de aflatoxinas han llevado a algunos países a establecer límites sobre los niveles permitidos en los alimentos y piensos. El límite máximo de aflatoxinas permitido en los granos varía según la legislación de

cada país, el rango oscila de 1.0 a 20 ng/g en 27 países del mundo. La FAO y la Organización Mundial de la Salud (WHO), establecieron límites de aflatoxinas totales de 15ng/g, por otra parte de FDA recomienda límites de 10-20 ng/g para aflatoxinas totales y de 2-5 ng/g para aflatoxina B1.

En EUA, el límite permitido para aflatoxinas es de 20 ng/g, siendo esta misma reglamentación la más usada en México. La comunidad europea impuso un nivel más estricto, de 4 ng/g; debido a estas restricciones, las pérdidas de ingresos a partir de maíz debido a la contaminación por aflatoxinas, son aproximadamente 270 millones de dólares en EUA (Bennett y Klich., 2003).

Las aflatoxinas son producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* que causan aflatoxicosis en animales domésticos y humanos en todo el mundo. Se conocen alrededor de 18 tipos de aflatoxinas, donde las principales aflatoxinas son B₁, B₂, G₁ y G₂ (Figura 3) y la más importante y de mayor interés es la B₁, debido a sus efectos tóxicos ya que se ha demostrado que es mutagénica, teratogénica y cancerígena, además de ser el hepatocancerígeno más potente que se conoce.

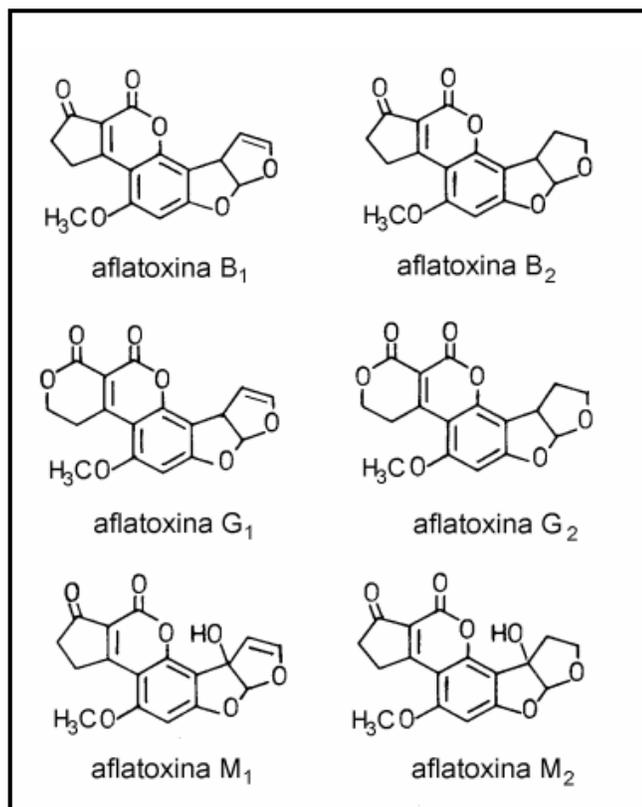


Figura 3. Estructura molecular de los diferentes tipos de aflatoxinas.

Fuente: Detroy y col. (1971).

Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (azul y verde) observada bajo luz UV mientras que los subíndices 1 y 2 indican componente mayor y menor respectivamente (Detroy y col., 1971). En condiciones óptimas *A. flavus* produce, al cabo de 15 días, unos 300 ng de aflatoxinas por mL de medio agar extracto de levadura sacarosa (15% de sacarosa y 2% de extracto de levadura), a 30 °C (Gqaleni y col., 1997). No se ha encontrado aflatoxinas B₂, G₁ o G₂, en ausencia de B₁ (JECFA, 1998). El nitrato reprime la síntesis de algunos intermediarios de aflatoxinas en *A. parasiticus* (Feng y Leonard, 1998) pero favorece la producción de esclerocios de *A. flavus*. A pH 4 ó menor la formación de esclerocios se reduce un 50 % mientras la producción de aflatoxinas es máxima (Calvo y col., 2002).

Las aflatoxinas se consideran cancerígenos hepáticos en humanos. La más potente es la toxina B₁ y mientras que la M₁ tiene una potencia diez veces menor (JECFA, 1998). Las aflatoxinas tienen acción sinérgica con el virus de la hepatitis B, por lo que la reducción de la ingesta de estas toxinas disminuye la tasa de cáncer de hígado en individuos portadores del virus (Herrman y Walker 2000).

Se han desarrollado numerosos métodos de análisis para la detección de aflatoxinas, utilizando prácticamente todas las herramientas comunes de la química analítica como la cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta presión, cromatografía de gases, espectrofotometría de masas, inmunoensayos, electroforesis capilar y biosensores (Bennett y Klich., 2003).

Fumonisinias

Otro grupo de toxinas fúngicas, que tienen el potencial de toxicidad para los seres humanos y animales domésticos son las fumonisinias, que son producidas por cepas de *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y otras especies de *Fusarium* (Desjardins, 1995). Éstas pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (de preferencia en el maíz y sus subproductos). Las fumonisinias resisten temperaturas de hasta 150 °C, en función del tiempo de permanencia a esas temperaturas y del pH del sustrato. Además, son muy polares y solubles en agua y acetonitrilo.

El mecanismo de acción tóxica de las fumonisinias se atribuye a la interferencia con el metabolismo de la esfingosina y la esfinganina, lo que perturba el metabolismo de los esfingolípidos. Los esfingolípidos tienen una gran importancia en la regulación de las células y en el control de proteínas de membrana celular, son mediadores del crecimiento celular y de la diferenciación y muerte de las células. La esfinganina N-aciltransferasa y la esfingosina N-

aciltransferasa son enzimas fundamentales en el metabolismo de la biosíntesis de los esfingolípidos (Lino y col., 2004).

En los mamíferos, la concentración de esfingosina es, por lo general, de 3 a 5 veces más elevada que la de esfinganina. Las fumonisinas pueden alterar la concentración y la proporción entre la esfinganina y la esfingosina de forma que se disminuye la biosíntesis de la esfingosina y se acumula esfinganina. Estas micotoxinas pueden, en células eucarióticas, bloquear la biosíntesis de los esfingolípidos complejos, que son la base de formación de mensajeros secundarios que controlan los diferentes procesos entre células, tales como la activación y desactivación de proteínas específicas y la expresión genética (Lino y col., 2004).

Las fumonisinas han sido asociadas con toxicidad crónica severa incluyendo carcinogénesis y efectos cardiovasculares en algunas especies de animales (Constable y col., 2000; Marasas y col., 1984), además están asociadas también con el cáncer esofágico humano y la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino (Desjardins y Proctor 2001).

Actualmente se conocen al menos veintiocho análogos de fumonisinas en las series A, B, C y P. La serie B es la más importante y las más abundantes son la B₁ y la B₂, donde la B₁ predomina en un 70 a 80 % del total de las fumonisinas (Rheeder y col., 2002; Nelson y col., 1992). La fumonisina B₁ interactúa con la aflatoxina B₁ acelerando el proceso de generación de cáncer hepático en animales de experimentación. Se han encontrado como responsables de diversas afecciones en animales, tales como la leucoencefalomalacia equina, la cual es una enfermedad del cerebro que suele ser fatal en caballos. Típicamente la enfermedad resulta en la muerte dentro de pocas horas a una semana. Se ha establecido a *F. verticilloides* como el agente causante de esta enfermedad (Munkvold y Desjardins, 1997; Wilson y Maronport, 1971). Las fumonisinas también son causantes de edema pulmonar porcino. Este síndrome inicia en el pulmón, el cual es su principal órgano blanco seguido por el hígado.

En relación a la ingestas de la fumonisina B₁, los estudios estadísticos efectuados revelaron que los valores medios de ingesta de fumonisina B₁ a nivel internacional fueron: Europa, 0.2 µg/Kg por día; América Latina, 1.0 µg/Kg por día; África, 2.4 µg/Kg por día; Oriente Medio, 1.1 µg/Kg por día; Extremo Oriente, 0.7 µg/Kg por día; Canadá, 0.02 µg y USA, 0.08 µg/Kg por día. Destaca que en el Reino Unido y Suiza la ingesta media fue de 0.03 µg/Kg por día y en Holanda fue de 0.06 y 1 µg/Kg por día, para el total de la población y para los consumidores regulares de maíz, respectivamente, a pesar de que hubo ingestas que llegaron a los 7.1 µg/Kg por día. En Argentina fue de 0.2 µg/Kg por día y en África del Sur hubo un rango de ingesta que llegó a ser entre 14 y 440 µg/Kg por día (WHO, 2002; Gimeno y Martins, 2006).

Aunque el papel de las fumonisinas presentes en el maíz contaminado está bien establecido en enfermedades del ganado, su papel en enfermedades humanas y particularmente, su potencial carcinogénico es difícil de determinar. En la búsqueda de causas del alto nivel de cáncer de esófago en Transkei, Sudáfrica y en China, se descubrieron altos niveles de fumonisina en maíz que fue usado para consumo humano. Sin embargo, el número de muestras analizadas en estos estudios, no fue suficiente para un análisis epidemiológico (Rheeder y col., 2002; Shephard y col., 1996).

En Sonora, desde 1999 se ha llevado a cabo un monitoreo anual de los hongos que se desarrollan en el maíz en las principales zonas agrícolas (Cortez-Rocha y col., 2003; Gallardo-Reyes y col., 2006; Rosas-Burgos y col., 2006). Estos estudios han evidenciado la presencia del género *Fusarium* en grano de maíz recién cosechado, así como de ser el hongo de mayor incidencia. Además, se presentan diversas especies capaces de producir fumonisina. Como parte de los estudios mencionados, se determinó la presencia de fumonisina B1 en grano y en harinas de maíz nixtamalizado (Cortez-Rocha y col., 2005). En ambos productos se detectó la presencia de esta toxina y en algunas de las muestras en concentraciones mayores a las recomendadas para una porción de alimento en la dieta para caballos, esto es 5 µg/g de fumonisina B1 (Diario Oficial de la Unión Europea, 2006).

Antifúngicos Sintéticos

Evitar la proliferación de enfermedades fúngicas sigue siendo una ardua tarea para el siglo XXI, es por ello que continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos cada vez más potentes. En la síntesis de estos fármacos es muy importante tener en cuenta la relación de su estructura-función, pues sobre la base de ellos se garantiza la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedero (Gregorí, 2005).

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

La síntesis de estos fármacos comenzó en el siglo XX y desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasoras, las cuales han aumentado sustancialmente en las últimas 2 décadas en relación con la aparición de la epidemia del SIDA, uso de fármacos anti-rechazo en pacientes receptores de trasplante y la mayor utilización de dispositivos intravasculares (Diomedi, 2004).

Clasificación

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Tabla1); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Diomedi, 2004; Arenas, 2005).

Mecanismos de Acción

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico (Morrison, 1970; Aveñanos, 1993).

Antifúngicos que actúan sobre la membrana celular del hongo. La membrana celular de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, constituyen aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroides ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a los polienos, azoles y alilaminas (Garnacho-Montero y col., 1998).

- **Polieno.** Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular.
- **Azoles.** Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-a-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de conversión a ergosterol se

comienzan a acumular esteroides tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo (Hiemenz y Walsh, 1996).

- **Alilaminas.** Inhiben a la enzima escualeno epoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo.

Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo. La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas y participa en metabolismo, en especial el catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica.

Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo proteico polisacárido cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular y los procesos de ósmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere.

Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica. Este sitio indispensable para la sobrevivencia de los hongos, también puede ser utilizado por los antifúngicos.

- **Antimetabolitos.** Un clásico antimetabolito es la flucitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleótido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de las proteínas fúngicas, remplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico (Arenas, 2005).
- **Agentes misceláneos.** En esta clase se encuentra el griseofulvin, el cual inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular (Arenas, 2005)

Estructura

Anfotericina B complejo lipídico (ABLCL). Es una lactona macrocíclica con estructura poliénica (Figura 4). Como con las otras formulaciones de lípidos, la meta mayor de desarrollar ABLCL ha sido lograr un compuesto con la más baja toxicidad y con una eficacia similar comparada con la del compuesto anfotericina B de formulación convencional.

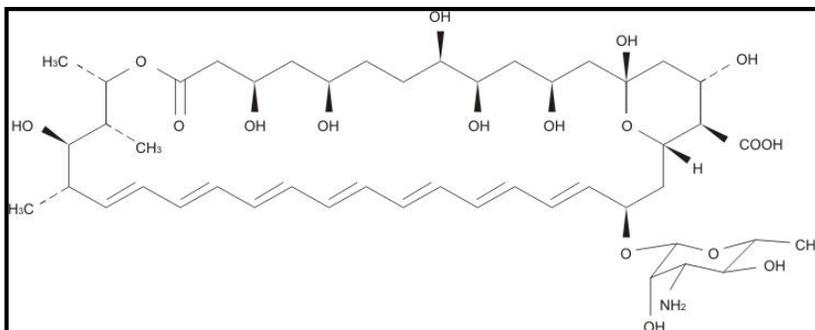


Figura 4. Estructura de la anfotericina B.

Fuente: Gregori (2005).

La anfotericina B forma complejos con los ergosteroles de la membrana gracias a la conformación de cinta que presenta, quedando el ergosterol atrapado en ella. La anfotericina B rodea al ergosterol y puede asociarse con éste a través de asociaciones intermoleculares del tipo Van der Waals tipo London entre la parte lipofílica del fármaco y del ergosterol. También pueden formarse puentes de hidrógeno entre las regiones hidrofílicas del fármaco.

Las marcas de anfotericina B liposomal son menos tóxicas que anfotericina B estándar. Sin embargo, anfotericina B estándar actúa más rápidamente que cualquiera de los medicamentos liposomales y generalmente es el medicamento elegido cuando la candidiasis u otra infección por hongos son graves y ponen en riesgo la vida (Garnacho-Montero y col., 1998; Olsen y col., 1991).

Fluconazol. Agente antifúngico ampliamente usado. Como otros triazoles, tiene 2 anillos que contienen 3 átomos de nitrógeno. El anillo bencénico presenta 2 moléculas de flúor (Figura 5). Su peso molecular es relativamente bajo, 306,3 Da (Wasan y col., 1998). Es una molécula polar y simétrica lo que favorece su hidrosolubilidad. Su aspecto es de polvo blanco y cristalino, es una base extraordinariamente débil (pKa 3.7) y no ionizable a pH fisiológico. Su

buena solubilidad en agua le hace apto para administración endovenosa, penetrando muy bien en fluidos corporales.

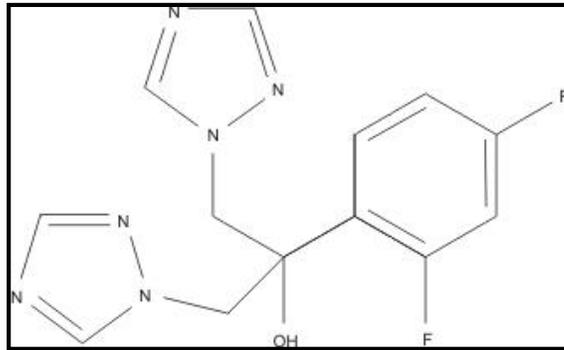


Figura 5. Estructura del fluconazol

Fuente: Gregori (2005).

Este fármaco pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través de puente de hidrógeno entre el grupo C=O de la enzima y el grupo OH del fármaco, interacción que tiene una fuerza de unas 5 kcal/mol (Wong-Beringer y col., 1998; Debruyne y Ryckelynck, 1993).

Voriconazol. Es un triazol (Figura 6) de segunda generación de amplio espectro, derivado sintético del fluconazol.

Interacción con el sitio activo: este fármaco se asocia con sitios activos de la enzima a través de puente de hidrógeno que se forma entre el grupo C=O electronegativo de la enzima y el hidroxilo del fármaco, así como también por posibles asociaciones Van der Waals CH₃ del fármaco y CH₃ de la enzima (Denning 2002; McGinnis y col., 1998).

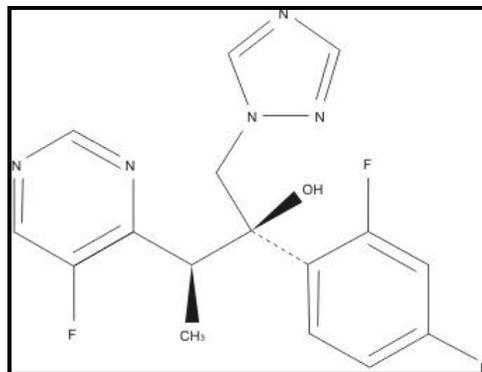


Figura 6. Estructura del voriconazol.

Fuente: Gregori (2005).

Ketoconazol. Agente antifúngico de imidazol (Fig. 7). Como otros imidazoles, tiene 5 estructuras del anillo que contienen 2 átomos de nitrógeno. La formulación oral está disponible en EE.UU. desde 1981. El ketoconazol es el único miembro de la clase del imidazol que se usa actualmente para el tratamiento de infecciones sistémicas. Este antifúngico es un compuesto lipofílico, propiedad que le permite encontrarse en concentraciones altas en los tejidos grasos aunque sus concentraciones en el fluido cerebroespinal es pobre en presencia de inflamación. Su absorción oral y solubilidad es óptima a pH ácido gástrico (McGinnis y col., 1998; Hoban y col., 1999).

Se usó muy ampliamente antes del desarrollo de nuevos, menos tóxicos, y más eficaces compuestos del triazol como fluconazol e itraconazol, pero su utilización en estos momentos ha estado limitada.

Interacción con el sitio activo: el ketoconazol pudiera asociarse con sitios activos de la enzima a través asociaciones Van der Waals CH_3 del fármaco y CH_3 de la enzima.

El ketoconazol es una droga de segunda línea. La afinidad de éste con las membranas celulares fúngicas es menor comparada con la del fluconazol e itraconazol. El ketoconazol tiene más potencial ante las membranas celulares de mamífero y por ello induce a la toxicidad (Kauffman, 1996).

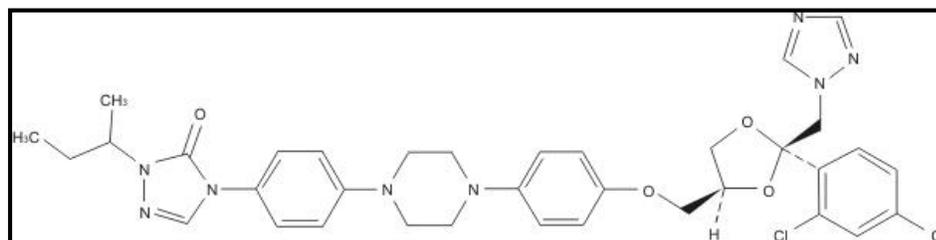


Figura 7. Estructura del ketoconazol

Fuente: Gregori (2005).

Alternativas al Uso de Antifúngicos Sintéticos

La presencia tanto de aflatoxinas como de fumonisinas en los alimentos representa serios problemas mundiales tanto en la salud pública como económicamente. A lo largo de varios años se ha tratado de controlar tanto el desarrollo del hongo como la producción de las micotoxinas, ya sea inhibiendo el hongo productor o por degradación de la misma toxina, donde los productos químicos han sido una alternativa durante muchos años. Sin embargo, el uso excesivo de estos tratamientos químicos ha presentado inconvenientes como contaminación

tanto a los seres vivos como al medio ambiente, así como también ha habido un aumento de poblaciones de patógenos resistentes y la presencia y acumulación de residuos químicos en los alimentos, lo que conlleva a problemas en la salud humana y animal.

Debido a la presencia de cepas resistentes a los fungicidas de hongos patógenos en los cereales y al conocimiento de que fungicidas sintéticos representan un riesgo para la salud humana, hay un mayor interés en el estudio y la utilización de compuestos antifúngicos obtenidos de fuentes naturales para remplazar fungicidas sintéticos (Wedge y Smith 2006).

Como producto de estos intereses se han desarrollado estudios en los que se ha encontrado que existen diferentes compuestos de origen natural que son un potencial para el control de los hongos. Tal es el caso del quitosano, el cual puede ser obtenido a partir de desechos de crustáceos. Se ha reportado que el quitosano tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos de importancia como lo son *Aspergillus niger* (Plascencia-Jatomea y col., 2003) y *Fusarium verticillioides* (Suárez-Jiménez, 2007), entre otros, debido a su carácter catiónico responsable de su actividad antimicrobiana, siendo probablemente una alternativa viable para inhibir el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas.

También, muchos aceites esenciales de plantas han demostrado ser eficaces contra la contaminación de hongos (Paranagama y col., 2003). El aceite esencial de *Clamintha nepeta* tiene actividad contra *Aspergillus niger* (Kitic y col., 2002), al igual que el aceite esencial de *Nepeta catania* (Bourrel y col., 1993); en ambos, uno de los principales componentes es la piperitona.

Chrysactinia mexicana (Astereaceae), comúnmente conocido como hierba de San Nicolás, es un pequeño arbusto distribuido por todo el centro y el norte de México (Rzdowski y Rzdowski, 2001). Esta planta es utilizada en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades respiratorias e infecciones de la piel (Martínez, 1968). Estudios previos sobre esta planta informaron la presencia de flavonoides, tiofenos y terpenos como parte de sus componentes químicos (Harbone y col., 1991; Domínguez y col., 1985, Domínguez y Pierantozzi, 1972) además se encontró que el extracto de hexano de la planta en mención, tiene actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* (Cárdenas y col., 2003).

Otra alternativa al uso de antifúngicos sintéticos son los compuestos que pueden ser extraídos de plantas. Se asume que, en general, los extractos de plantas son más aceptables y menos peligrosos que los compuestos sintéticos por lo que constituyen una alternativa potencial en el establecimiento de metodologías para el control de hongos fitopatógenos (Jobling, 2000).

Existen numerosos estudios en los que se ha comprobado que los compuestos extraídos con solventes de distinta naturaleza, de muy diversas especies de plantas, son capaces de

inhibir el crecimiento de diversos tipos de organismos entre los que se encuentran los hongos (Vargas-Arispuro y col., 2005; Céspedes y col., 2006; Koketsu y col., 1996; Cárdenas-Ortega y col., 2005; Müller-Riebau y col., 1995).

Entre las diferentes especies de plantas estudiadas, nativas del estado de Sonora, se encuentran *Baccharis glutinosa* y *Jacquinia macrocarpa*, cuyos extractos metanólicos han sido capaces de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos del maíz *A. flavus*, *A. parasiticus* y *F. verticillioides* (Rosas-Burgos y col., 2009; Buitimea-Cantúa y col., 2010).

Baccharis glutinosa

Arbusto de 80 cm a 2 m de altura y follaje pegajoso. Las hojas son alargadas y angostas en los extremos (Figura 8). Tiene cabezuelas globulares y laxas, unas con flores masculinas y otras con flores femeninas, ambas blanquecinas. Los frutos son muy pequeños y cafés. Habita en climas semicálido y templado. Su principal uso medicinal es contra la infección y dolor de estómago; como tratamiento se emplea la planta restregada sobre el vientre, o su cocción se bebe en ayunas. Se recomienda también contra derrames de bilis. En Morelos y Oaxaca, se utiliza contra algunas enfermedades culturales como mal aire, susto, y el dolor de cabeza (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2012).



Figura 8. Hojas y flores de *Baccharis glutinosa*.

Fuente: Pima Community College (2012).

Se le emplea también contra tumores causados por golpes o caídas, en los que puede o no haber dolor (son bolas pequeñas o grandes, que aparecen en alguna parte del cuerpo). Para curarlos se aplican sobre ellos las hojas maceradas en alcohol. Por otra parte, se usa para tratar el salpullido (que se desarrolla por permanecer mucho tiempo en el calor o por piquete de

algún animal), y la varicela. En tal caso se aplican baños con el cocimiento del tallo y la flor, más un puño de carbonato.

Bacharis glutinosa es una planta medicinal tradicional utilizada por los nativos del Noroeste de México (Moreno-Salazar y col., 2008). Los extractos acuosos de polvo de hojas secas de *B. glutinosa* inhiben el desarrollo de dermatofitos *in vitro* (DiSalvo, 1974). Se ha publicado que los extractos metanólicos de esa planta contienen propiedades antifúngicas contra algunos fitopatógenos y hongos toxigénicos (Suárez-Jiménez y col., 2007; Tequida-Meneses y col., 2002). El modo de acciones de los agentes antifúngicos puede ser de diferentes maneras, como su capacidad de causar retraso del crecimiento de hongos (Razzaghi-Abyaneh y col., 2006), o la muerte del micelio por ataque a la pared celular (Kamilla y col., 2009). Este último modo es sugerido en una investigación donde se estudió el efecto de extractos de *B. glutinosa* sobre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium verticillioides* (Rosas-Burgos y col., 2011). Sin embargo no existen estudios detallados sobre el efecto de *B. glutinosa* contra el desarrollo de hongos.

Jacquinia macrocarpa

Una alternativa más al uso de antifúngicos sintéticos son especies de las plantas de *Jacquinia*, ya que se ha visto que algunas especies han sido capaces de inhibir el crecimiento fúngico como lo son *J. ruscifolia* (Sharma y col., 2008) y *J. flamea* (García-Sosa y col., 2011). Buitimea-Cantúa y col. (2010), reportaron un efectos de inhibición del crecimiento radial sobre los hongos *F. verticillioides*, *A. flavus* y *A. parasiticus* cuando fueron tratados con extractos de *Jacquinia macrocarpa*. Aunque es importante aclarar que del género *Jacquinia* existe poca información en relación a su actividad biológica.

J. macrocarpa es un árbol de hoja perenne de aproximadamente 20 pies de altura, corteza lisa color gris y el tronco y tallos gruesos, sin espinas y densamente ramificado. Ocasionalmente se le observa con mayor frecuencia por separado o en pequeños grupos en viviendas de las dunas costeras. La planta de *J. macrocarpa* tiene densas y bien redondeadas coronas, mientras otras tienen formas grotescas, sobre todo cuando se encuentran en decadencia. Las flores son pequeñas, aproximadamente de 1/3 de pulgada de ancho, son rojizas-anaranjadas y rígidas (Figura 9). Estas flores son atractivas y tienen la apariencia de flores secas; aparecen en la primavera, generalmente en el mes de Mayo.

El fruto que da esta planta es una vaina redonda, cerca de la mitad de una pulgada de diámetro. Las semillas son muy cotizadas por las aves y los roedores que dejan montones de

vainas rotas donde se ha recogido para comer las semillas. Los tallos extremos terminales tienen espinas afiladas; las hojas son estrechas, aproximadamente de 1 a 2 pulgadas de largo por $\frac{1}{4}$ de pulgada de ancho, con bordes oscuros, de color verde, gruesa y puntiaguda. Las mujeres de la tribu Seri hacían collares con las flores de la planta, mientras que los hombres tallaban imágenes o sus nombres en su corteza lisa de color gris.



Figura 9. Árbol, flores y hojas de *Jacquinia macrocarpa*.

Fuente: PaCTeHNR (2010).

Estos compuestos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. Se han llevado a cabo diversos estudios para tratar de dilucidar los mecanismos de acción de algunos compuestos obtenidos de extractos de plantas con actividad antifúngica, en donde se ha evidenciado la inhibición de la síntesis y ensamble de glucano de la pared celular (Zacchino y col., 1998), así como de quitina (Urbina y col., 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Fracciones Antifúngicas

Las plantas seleccionadas para ser evaluadas en este estudio fueron *Baccharis glutinosa* (batamote) y *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico), pertenecientes a las familias *Compositae* y *Theophrastaceae*, respectivamente.

Se utilizaron las fracciones de *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* que fueron obtenidas en trabajos previos, partiendo de un extracto metanólico elaborado con las partes aéreas de cada una de las plantas (al 6% en metanol al 70%). A partir de los extractos metanólicos se separaron por repartición en solventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y n-butanol). Las fracciones con actividad antifúngica, la de acetato de etilo para *B. glutinosa* y la butanólica para *J. macrocarpa*, fueron sometidas a cromatografía de columna abierta y cromatografía de capa fina para obtener fracciones activas con mayor pureza (Rosas-Burgos y col., 2009; Rosas-Burgos y col., 2011).

Elaboración de Suspensiones de Esporas

Para corroborar que las fracciones de plantas obtenidas poseían actividad antifúngica contra los hongos en estudio, se llevó a cabo la determinación de crecimiento radial. Se usaron cepas de *Aspergillus flavus* (ATCC 200025) y *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme* ATCC 52539) las cuales fueron mantenidas en agar papa dextrosa (PDA). Con cada uno de los hongos se procedió de la siguiente forma: Se elaboró un inóculo por propagación de esporas en PDA a 25 °C por 4 días. Las esporas se re-suspendieron en Tween-80 al 0.1% (v/v) con 5 min de agitación magnética. La concentración de esporas se determinó por conteo en cámara de Neubauer (Davet y Rouxel, 2000).

Cinética de Crecimiento Radial

Placas Petri conteniendo medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y adicionadas con 5 mg ml⁻¹ de las fracciones activas de ambas plantas, se inocularon al centro de la placa con una suspensión de 1 x 10⁴ esporas ml⁻¹ de *A. flavus* o *F. verticillioides*. Se utilizaron dos tipos de

controles, uno conteniendo medio PDA y una alícuota de metanol igual a la utilizada para disolver las fracciones antifúngicas, y el otro conteniendo sólo PDA. Las placas Petri inoculadas se incubaron en la oscuridad a 27 °C para *Aspergillus*, o a 25 °C para *F. verticillioides*. Se midió el diámetro de las colonias cada 12 h de acuerdo el procedimiento descrito por Plascencia-Jatomea y col. (2003).

Germinación de Esporas

En una placa Petri de vidrio se colocaron cubreobjetos, se esterilizaron y sobre ellos se vertieron 10 ml de caldo papa dextrosa (PDB) conteniendo 5.0 mg ml⁻¹ de fracción antifúngica. Posteriormente se inocularon con 20 µl de una suspensión de 1 x 10⁵ esporas ml⁻¹ de *A. flavus* o *F. verticillioides*, y se monitoreó su desarrollo hasta su germinación. Cada 3 h se tomó un cubreobjetos contenido en la caja Petri y se contaron 200 esporas al azar, determinando el número de esporas germinadas. Una espora se consideró germinada cuando la longitud del túbulo germinal fue igual o mayor al diámetro total de la espora (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Se utilizaron dos tipos de controles descritos anteriormente.

Efecto sobre Estructuras

El análisis microscópico de epifluorescencia permitió apreciar el efecto de las fracciones antifúngicas añadidas sobre el proceso de divisiones mitóticas y proceso de formación de septos de los hongos en estudio. Se utilizó el procesador de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.) para analizar datos de longitudes de cada una de las estructuras de interés observadas y de las densidades en el caso de núcleos. En todas las pruebas se emplearon los dos tipos de controles descritos anteriormente.

Número de Septos de las Hifas

Se determinó mediante tinción con blanco de calcoflúor (10 µg ml⁻¹), el cual emite fluorescencia al adherirse a quitina y a glucanos, permitiendo la visualización de las paredes celulares y septos. Se utilizó un filtro azul-violeta a una longitud de onda de excitación y emisión de 350-360 y 600-610 nm (Momany y Taylor, 2000).

Número de Divisiones Mitóticas

Se llevó a cabo mediante preparaciones fijas utilizando tinción con 2 gotas de Bisbenzimidida H 33258, incubando a 25 °C durante 5 min (Plascencia-Jatomea y col., 2003). El colorante es específico para DNA, lo cual permite visualizar el material nuclear de las células fúngicas. Se utilizó un filtro azul-violeta a una longitud de onda de emisión y excitación de 330-380 y >420 nm (Momany y Taylor, 2000).

Diámetro de Esporas

El diámetro de las esporas fue determinado de acuerdo al procedimiento descrito por Harris (1999). En una placa Petri se colocaron cubreobjetos y sobre ellos se vertieron 10 ml de caldo papa dextrosa (PDB) conteniendo 5.0 mg ml⁻¹ de fracción antifúngica. Posteriormente se inocularon con 20 µl de una suspensión de 1 x 10⁵ esporas ml⁻¹ de *A. flavus* o *F. verticillioides*, y se monitoreó su desarrollo hasta su germinación. Cada 3 h se tomó un cubreobjetos contenido en la caja Petri y se registraron las medidas de 100 esporas, utilizando un programa para procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.). En el caso de *F. verticillioides* las mediciones se realizaron a lo largo y a lo ancho de la espora.

Longitud y Diámetro de Hifas

Después de un periodo de 72 h de incubación de los hongos en PDA conteniendo 5.0 mg ml⁻¹ de fracción antifúngica se realizaron 100 mediciones de la longitud y del diámetro de las hifas del micelio apical. Las mediciones se llevaron a cabo empleando un programa para procesamiento de imágenes Image-Pro Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.) de acuerdo al método reportado por Larralde y col. (1997) y Cox y col. (1998). También se realizaron 100 mediciones del micelio desarrollado en placas con cada uno de los controles.

Análisis de Viabilidad de Esporas

Se cortaron discos de 2.5 cm de diámetro de papel celofán sin color y se colocaron uno arriba de otro intercalados con papel filtro, para posteriormente ser esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min. En la superficie de placas Petri conteniendo medio PDA solidificado y 5 mg ml⁻¹ de fracción antifúngica, se distribuyeron los discos de celofán, los cuales se inocularon en el

centro con 50 µl de suspensión de esporas de cada uno de los hongos. Se incubaron a 25 °C en la oscuridad y posteriormente se analizaron desde el tiempo cero (antes de incubar) y a las 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. A cada uno de esos tiempos los discos de celofán fueron removidos con pinzas del medio de cultivo, colocados en un portaobjetos y bañados con una solución de colorante fluorescente recién preparada de FDA [3,6´diacetil fluoresceína-FDA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a una concentración final de 5 mg ml⁻¹ de acetona, diluida 2500 veces en buffer de fosfato salino (PBS), pH 7.4 al momento de uso] y EB [2,7-diamino-10-etil-9-fenil fenantridina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a una concentración de 1 g ml⁻¹ en PBS y diluida 20 veces en PBS al momento de uso] en volúmenes iguales. Los portaobjetos fueron incubados a 25 °C por 30 min, posteriormente, cubiertos con un cubreobjetos y examinados bajo un microscopio de fluorescencia. Se contaron 100 células por cada portaobjetos para observar esporas viables (coloración verde) y no viables (coloración roja) (Granjo y col., 2007; López y col. 2002).

Diseño Experimental y Análisis de Datos

Se realizó un diseño de experimentos factorial completo de 2 X 2 considerando como factores de variación: el extracto antifúngico (de *J. macrocarpa* y de *B. glutinosa*) y tipo de hongo (*A. flavus* y *F. verticillioides*). Las variables de respuesta fueron los porcentajes de la inhibición del crecimiento radial, de viabilidad de esporas, de germinación de esporas, así como número de septos, número de divisiones nucleares, diámetro de esporas, diámetro y longitud de hifas. En todos los casos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las diferencias significativa entre grupos se determinaron mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de Crecimiento Radial

Los resultados de la evaluación del crecimiento radial mostraron que tanto la fracción antifúngica de *B. glutinosa* como la de *J. macrocarpa* inhibieron el crecimiento de *A. flavus* y *F. verticillioides* en comparación con el crecimiento obtenido en el control puro y en el control metanol.

La cinética del crecimiento radial de *A. flavus* en el medio PDA con extracto de *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* se muestra en la figura 10. En esta figura se puede observar que con los tratamientos con ambas fracciones antifúngicas, el crecimiento radial fue menor en comparación con los controles. La fracción antifúngica que causó el mayor porcentaje de inhibición fue la de *J. macrocarpa*, ya que inhibió el crecimiento del hongo hasta un 54 %, con un radio de tan solo 8 mm, en periodo total de 96 horas. En cambio, con el tratamiento de *B. glutinosa* se logró inhibir el crecimiento del hongo un 50 % (9 mm de radio). Mientras que con el control puro y el control metanol se tuvo un crecimiento radial de 22 mm y 18 mm, respectivamente para el hongo en mención. Estos resultados indican que el extracto de *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* presenta un efecto negativo el crecimiento de *A. flavus*.

Por otra parte, al igual que *A. flavus*, el crecimiento radial de *F. verticillioides* también se ve afectado al estar bajo el tratamiento de ambas fracciones antifúngicas ya que el radio de la colonia es menor que el control PDA y el control metanol. En la figura 11 se observa notablemente como el crecimiento del hongo en ausencia de antifúngico es mucho mayor que al encontrarse bajo el tratamiento de ambas fracciones antifúngicas. La fracción antifúngica de *B. glutinosa* presentó un porcentaje de inhibición de 69% con un crecimiento de tan solo 3 mm de radio, siendo el tratamiento de mayor eficacia para este hongo en comparación con *J. macrocarpa* que sólo logró inhibir el crecimiento radial un 48%, con un radio de 5 mm. Dichos datos se obtuvieron después de un periodo de incubación de 96 horas. Cabe mencionar que cuando *F. verticillioides* se encontraba en el medio con las fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa* y *B. glutinosa*, el crecimiento del hongo inició entre las 48 a 72 horas de incubación, anteriormente no se observó crecimiento o desarrollo del hongo.

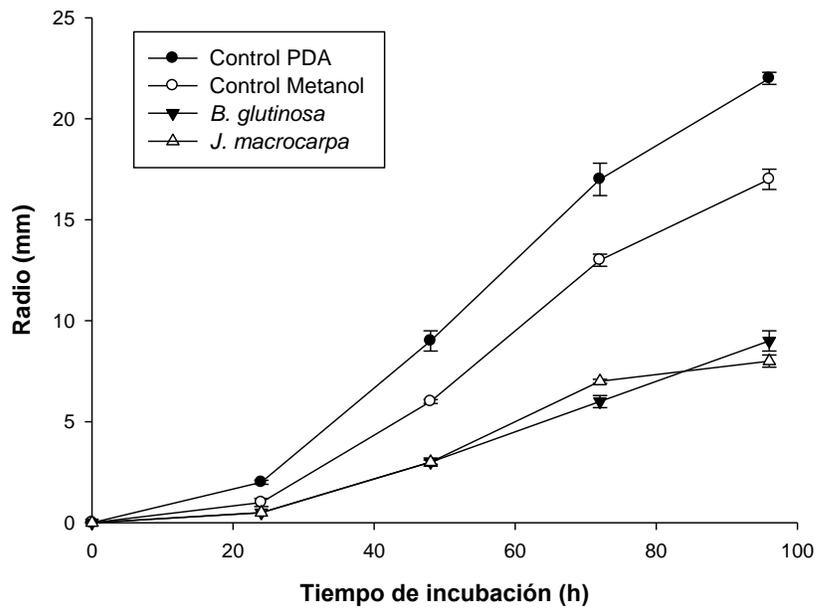


Figura 10. Crecimiento radial de *A. flavus* en medio PDA con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa* y *B. glutinosa*, control metanol y control PDA.

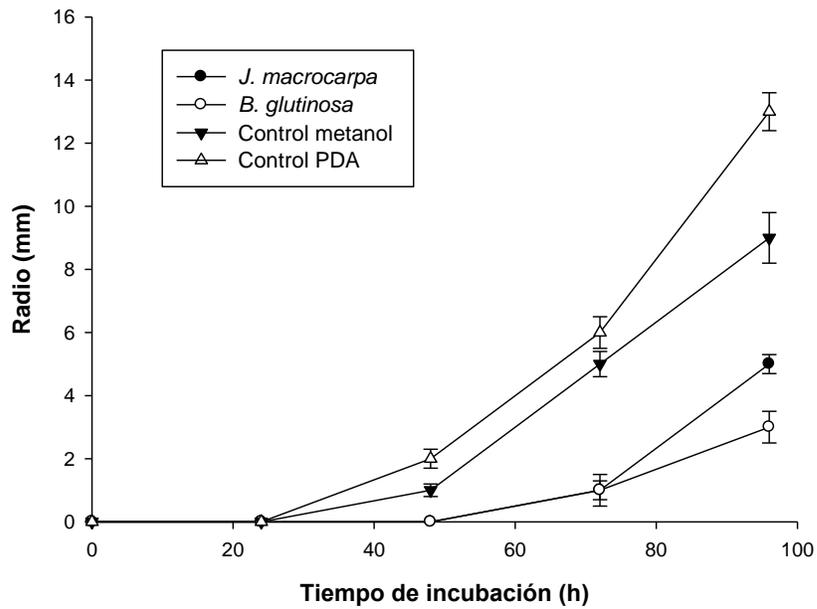


Figura 11. Crecimiento radial de *F. verticillioides* en medios con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa* y *B. glutinosa*, control metanol y control PDA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *A. flavus* fue más sensible a la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* que a la de *B. glutinosa* ($P < 0.05$). Contrariamente, *F. verticillioides* fue más inhibido por la fracción antifúngica de *B. glutinosa* que por la de *J. macrocarpa* ($P < 0.05$). Estos resultados pueden ser debidos a diferentes factores. Por una parte, es posible que debido a que los hongos en estudio pertenecen a diferentes especies y géneros, sus diferencias estructurales los hacen más o menos sensibles a los compuestos químicos presentes en los extractos antifúngicos, aun y cuando se trataran de los mismos compuestos. Por otro lado, debido a que las fracciones antifúngicas fueron obtenidas de diferentes plantas, es muy posible que los compuestos responsables de la inhibición fúngica, sean distintos y, por lo tanto, éstos actúen de distinta forma sobre cada uno de los hongos.

Efectos antimicrobianos de extractos de *J. macrocarpa* únicamente han sido reportados por Buitimea-Cantúa y col. (2010), quienes reportaron un efectos de inhibición del crecimiento radial sobre los hongos *F. verticillioides*, *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos autores obtuvieron un mayor efecto inhibitorio sobre *F. verticillioides*.

Existen muy pocos estudios reportados sobre actividad antimicrobiana con otras especies del género *Jacquinia*. Se ha visto que algunas especies han sido capaces de inhibir el crecimiento fúngico como lo es *Jacquinia ruscifolia* cuyos extractos etanólicos de sus pétalos mostraron actividad inhibitoria contra 10 de los 12 hongos evaluados (Sharma y col., 2008). *Jacquinia flamea* mostró moderada actividad antifúngica contra dermatofitos y muy fuerte actividad contra *Colletotrichum gloeosporioides* (García-Sosa y col., 2011).

Se ha publicado que los extractos metanólicos crudos de *B. glutinosa* contienen propiedades antifúngicas contra algunos fitopatógenos y hongos toxigénicos. Suárez-Jiménez y col. (2007) reportaron un 89.9 % de inhibición del crecimiento radial contra *F. verticillioides* al estudiar el efecto de extractos metanólicos de esta planta. Tequida-Meneses y col. (2002) encontraron un 37.4 % y 66.6 % de inhibición del crecimiento radial contra *A. flavus* y *F. verticillioides*, respectivamente al utilizar también un extracto metanólico crudo de *B. glutinosa*. Los resultados de este último estudio y los reportados por Rosas-Burgos y col. (2009) coincide con los resultados obtenidos en este estudio en relación a ser *F. verticillioides* el hongo más inhibido comparado con *A. flavus*.

Existen también otros reportes de extractos de plantas recolectadas en el estado de Sonora que presentan un efecto inhibitorio contra hongos fitopatógenos. Ruiz-Bustos y col. (2009) reportan que el extracto metanólico de *Jatropha cuneata* (Sangregado) presentó actividad antifúngica contra *F. verticillioides* mostrando un 42% de inhibición en el crecimiento radial.

Germinación de Esporas

Los resultados obtenidos para *A. flavus* en esta prueba se pueden apreciar en la figura 12, en donde se observa que el porcentaje de esporas germinadas en el medio con ambas fracciones antifúngicas fueron menores que los controles, y entre las dos fracciones, la de *J. macrocarpa* causó la mayor inhibición. El porcentaje de germinación de esporas en el medio PDA se incrementa rápidamente conforme avanza el tiempo hasta llegar al punto del 100 % a las 24 h, mientras que las esporas que se encuentran bajo el tratamiento de *J. macrocarpa* tienen un porcentaje de 2.5 % de germinación a la misma cantidad de horas y de 25 % para *B. glutinosa*, que comparado con el porcentaje del control PDA, la diferencia es significativa ($P < 0.05$). También se aprecia que a partir de las 24 h, la germinación de esporas tratadas con *J. macrocarpa* muestra un mayor aumento, mientras que con *B. glutinosa* esto se observa a partir de las 14 h. Este comportamiento puede deberse a que los extractos afectan principalmente las primeras fases de este proceso y posteriormente, es probable que el hongo desarrolle cierta resistencia o adaptación al compuesto presente en el medio. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Vargas-Grijalva (2010). Se ha reportado que algunos hongos como *A. flavus* y *F. verticillioides* posiblemente tengan mecanismos enzimáticos que impidan la acción de metabolitos secundarios producidos por la plantas y en consecuencia pueden resistir una gran variedad de ellas (Montes-Belmont y col., 2000).

En el caso de *F. verticillioides*, también es evidente (Figura 13) que el porcentaje de germinación en el medio conteniendo ambas fracciones antifúngicas durante las primeras etapas de germinación (16 h), fue menor que en los controles ($P < 0.05$). Sin embargo la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* no logra inhibir la germinación de las esporas de *F. verticillioides* hasta el final del experimento, es decir sólo ocurre un atraso en la germinación durante las primeras 16 h, incrementándose abruptamente a partir de ese tiempo. Este resultado puede ser comparado con otros autores, donde también se puede apreciar una inhibición de la germinación de la espora muy bajo (Vargas-Grijalva y col., 2010).

Por otro lado, cuando las esporas de *F. verticillioides* fueron expuestas a la fracción antifúngica de *B. glutinosa*, se puede observar una inhibición de la germinación muy marcada durante las 48 h de incubación. Al final del experimento se obtuvo un porcentaje de inhibición del 78 % con relación al control con metanol.

El efecto de los extractos de plantas en el proceso de germinación de esporas ya ha sido evaluado previamente. Sin embargo, la inhibición de la germinación de esporas varía ampliamente entre plantas. En un estudio realizado con el extracto primario de *Krameria erecta*

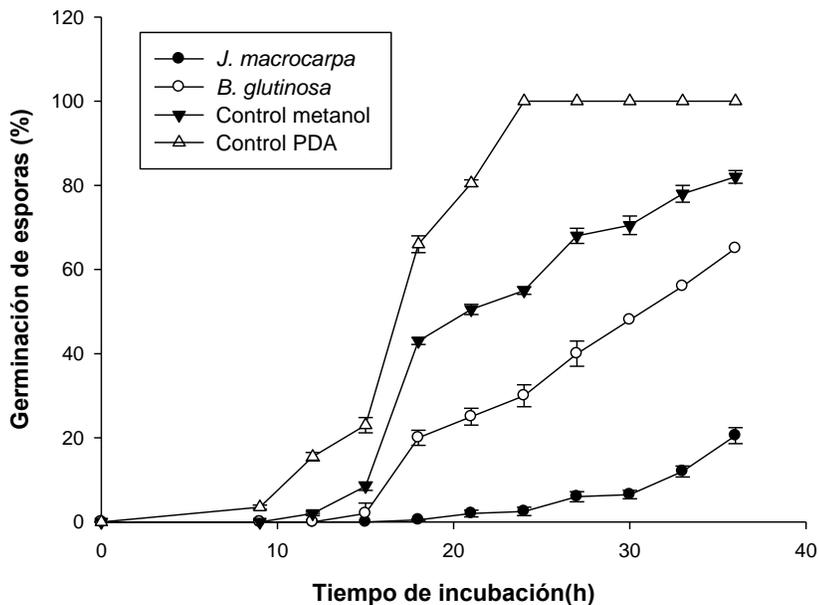


Figura 12. Porcentaje de esporas germinadas de *A. flavus* en medio PDA con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa*, *B. glutinosa*, control PDA y control metanol.

mostró actividad inhibitoria de germinación sobre *F. verticillioides*, mientras que los valores entre dos especies de *Aspergillus* no mostraron diferencias significativas (Vargas-Grijalva y col., 2010). Además, en un estudio realizado por Suarez-Jiménez y col. (2007), se evaluaron extractos metanólicos de plantas recolectadas en la región de Hermosillo, Sonora, contra *F. verticillioides* en este estudio, se encontró que el extracto de la planta *Ambrosia confertiflora* inhibió la germinación de esporas en un rango de 68-88 %, siendo esta inhibición mayor a los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, los extractos de *Bacharis glutinosa* y *Larrea tridentata* fueron más efectivos, con un rango de inhibición de 88-100%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Abou-Jawdah y col. (2004), en donde se encontró que el efecto sobre la germinación varió entre las plantas estudiadas, ya que de 9 plantas evaluadas contra *F. oxysporum*, sólo cuatro de ellas presentaron altos porcentajes de inhibición de germinación de esporas. Se encontraron resultados similares al estudiar el efecto de 40 plantas sobre la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*, reportando que el efecto de los extractos sobre la germinación varía según la planta, incluso hay diferencias de acuerdo al lugar de recolección de las mismas (Hernandez-Albiter y col., 2007). Esto se debe a que no todas las

plantas contienen los mismos compuestos que afectan el crecimiento de los hongos, ni en las mismas concentraciones.

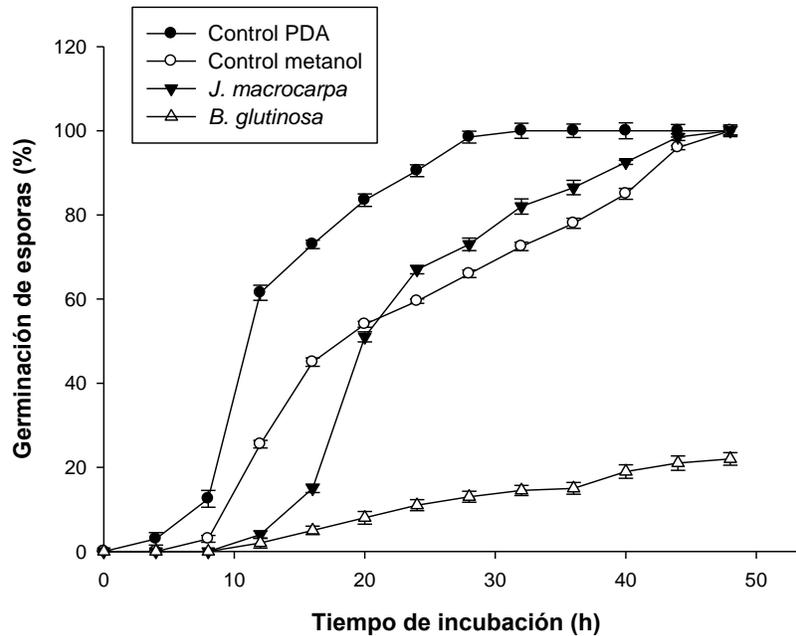


Figura 13. Porcentaje de esporas germinadas de *F. verticillioides* en medio PDA con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa*, *B. glutinosa*, control PDA y control metanol.

Efecto sobre Estructuras

Número de Septos

Durante el desarrollo de los experimentos para observar el número de septos que se desarrollaron en los hongos tratados con los distintos tratamientos no fue posible hacer una comparación de las esporas tratadas con las fracciones antifúngicas y los controles. Esta situación fue debida a que las esporas tratadas con las fracciones antifúngicas tuvieron un retraso en la germinación que no permitió la formación de hifas y, por ende, la formación de septos. Cuando la germinación de estas muestras inició, ya las muestras con tratamiento control tenían un avanzado proceso de formación de micelio que no se podían diferenciar los septos formados y, por lo tanto, no se pudo obtener un patrón de referencia para comparación.

Número de Divisiones Mitóticas

Los valores obtenidos en el análisis de la división mitótica de cada hongo nos indican que las fracciones antifúngicas de las plantas *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* tienen un efecto negativo en contra de los hongos. Se realizó el monitoreo de *A. flavus* a las 12, 15, 18 y 21 horas (Tabla 1), mientras que para *F. verticillioides* se observó a las 21, 24, 27 y 30 horas (Tabla 2).

Tanto *J. macrocarpa* como *B. glutinosa*, causaron un efecto negativo en cuanto a la división mitótica de ambos hongos, mismos que no lograron su división en ninguna de las horas de análisis que en comparación con el control PDA y control metanol. Estos últimos si presentaron una división por lo menos en dos de las cuatro observaciones realizadas para cada uno de los hongos.

Es posible que estos resultados sean debidos al retraso que presentan los hongos tanto en la germinación como en el desarrollo del micelio, al ser expuestos a las fracciones antifúngicas. Es decir, en el tiempo en que se llevó a cabo este experimento, las fracciones antifúngicas no permitieron llevar a cabo una completa división nuclear.

Tabla 1. Número de células de *Aspergillus flavus* que contuvieron el número de núcleos indicado a las 21 horas de incubación.

Tratamiento	1 núcleo	2 núcleos	3 núcleos	4 núcleos
Control PDA	59	21	14	6
Control metanol	87	13	---	---
<i>B. glutinosa</i>	100	---	---	---
<i>J. macrocarpa</i>	100	---	---	---

Por cada tratamiento se observaron 100 células. Valores promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Tabla 2. Número de células de *Fusarium verticillioides* que contuvieron el número de núcleos indicado a las 30 horas de incubación.

Tratamiento	1 núcleo	2 núcleos	3 núcleos	4 núcleos
Control PDA	71	18	7	4
Control metanol	87	11	2	---
<i>B. glutinosa</i>	100	---	---	---
<i>J. macrocarpa</i>	100	---	---	---

Por cada tratamiento se observaron 100 células. Valores promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

Diámetro de esporas

Las esporas de *A. flavus* incrementaron su diámetro cuando fueron incubadas en ambos tipos de controles utilizados, sin embargo, cuando éstas fueron incubadas en presencia de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, el diámetro se redujo significativamente ($P < 0.05$) en comparación con los controles (Figura 14). Por su parte, las esporas de *F. verticillioides* cultivadas en presencia de la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con los controles en diámetro (Figura 15) y en longitud (Figura 16).

En presencia de la fracción antifúngica de *B. glutinosa* el comportamiento de las esporas fue diferente. El diámetro de las esporas de *A. flavus* tuvo un comportamiento similar al de los controles, es decir, las esporas fueron incrementando su diámetro paulatinamente a través de tiempo de incubación (Figura 14), sólo que el incremento fue menor que en el de los controles ($P < 0.05$). Sin embargo, en el caso de *F. verticillioides* sucedió algo distinto, tanto el diámetro (Figura 15) como la longitud de las esporas (Figura 16) fue disminuyendo a través del tiempo, cuando éstas fueron sometidas al tratamiento con la fracción antifúngica de *B. glutinosa*, contrario a lo que sucedió con los controles.

El diámetro de las esporas de ambos hongos presentó un efecto negativo, observándose que la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* afectó más a las esporas de *A. flavus*, mientras que la fracción antifúngica de *B. glutinosa* lo hizo mayoritariamente sobre las de *F. verticillioides*.

Al final del periodo de incubación (36 h), se obtuvo una mayor reducción del diámetro de las esporas de *A. flavus* con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* con un porcentaje de 36.5%, mientras que la fracción antifúngica de *B. glutinosa* causó una reducción del 9%, con respecto al control con metanol.

Al final del experimento (36 h), la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* no logró una reducción significativa ($P < 0.05$) del diámetro ni de la longitud de las esporas de *F. verticillioides*, sin embargo, la fracción antifúngica de *B. glutinosa* pudo reducir un 19 % y 25 % el diámetro y longitud, respectivamente, con respecto al control con metanol.

En un estudio realizado por Rosas-Burgos y col. (2011), observaron una disminución en el diámetro de esporas de *A. flavus* al ser tratado por *B. glutinosa*. Al realizar observaciones en el microscopio de luz estos autores pudieron apreciar una reducción del tamaño de las esporas expuestas con el extracto. Estas deformaciones evidentes en las esporas puede ser producto de la pérdida de integridad en la pared celular afectando la permeabilidad de la membrana y ocasionando los cambios morfológicos en *A. flavus* expuesto a la fracción antifúngica.

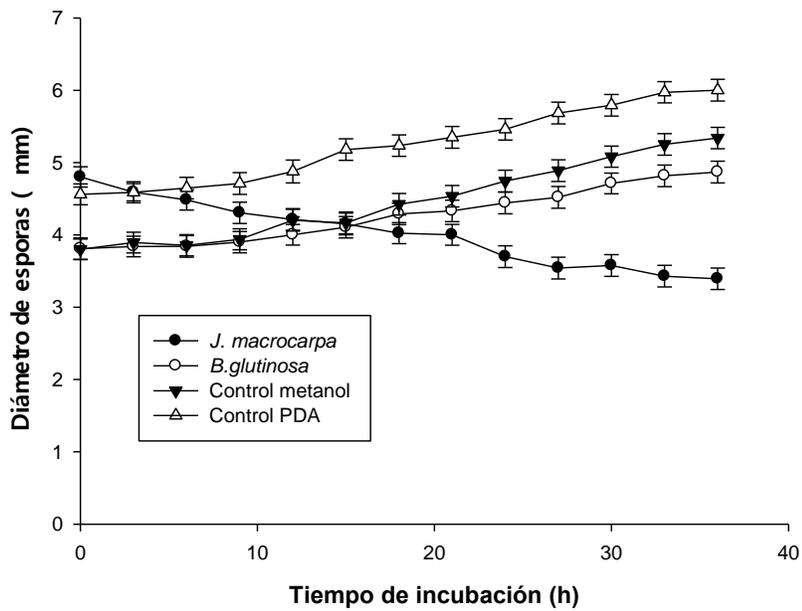


Figura 14. Diámetro de esporas de *A. flavus* en medio PDA con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa*, *B. glutinosa*, control metanol y control PDA.

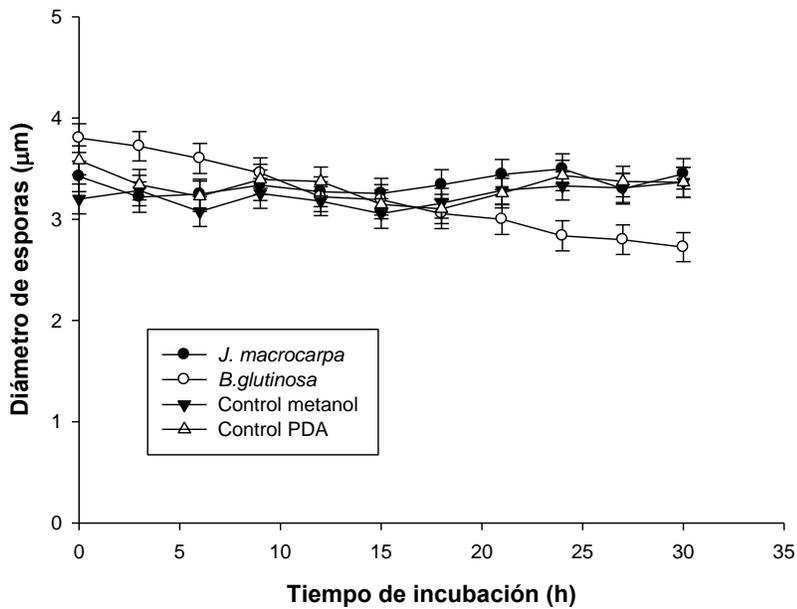


Figura 15. Diámetro de esporas de *F. verticillioides* en medio PDA con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa*, *B. glutinosa*, control metanol y control PDA.

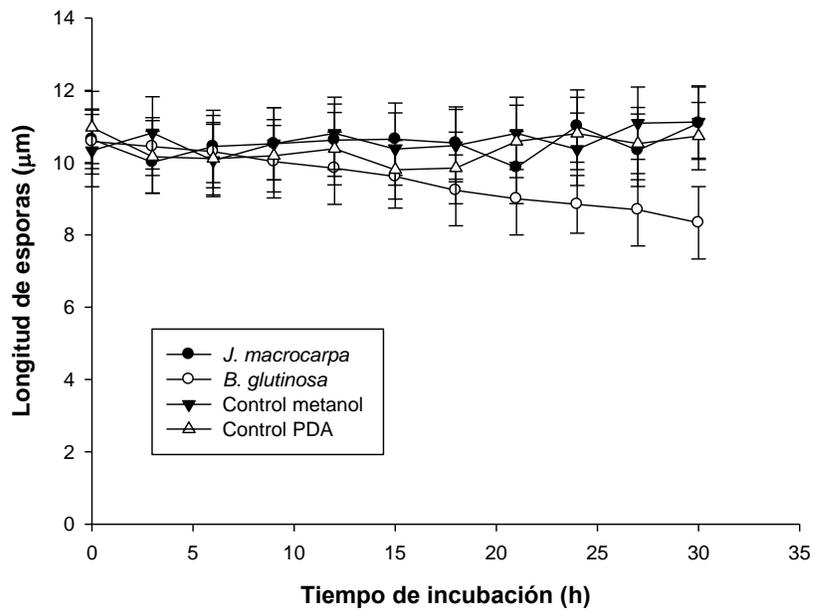


Figura 16. Longitud de esporas de *F. verticillioides* en medio PDA con fracciones antifúngicas de *J. macrocarpa*, *B. glutinosa*, control metanol y control PDA.

Longitud y Diámetro de Hifas

Ambos hongos en estudio presentaron una reducción significativa ($P < 0.05$) en el diámetro y longitud de las hifas cuando se desarrollaron en medio PDA conteniendo ambas fracciones antifúngicas, en comparación con los controles empleados (Tabla 3). Como se puede observar, la longitud de las hifas fue más afectada que el diámetro al reducirse en mayor proporción con la presencia de las dos fracciones antifúngicas, en ambos hongos, en comparación con los controles.

Tanto el diámetro como la longitud de las hifas de ambos hongos se vieron reducidas en mayor medida cuando fueron expuestas a la presencia de la fracción antifúngica de *B. glutinosa* en comparación con *J. macrocarpa*.

Tabla 3. Porcentaje de reducción del diámetro y longitud de hifas apicales de *A. flavus* y *F. verticillioides* a las 72 h de desarrollo en PDA conteniendo fracciones antifúngicas.

Fracción antifúngica	<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Fusarium verticillioides</i>	
	Diámetro	Longitud	Diámetro	Longitud
<i>Baccharis glutinosa</i>	41.7±1.2	55.6±1.3	31.1±0.8	67.2±1.0
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	20.8±1.8	43.8±2.1	18.2±1.6	41.4±2.6

Valores promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Análisis de Viabilidad de Esporas

La viabilidad de esporas se vio afectada de forma muy similar en los dos hongos por ambas plantas en comparación con los controles. El porcentaje de la viabilidad de las esporas, fue descendiendo con el transcurso del tiempo de incubación en los controles. Sin embargo, en *A. flavus*, se observó una mayor pérdida de viabilidad cuando se encontraba en presencia de las fracciones antifúngicas, y en mayor medida con la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* (Tabla 4). A partir de las 24 horas, se observó un descenso considerable de la viabilidad de la espora en cada uno de los controles, pero principalmente cuando *A. flavus* se encontraba con el extracto de *J. macrocarpa*. Al compararse éste último tratamiento con el control PDA y la fracción antifúngica de *B. glutinosa*, la viabilidad de las esporas se redujo aproximadamente un 50 % y 5 %, respectivamente. Además, a las 24 horas de haberse inoculado el medio que contenía la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*, la viabilidad era del 48% y 6 horas antes, es decir, la observación de la viabilidad a las 18 horas, era de 82% y la diferencia de viabilidad entre estos lapsos de tiempo, también es considerable. La observación final a las 96 horas dio como resultado, una viabilidad de las esporas de *A. flavus* un porcentaje de 36% cuando se encontraba con el extracto de *J. macrocarpa* y un porcentaje de 41% cuando se encontraba con el extracto de *B. glutinosa*.

Por otro lado, *Fusarium verticillioides*, también presentó un efecto negativo considerable en la viabilidad de sus esporas cuando se expuso a las fracciones antifúngicas de *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* (Tabla 5), sólo que a diferencia de *A. flavus*, *F. verticillioides* se vio afectado más por el primer extracto en mención. Como se puede apreciar en la tabla 4, la viabilidad de las esporas fue disminuyendo constantemente, sin tener una diferencia significativa entre cada una de ellas para cada uno de los controles entre cada observación.

Como se mencionó anteriormente, *B. glutinosa* presentó mayor efecto negativo que *J. macrocarpa* con un porcentaje de 29% y 36%, respectivamente, que comparados con el

porcentaje de viabilidad del control PDA a las 96 horas la diferencia de viabilidad es del 60% y 50% aproximadamente para cada uno los extractos.

Además, se puede apreciar que la viabilidad de las esporas de *F. verticillioides* se mantiene más tiempo en comparación con *A. flavus*, pero que cuando se encuentra con los extractos de *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* la viabilidad desciende aproximadamente dos veces más rápido que cuando se encuentra en el control PDA.

Tabla 4. Porcentajes de viabilidad de esporas de *A. flavus* a diferentes tiempos de incubación en los controles PDA, metanol, *B. glutinosa* y *J. macrocarpa*.

Horas	Control PDA	Control Metanol	<i>B. glutinosa</i>	<i>J. macrocarpa</i>
0	100±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
12	99±0.8	98±2.3	99±1.3	97±0.9
18	99±1.2	90±0.8	84±0.9	82±1.1
24	86±2.0	70±1.4	53±0.3	48±1.5
48	84±0.9	64±0.9	48±0.7	44±0.6
72	81±1.0	55±1.0	45±0.5	39±0.5
96	76±1.3	54±1.0	41±0.5	36±1.0

Valores promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Tabla 5. Porcentajes de viabilidad de esporas de *F. verticillioides* a diferentes tiempos de incubación en los controles PDA, metanol, *B. glutinosa* y *J. macrocarpa*.

Horas	Control PDA	Control metanol	<i>B. glutinosa</i>	<i>J. macrocarpa</i>
0	100±0.0	100±0.0	100±0.0	100±0.0
12	98±0.9	96±0.5	97±0.8	97±0.4
18	94±0.7	90±1.0	83±0.8	86±0.9
24	89±0.5	78±1.5	63±1.2	69±1.2
48	87±1.0	73±0.8	43±0.5	51±1.0
72	83±0.5	70±1.4	37±1.0	43±0.5
96	80±0.8	67±0.9	29±0.5	36±0.8

Valores promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

CONCLUSIONES

Las fracciones antifúngicas obtenidas de las plantas *B. glutinosa* y *J. macrocarpa* mostraron una alta capacidad para inhibir el crecimiento radial de los hongos filamentosos *A. flavus* y *F. verticillioides*. Sin embargo, la sensibilidad de los hongos a las diferentes fracciones antifúngicas fue distinta. El crecimiento radial de *F. verticillioides* fue más inhibido por la fracción antifúngica de *B. glutinosa*, mientras que *A. flavus* fue más inhibido por la fracción antifúngica de *J. macrocarpa*.

Coincidentemente, la germinación, las dimensiones y viabilidad de las esporas, así como las dimensiones de las hifas de ambos hongos fueron afectadas por las fracciones antifúngicas de las dos plantas, pero en diferentes grados. La fracción antifúngica de *B. glutinosa* ocasionó un mayor efecto inhibitorio sobre *F. verticillioides*, en tanto que la fracción antifúngica de *J. macrocarpa* causó un mayor porcentaje de inhibición sobre *A. flavus*.

Aparentemente, la distinta composición química de las fracciones antifúngicas y las diferencias entre los hongos estudiados, ocasionan que éstos presenten distinta susceptibilidad a ser inhibidos.

Las fracciones antifúngicas mostraron afectación desde que los hongos se encontraban como esporas hasta cuando se formaron sus hifas, lo que ocasiona la reducción del crecimiento radial.

RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios de aislamiento e identificación del o de los compuestos responsables del efecto antifúngico de las fracciones obtenidas de *B. glutinosa* y *J. macrocarpa*.

Realizar investigación sobre los mecanismos de acción involucrados en el efecto antifúngico de las fracciones en estudio.

Evaluar el efecto antifúngico de las fracciones obtenidas sobre otros microorganismos patógenos para plantas, así como para humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jawdah Y, Wardan R, Sobh H, Salameh A. 2004. Antifungal activities of selected Lebanese wild plants, against plant pathogenic fungi. *Phytopathol Medit* 43: 377-386.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic. Amsterdam.
- Alexopoulos JC, Mims CW, Blackwell M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons. New York.
- Arenas E. 2005. Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. *Rev Ciencia Trabajo* 15(1): 52-67.
- Aveñanos M. 1993. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2da ed. Madrid: Elsevier. p. 337.
- Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 26: 497-526.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2012. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7008>. Consultada: 2011, diciembre 8.
- Bourrel C, Perineau F, Michel G, Bessiere JM. 1993. Catnip (*Nepeta cataria* L.) essential oil: analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. *J. Essent. Oil Res* 5 (2): 159-167.
- Bucio-Villalobos CM, Martínez-Jaime OA, Morales-González RH. 2005. Contaminación con hongos en maíz recién cosechado en el estado de Guanajuato durante el año 2003. *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 425-431.
- Buitimea-Cantúa GV, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Gálvez-Ruiz JC, Sánchez-Maríñez RI. 2010. Aislamiento biodirigido y análisis químico de un extracto con actividad antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico). *Memorias del VII Congreso del Noroeste y III Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología* 1025-1040.
- Bushelman S, Callen J, Roth D, Cohen L. 1995. Disseminated *Fusarium solani* infection. *J Am Acad Dermatol* 32:346-351.
- Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 447-459.
- Cárdenas ONC, Pérez GS, Zavala SMA, Pérez GC, Aguierre RJR. 2003. Actividad antifúngica de cinco plantas sobre *Aspergillus flavus*. *Rev Mex Ciencias Farm* 34:124.

- Cárdenas-Ortega NC, Zavala-Sánchez MA, Aguirre-Rivera JR, Pérez-González C, Pérez-Gutiérrez S. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *J Agric Food Chem* 53: 4347–4349.
- Carrillo L. 2003. *Microbiología Agrícola*. 1ª ed. Universidad Nacional de Salta. Argentina.
- Carrillo, L. 2007. Los hongos de los alimentos forrajeros. Capítulo 6. Morfología del *Fusarium*. disponible en: www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/06htextofusarios.pdf Consultada: 2012, abril 24.
- Céspedes CL, Ávila JG, Martínez A, Serrato B, Calderón-Mugica JC, Salgado-Garciglia R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem* 54: 3521-3527.
- Constable PD, Smith GW, Rottinghaus GE, Hascheck WM. 2000. Ingestion of fumonisin B₁-containing culture materials decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicol Appl Pharmacol* 162:151-160.
- Cortez-Rocha MO, Gil-León ME, Suárez-Jiménez GM, Rosas-Burgos EC, Sánchez-Mariñez RI, Burgos-Hernández A, Lozano-Taylor J, Cinco-Moroyoqui FJ. 2005. Occurrence of fumonisin B₁ and hydrolyzed fumonisin B₁ in Mexican nixtamalized cornmeal. *Bull Environ Contam Toxicol* 74(1): 73-77.
- Cortez-Rocha MO, Ramírez-Astudillo WR, Sánchez-Mariñez RI, Rosas-Burgos EC, Wong Corral FJ, Borboa-Flores J, Castellón-Campaña LG, Tequida-Meneses M. 2003. Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull. Environ Contam Toxicol* 70: 668-673.
- Cota IE, Troncoso-Rojas R, Sotelo-Mundo R, Sánchez-Estrada A, Tiznado-Hernández ME. 2007. Chitinase and b-1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae* 112: 42-50.
- Cox PW, Paul GC, Thomas CR. 1998. Image analysis of morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology* 144:817-827.
- Davet, P., Rouxel, F. 2000. En: *Detection and isolation of soil fungi*. Science Publishers, Inc. USA. ISBN 1-57808-125-4.
- Debruyne D, Ryckelynck JP. 1993. Clinical pharmacokinetics of fluconazole. *Clin Pharmacokinet* 24: 10-27.
- Denning DW, Ribaud P, Milpied N, Caillot D, Herbrecht R, Thiel E, Haas A, Ruhnke M, Lode H. 2002. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 34: 563-571.

- Desjardins AE, Plattner RD, Nelsen TC, Leslie JF. 1995. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol* 61(1):79–86.
- Desjardins AE, Proctor RH. 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. En: *Fusarium*. APS Press. St. Paul, Minnesota 122-137 pp.
- Detroy RW, Lillehoj EB, Ciegler A. 1971. Aflatoxin and related compounds. pp. 4-178 en: *Microbial Toxins* vol. 6. Academic Press, New York.
- Diario Oficial de la Unión Europea. 2006. Nuevas recomendaciones sobre la presencia de Deoxinivalenol, Zearalenona, Ocratoxina A, y Fumonisinas en alimentos para animales. Diario Oficial de la Unión Europea L 229/7.
- Díaz de Castro FJ, Restrepo MA, Rojas W. 2007. Microbiología de las infecciones humanas. 1ª. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín Colombia.
- Diomedi P. 2004. Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Rev Chil Infect* 21(2): 89-101.
- DiSalvo AF. 1974. Antifungal properties of a plant extract I. Source and spectrum of antimicrobial activity. *Mycophatol Mycol Appl* 54(2): 215-219.
- Domínguez XA, Vázquez G, Baruah RN. 1985. Constituents from *Chrysactinia mexicana*. *J. Nat. Prod* 48 (4): 681-682.
- Domínguez XA, Pierantozzi E. 1972. 1,8-cineole and sitosterol from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry* 11: 2629-2630.
- Feng GH, Leonard TJ. 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol* 64: 2275-2277.
- Gallardo-Reyes ED, Ibarra-Moreno GM, Sánchez-Mariñez RI, Cuamea-Cruz G, Molina Gil D, Parra-Vergara NV, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisin B₁ por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Rev Mex Fitopatol* 4(1): 27-33.
- García-Sosa K, Sánchez-Medina A, Álvarez SL, Zacchino S, Veitch NC, Simá-Polanco P, Peña-Rodríguez LM. 2011. Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product Research* 25: 1185-1189.
- Garnacho-Montero JC, Ortiz-Leyba JL, Garmendia G, Jiménez F. 1998. Life-threatening adverse event after amphotericin B lipid complex treatment in a patient treated previously with amphotericin B deoxycholate. *Clin. Infect Dis* 26: 1016.

- Gelderblom WCA, Jaskiewicz K, Marasas WFO, Thiel PG, Horak MJ, Vlegaar R, Kriek NPJ. 1988. Fumonisin—novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54: 1806–1811.
- Giani C. 1997. Usual clinical features of Fingernail infection by *Fusarium oxysporum*. *Mycoses* 40: 455-459.
- Gimeno A, Martins ML. 2006. Mycotoxins and Mycotoxicosis in Animals and Humans. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Victor Mireles Communications, Mexico City (Mexico). pp. 1-127.
- Goldblatt LA. 1969. Aflatoxin. Scientific background, control and implications. Academic Press, New York, London.
- González AL. 1995. El maíz y su conservación. Ed. Trillas. Primera edición. México.
- Gqaleni N, Smith JE, Lacey J, Gettinby G. 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl Environ Microbiol* 63: 1048-1053.
- Granja CA, Alves dos Reis T, Gambale W, Corrêa B. 2007. Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia* 164:119-126.
- Gregori BS. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm* 39(2).
- Harbone JB, Greenham J, Eagles J, Wollenweber E. 1991. 6-Hydroxyflavonol glycosides from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry* 30 (3): 1044-1045.
- Harris SD. 1999. Morphogenesis is coordinates with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Microbiology* 145:2747-2756.
- Herrman JL, Walker R. 2000. Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- Hernández-Albíter RC, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S., Bravo-Luna L. 2007. Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. *Rev Mex Fitopatol* 25: 180-185.
- Hiemenz JW, Walsh J. 1996. Lipid formulations of amphotericin B: Recent progress and future directions. *Clin Infect Dis* 22: 133-44.
- Hoban, J, Zhanel G, Karlowsky A. *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Cryptococcus neoformans* isolates from blood cultures of neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1463-4.
- IARC (1987) *IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. International Agency for Research on Cancer. Lyon, Francia. Suppl. 1. pp. 82-87

- JECFA. 1998. Safety evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food Additives Series 40, Aflatoxins. In: The forty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization.
- Jobling J. 2000. Essential oils: a new idea for postharvest disease control. *Good Fruit Veg Mag* 11:50.
- Kamilla L, Mansor SM, Ramanathan S, Sasidharan I. 2009. Effects of *Clitoria ternatea* leaf extract on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Microsc Microanal* 15: 366–372.
- Kauffman CA. 1996. Role of azoles in antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 22(Suppl 2): 148-153.
- Kitic D, Jovanovic T, Ristic M, Palic R, Stojanovic G. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro. *J Essent Oil Res*10: 813-829.
- Koketsu M, Kim M, Yamamoto T. 1996. Antifungal activity against food-borne fungi of *Aspidistra eliator* Blume. *J Agric Food Chem* 44: 301-303.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* 161: 1-188.
- Lamplugh SM, Hendrickse RG, Apeageyi F, Mwanmut DD. 1988. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant women. *Br med J* 296(6627): 968.
- Larondelle FI. 2000. Storage of cereal grains and their products. Cap. 10. *Curso de micotoxinas*. UNLPam.
- Larralde CC, López LF, Viniegra GG. 1997. Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnol Bioeng* 56:287-294.
- Lino CM, Silva LJG, Pena AS. 2004. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Rev Portuguesa Ciências Veterinárias* 99: 181-192.
- López MA, Fischman O, Gambale W, Corrêa B. 2002. Fluorescent method for studying the morphogenesis and viability of dermatophyte cells. *Mycopathologia* 156:61.66.
- Marasas WFO, Kriek NP, Fincham JE, van Rensburg SJ. 1984. Primary liver cancer and esophageal basal-cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. *Int J Cancer* 39: 383-387.
- Martínez, M. 1968. *Las Plantas Medicinales de México*. 6th ed. Ediciones Botas. Mexico D.F., Mexico. 136 p.
- McGinnis M, Pasarell RL, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR, Rinaldi MG. 1998. *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med Mycol* 36: 239-42.

- Momany M, Taylor I. 2000. Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology* 146:3279-3284.
- Montes-Belmont R, Cruz-Cruz V, Martínez-Martínez G, Sandoval-García G, García-Licona R, Zilch-Domínguez S, Bravo-Luna L, Bermúdez-Torres K, Flores-Moctezuma HE, Carbajal Moreno M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores, análisis retrospectivo de investigaciones. *Rev Mex Fitopatol* 18: 125-131.
- Moore E. 1996. *Fundamentals of the fungi*. 4th ed. Prentice Hall. New Jersey.
- Moreno-Salazar SF, Robles-Zepeda RE, Johnson DE. 2008. Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, México. *Fitoterapia* 79:132-141.
- Morrison, BD. 1970. *Química Orgánica*. 2da ed. La Habana, Edición Revolucionaria. p. 29.
- Muller-Riebau F, Berger B, Yegen O. 1995. Chemical composition and ungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oil of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J Agric Food Chem* 43: 2262-2266.
- Munkvold, GP, Desjardins AE. 1997. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence?. *Plant Dis* 81(6): 556-565.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbial Rev* 7(4): 479-504.
- Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins A.E. 1992. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in Section Liseola and by some related species. *Appl Environ Microbiol* 58: 984-989.
- Olsen SJ, Swerdel MR, Blue B, Clark JM, Bonner DP. 1991. Tissue distribution of amphotericin B lipid complex in laboratory animals. *J Pharmacol* 43: 831-5.
- Ortoneda M, Guarro J, Madrid M, Caracuel Z, Rocero MI, Mayayo E, Di Prieto A. 2004. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and Immunity* 72: 1760-1766.
- PaCTeHNR, 2010. Russian Academy of Sciences. A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution
Disponibel en:
http://www.beautifulplants.ru/index_shop_item_view.php?regime=site&shop_img_id=1078. Consultada 2012, Julio 18.
- Paranagama PA, Abeysekera KHT, Abeywickrama K, Nugaliyadde L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbapogon citratus* (DC) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link isolated from stored rice. *Lett Appl Microbiol* 37: 86-90.

- Pardo GA, Duran OE. 1999. Revisión taxonómica del género *Fusarium*. Rev Inv Univ Pamplona 3: 133-146.
- Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic. 1999. Efecto tóxico de las micotoxinas en el ser humano. Bull World Health Organ 77(9): 754-766.
- Pier AC, Richard JL. 1992. Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by aspergilli. En: Bennett, J.W., Klich, M.A. (Eds.), *Aspergillus*, Biology and Industrial Applications. Butterworth-Heinemann, Boston. 233–248 pp.
- Pima Community Collage. 2012. Common desert plants around Tucson. Desert Ecology of Tucson, Az. Disponible en: http://wc.pima.edu/Bfiero/tucsonecology/plants/shrubs_sewi.htm
<http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=2528>. Consultada: 2012 junio 15.
- Plascencia–Jatomea, M., G. Viniegra, R. Olayo, M.M. Castillo–Ortega, K. Shirai, 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecules Bioscience 3: 582–586.
- Prieto-Simon B, Campas M. 2009. Immunochemical Tools for Mycotoxin Detection in Food. Monatsh Chem 140: 915-920.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Kazeroon-Shiri A, Ranjbar-Bahadori S, Mirzahoseini H, Rezaee MB. 2006. A survey on distribution of *Aspergillus* section Flavi in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. Mycopathologia 161(3):183-92.
- Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. Appl Environ Microbiol 68: 2101-2105.
- Rosas-Burgos EC, Castoreña-Lizárraga M, Cienfuegos-Valencia V, Sánchez-Maríñez RI, Moreno-Ibarra GM, Cortez-Rocha MO. 2006. Análisis de la micobiota y fumonisinas presentes en maíz recién cosechado en el estado de Sonora. Biotecnia VIII(2): 41-48.
- Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Cinco-Moroyoqui FJ, Robles-Zepeda RE, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Lares-Villa F. 2009. Antifungal activity *in vitro* of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspegillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. World J Microbiol Biotechnol 25: 2257-2261.
- Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Plascencia-Jatomea M, Cinco-Moroyoqui FJ, Robles-Zepeda RE, López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI, Lares-Villa F. 2011. The effect of *Baccharis glutinosa* extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ production. World J Microbiol Biotechnol 27:1025-1033.

- Ruiz-Bustos E, Velázquez C, Garibay-Escobar A, García Z, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, Hernández-Martínez J, Robles-Zepeda RE. 2009. Antibacterial and antifungal activities of some mexican medicinal plants. *J Med Food* 12:1398-1402.
- Rzdowski GC, Rzdowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México, 2nd ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, Mexico. 17 p.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JE, Filteborg O. 1995. Introduction to food-borne fungi. 4th ed. Wageningen, The Netherlands: Ponsen and Looyen. 322 p.
- Sánchez-Domínguez D, Bautista-Baños S, Castillo-Ocampo P. 2007 Efecto del quitosano en el desarrollo y morfología de *Alternaria alternata*. *Anales de Biología* 29: 23-32.
- Santacroce MP, Conversano MC, Casalino E, Lai O, Zizzadoro C, Centoducati G, Crescenzo G. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Rev Fish Biol Fisheries* 18: 99–130
- [SAS] Statistical Analysis System Institute. 2005. PROC user's manual, 8th version. SAS Institute, Cary, NC.
- Sharma RS, Mishra V, Singh R, Seth N, Babu CR. 2008. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants and cultivated ornamental species. *Fitoterapia* 79(7-8): 589-591.
- Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, Sydenham EW. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int* 79: 671-687.
- Suárez-Jiménez GM, Cortez-Rocha MO, Rosas-Burgos EC, Burgos-Hernández A, Plascencia-Jatomea M, Cinco-Moroyoqui FJ. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb, and fumonisin B1 production. *Rev Mex Fitopatol* 25:134–142.
- Summerell BA, Lislíe JF, Backhouse D, Branden WL, Burgues LW. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial symposium: American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, EEUU 408 pp.
- Tequida-Meneses M, Cortez-Rocha M, Rosas-Burgos EC, López-Sandoval S, Corrales Maldonado C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam de Micol* 19:84–88.
- Torres-Chávez P, Rosas-Burgos EC, Plascencia de la Parra J. 2008. Fusarium, fumonisinas y otras micotoxinas en maíz y productos nixtamalizados. En: Nixtamalización, del maíz a la

- tortilla. Rodríguez-García ME, Serna-Saldivar SO, Sánchez-Sinencio F. (ed). 1^a ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro. 291 p.
- Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. 2000. Onychomycosis caused by non dermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol* 42: 217-224.
- Urbina JM, Cortés JCG, Palma A, López SN, Zacchino SA, Enriz RD, Ribas JC, Kouznetzov VV. 2000. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-Aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds with inhibitory activities on $\beta(1-3)$ glucan and chitin synthases. *Bioorg Med Chem* 8: 691-698.
- Vargas-Arispuro I, Reyes-Baez R, Rivera-Castañeda G, Martínez-Tellez MA, Rivero-Espejel I. 2005. Antifungal lignan from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Ind Crop Prod* 22: 101-107.
- Vargas-Grijalva IA. 2010. Evaluación *in vitro* del efecto antifúngicos de extractos de plantas en hongos micotoxigénicos. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Wasan K, Kennedy M, Cassidy S, Ramaswamy R, Holtorf L, Chou JW, Pritchard P. 1998. Pharmacokinetics, distribution in serum lipoproteins and tissues, and renal toxicities of amphotericin B and amphotericin B lipid complex in a hypercholesterolemic rabbit model: Single-dose studies. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3146-52.
- Wedge DE, Smith BJ. 2006. Discovery and evaluation of natural product-based fungicides for disease control of small fruits. In: Inderjit S, Mukerji KG (eds) *Allelochemicals: biological control of plant pathogens and diseases*. Dordrecht, Holland, pp 1–14
- [WHO] World Health Organization. 2002. Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 906. Geneva, pp. 1-62.
- Wilson BJ, Maronport RR. 1971. Causative fungal agent of leucoencephalomalacia in equine animals. *Vet. Rec.* 88: 484-486.
- Wong-Beringer AR, Jacobs A, Guglielmo BJ. 1998. Lipid formulations of amphotericin B: Clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis* 27: 603-18.
- Zacchino S, Santecchia C, López S, Gattusos S, Muñoz JD, Gruañes A, Vivot E, Gruañes MC, Salinas A, Ruiz RE, Ruiz S. 1998. *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of eight selected species from the Argentine flora. *Phytomed* 5(5): 389-395.