

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Determinación del potencial tóxico de extractos de plantas silvestres propuestas para el control de *Fusarium verticillioides*

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Patricia Maribel Frias Escalante

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

APROBACIÓN

**Determinación del potencial tóxico de extractos de plantas silvestres
propuestas para el control de *Fusarium verticillioides***

Patricia Maribel Frias Escalante

Dr. Mario Onofre Cortez Rocha
Director de la tesis

Dr. Armando Burgos Hernández
Secretario

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Vocal

Dra. María Lourdes Aldana Madrid
Vocal

DERECHOS DE AUTOR:

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Jefe del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Patricia Maribel Frias Escalante

Coordinadora del Programa de Posgrado
Dra. Rosario Maribel Robles Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A Dios por prestarme una vida llena de bendiciones y por permitirme lograr una meta más en ella. Gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos que financiaron el presente trabajo, a través del proyecto No. 58249 “Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales de plantas y quitosano y de su impacto en la producción de micotoxinas *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus*”

A la Universidad de Sonora por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por permitirme realizar mis estudios de maestría. Gracias a todas las personas que forman parte de este departamento, por darme la oportunidad de conocerlos e integrarme rápidamente en su ambiente de trabajo.

Al Dr. Mario Onofre Cortez Rocha, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo. Gracias por alentarme en los momentos que yo sentía que no podía más y por la confianza que siempre tuvo en mí para llevar a cabo esta investigación.

A mi comité de tesis Dra. Maribel Plascencia Jatomea y Dr. Armando Burgos por la ayuda y asesoría brindada a lo largo de la realización de este trabajo. De igual forma a la Dra. María Lourdes Aldana por sus valiosas sugerencias y aportes.

A mi maestra la Dra. Carina Rosas por su permanente disposición y desinteresada e incondicional ayuda para la realización de la parte experimental de mi trabajo.

A Coty por estar atenta y preocupada por mí y cada uno de mis compañeros, tenga la seguridad de que en mi estancia en DIPA usted fue pieza clave en los días que más necesite de mi mamá. Gracias por aconsejarme, regañarme y sobre todo por brindarme su amistad.

A Calitos (Carlos Medina) y al muñeco (César Durand) por ayudarme desinteresadamente en la parte experimental de mi trabajo, no sé que hubiera hecho sin ustedes muchachos.

A mis compañeros por la ayuda y apoyo brindado durante este trayecto y principalmente a los amigos que surgieron de esta experiencia Yael, José Manuel, Nadia, Ivonne, Pablo, Génesis, Fers, de nuevo César y Carlos Medina, Eber, John, Patty Martínez, Edgar “Chapis” Jiménez, Dr. Torres. Gracias por hacer momentos agradables en mi estancia en la maestría y por compartir experiencias con cada uno de ustedes, espero que el hecho de terminar este proyecto no sea excusa para terminar nuestra amistad. Los quiero.

A todas aquellas personas que se preocuparon por mi bienestar y en su momento abrieron las puertas de su hogar mil gracias. Y de manera muy especial quiero agradecer a Socorro Reyes Sandoval por ser la persona que más estuvo pendiente de mí y que me apoyó para terminar los estudios de maestría, te quiero mucho.

DEDICATORIA

A Dios

Por escuchar mis oraciones y permitirme culminar este proyecto en mi vida.

A MIS PADRES

Rosa María y Francisco, les dedico este trabajo por todos los esfuerzos, apoyo y confianza que me han brindado a lo largo de mi vida. Gracias por el amor que me manifiestan, ya que es lo que me da las fuerzas todos los días para levantarme y seguir luchando como toda una guerrera.

Los amo!

A MIS HERMANOS

Cielo María y Francisco ya que son parte esencial de mi vida. Mis logros son pensando en ustedes y con todo mi cariño y amor para ustedes.

Los quiero codazonos.

A MI MAESTRA NORA

Este logro también es de usted por darme las herramientas y transmitirme la pasión de formar parte del maravilloso mundo de la ciencia. Hoy puede ver que su semilla dio fruto, mil gracias.

A TI

Por estar conmigo y ayudarme a que esto sea posible.

CONTENIDO

	Pág.
DEL AUTOR	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	6
Importancia del género <i>Fusarium</i>	6
Características morfológicas de <i>Fusarium verticillioides</i>	7
Factores ambientales para el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i>	9
Micotoxinas producidas por especies de <i>Fusarium</i>	11
Fumonisinias	11
Presencia de las fumonisinias en alimentos	14
Toxicidad de las fumonisinias	15
Control de <i>Fusarium verticillioides</i>	18
OBJETIVOS	24
HIPÓTESIS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Recolección de las muestras	26
Obtención de los extractos con actividad antifúngica	27

Preparación del inóculo	27
Evaluación y verificación de la actividad antifúngica de los extractos fraccionados de plantas	28
Crecimiento radial	28
Germinación de esporas	29
Estudio de toxicidad	30
Ensayo de Ames	31
Análisis de datos	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
Crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	35
Germinación de esporas de <i>Fusarium verticillioides</i>	39
Ensayo de toxicidad aguda	44
Ensayo de mutagenicidad	49
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Temperatura y actividad de agua (A_w) mínima, máxima y óptima para el crecimiento de hongos toxicogénicos	10
2	Velocidad de crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> en medio PDA adicionado con extractos fraccionados (5 mg mL^{-1})	38
3	Velocidad de germinación de esporas de <i>Fusarium verticillioides</i> en medio PDA adicionados con extractos fraccionados (5 mg mL^{-1})	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Características microscópicas de <i>Fusarium verticillioides</i>	8
2	Estructura química y peso molecular de las fumonisinas B ₁ , B ₂ y B ₃	13
3	Estructura química de la esfingosina, esfinganina y fumonisinas serie B	16
4	Diagrama del procedimiento de Ames empleado con los extractos de las plantas <i>Jacquinia macrocarpa</i> (FB <i>Jm</i>), <i>Krameria erecta</i> (FAe <i>Ke</i>) y <i>Baccharis glutinosa</i> (FAe <i>Bg</i>)	33
5	Crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i> en medios adicionados con extractos fraccionados de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (FB <i>Jm</i>), <i>Krameria erecta</i> (FAe <i>Ke</i>) y <i>Baccharis glutinosa</i> (FAe <i>Bg</i>) a una concentración de 5 mg mL ⁻¹	36
6	Germinación de esporas de <i>Fusarium verticillioides</i> en medios adicionados con extractos fraccionados de <i>Jacquinia macrocarpa</i> (FB <i>Jm</i>), <i>Krameria erecta</i> (FAe <i>Ke</i>) y <i>Baccharis glutinosa</i> (FAe <i>Bg</i>) a una concentración de 5 mg mL ⁻¹	41
7	Mortalidad de <i>Artemia salina</i> en agua de mar estéril (control negativo de toxicidad aguda)	45
8	Mortalidad de <i>Artemia salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de azida de sodio (control positivo de toxicidad aguda)	45
9	Mortalidad de <i>Artemia salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i> FB	46
10	Mortalidad de <i>Artemia salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Krameria erecta</i> FAe	46
11	Mortalidad de <i>Artemia salina</i> expuesta a diferentes concentraciones de extracto metanólico de <i>Baccharis glutinosa</i> FAe	47

12	Revertantes inducidas por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 y TA 100 con azida de sodio	51
13	Revertantes inducidas por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 y TA 100 con aflatoxina B ₁	51
14	Revertantes por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 expuestas al extracto de <i>Bg</i> FAe con y sin enzima S9	52
15	Revertantes por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 expuestas al extracto de <i>Bg</i> FAe con y sin enzima S9	52
16	Revertantes por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 expuestas al extracto de <i>Jm</i> FB con y sin enzima S9	53
17	Revertantes por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 expuestas al extracto de <i>Jm</i> FB con y sin enzima S9	53
18	Revertantes por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 expuestas al extracto de <i>Ke</i> FAe con y sin enzima S9	54
19	Revertantes por placa de <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100 expuestas al extracto de <i>Ke</i> FAe con y sin enzima S9	54

RESUMEN

Se ha reportado que a partir de extractos de plantas obtenidos de diferentes partes del mundo, en especial las endémicas de un lugar determinado presentan actividad antifúngica o fungistática sobre diferentes especies de hongos, esto representa una alternativa ante el uso de productos fungicidas químicos para controlar su crecimiento y por ende evitar sus micotoxinas. Sin embargo, para garantizar su uso seguro es necesario realizar pruebas que determinen su potencial tóxico para poder ser aplicado como una alternativa segura o inocua. El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial tóxico de extractos metanólicos de plantas con actividad antifúngica que han sido reportados con actividad para controlar el crecimiento de *Fusarium verticillioides* ATCC 52539. Para ello se obtuvieron extractos metanólicos de las plantas *Jacquinia macrocarpa*, *Baccharis glutinosa* y de *Krameria erecta*. Posteriormente se fraccionó cada uno de ellos mediante separación secuencial con hexano, acetato de etilo y *n*-butanol.

Se evaluó y verificó el efecto de las fracciones en butanol de *J. macrocarpa* y acetato de etilo de *B. glutinosa* y *Krameria erecta* de los extractos metanólicos en el crecimiento radial y germinación de esporas de *F. verticillioides*. Se observó que el extracto de *J. macrocarpa* fue el que presentó el mayor porcentaje de inhibición radial con 95 %, seguido por el extracto de *B. glutinosa* que causó 72 % de inhibición. Así mismo, con el extracto de *K. erecta* se observó que su capacidad para inhibir el crecimiento radial del hongo fue de 85 %. Por otra parte, en la germinación de esporas de *F. verticillioides* se observó que el extracto

fracción acetato de etilo de *B. glutinosa* (FAe Bg) inhibió en 100 %, seguido del extracto fracción acetato de etilo de *K. erecta* (FAe Ke) con el 95 % y por último el extracto fracción n-butanol de *J. macrocarpa* (FB Jm) con 19 %.

Se evaluó en el crustáceo *Artemia salina* la toxicidad aguda de las fracciones obtenidas a partir de los extractos metanólicos. Se observó que los tres extractos son tóxicos para *Artemia salina*, ya que la sobrevivencia de los nauplios control fue del 83 % al culminar el estudio. Estos resultados sugieren que la mortalidad de los nauplios podría deberse a la presencia de compuestos activos en cada uno de los extractos metanólicos fraccionados, sin embargo mayores estudios son necesarios para determinarlo.

Se evaluó el potencial mutagénico de las fracciones de cada uno de los extractos y ninguno presentó efecto mutagénico con y sin activación metabólica en presencia de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100.

Lo anterior indica que los extractos metanólicos fraccionados de plantas en estudio, a la concentración de 5 mg mL⁻¹, contienen compuestos activos que afectan el crecimiento y desarrollo del hongo. Los cuales son tóxicos para *Artemia salina* pero no mutagénicos para *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos son la principal fuente de biomoléculas para el hombre y los animales, dentro de estos; los cereales son considerados como la principal fuente de nutrientes a nivel mundial y uno de los principales problemas en la producción y su conservación han sido los hongos, ya que están bien adaptados para utilizar una gran variedad de sustratos (Davicino y col., 2007).

Los hongos que frecuentemente colonizan a los cereales son principalmente: *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, entre otros (Del Rio y col., 2007).

El maíz (*Zea mays L.*) es un cereal de gran importancia para México y otros países, debido a que constituye la base alimenticia como grano y como los productos que se obtienen a partir de él. Su producción se ve afectada por factores adversos de naturaleza biótica (enfermedades, plagas, malezas, entre otras) y abióticas (sequías, salinidad y alta temperatura), convirtiéndose en sustrato ideal para el crecimiento de hongos fitopatógenos que principalmente invaden el grano desde que se encuentra en el campo o durante sus fases de desarrollo. Donde destacan comúnmente los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, organismos que causan efectos nocivos en el cultivo y en los consumidores de granos y sus productos (Hernández-Delgado y col., 2007). *Fusarium* es un habitante común del suelo y el más diverso, ya que tiene más de 30 especies (Montiel-González y col., 2005), siendo unos de los principales

impedimentos para la siembra continua de los campos, limitando la siembra de cultivos de importancia alimenticia y económica como lo son los cereales.

Las especies del género *Fusarium* de mayor interés en el grano de maíz (*Zea mays* L.) son *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Gallardo-Reyes y col., 2006). Siendo *F. verticillioides* el principal agente patógeno causante de la podredumbre de la mazorca de maíz. Así mismo se caracteriza por producir diversos tipos de micotoxinas, particularmente las fumonisinas que tienen efectos tóxicos cuando son consumidas por humanos y animales (Peiretti-Uzal y col., 2007). La producción de fumonisinas en maíz, se ve afectada por diversos factores ambientales, como la humedad, temperatura, los periodos de sequía, la cantidad de precipitación durante sus estadios en campo y la cosecha (Gallardo-Reyes y col., 2006). Se han descrito más de 15 diferentes tipos de fumonisinas, sin embargo; la fumonisina B1 y fumonisina B2 han sido reportadas en niveles significativos de ocurrencia natural en maíz y productos a partir de maíz.

En los últimos años la presencia de hongos toxicogénicos ha sido comúnmente reportada en productos alimenticios y uno de los más frecuentes son los pertenecientes al género *Fusarium*, por ello es necesario que los alimentos utilizados y consumidos por el hombre y animales sean inocuos. Para lograr esto se han establecido una serie de métodos de control que pudiesen minimizar el desarrollo de estos organismos, en especial los que producen algún tipo de micotoxinas que afecte a la salud de quienes los consumen. La aplicación de fungicidas sintéticos como fuente de control, es un método ampliamente utilizado para reducir el crecimiento de

hongos fitopatógenos y a través de ello minimizar la incidencia de daños causados por su presencia y a la vez disminuir la contaminación de granos por las micotoxinas que producen (Ramírez-Chávez y col., 2000). Sin embargo, los organismos han desarrollado resistencia a los compuestos químicos utilizados comúnmente para su prevención o control, por lo que se ha aumentado la contaminación al ambiente, debido a que los compuestos no se degradan en periodos cortos y por consecuencia causan severos daños a la salud (Tequida-Meneses y col., 2002), además de que su control es difícil de lograr, presenta un costo elevado. Esta situación ha llevado a la búsqueda de fungicidas de menor impacto ambiental y menor costo, pero que tengan una efectividad mejor o igual, ya que esto lograría una eficiente producción agrícola sin deteriorar el ambiente y la seguridad de que el alimento sería inocuo para su consumo (López-Benítez y col., 2005).

ANTECEDENTES

Importancia del género *Fusarium*

Los hongos fitopatógenos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y ocasionan problemas serios, debido a que muchas especies, además de causar pérdidas económicas, producen diversos tipos de micotoxinas de gran importancia en salud pública pues causan enfermedades en humanos y animales.

El género *Fusarium* es un habitante común del suelo y el más diverso, ya que cuenta con más de 30 especies (Montiel-González y col., 2005), y es uno de los principales impedimentos para la siembra continua de los campos, limitando la siembra de cultivos de importancia alimenticia y económica. Dentro de este género las especies de mayor interés en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) son *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* (Gallardo-Reyes y col., 2006), siendo *F. verticilloides* el principal agente patógeno causante de la podredumbre de la mazorca. Así mismo, se caracteriza por producir diversos tipos de micotoxinas, particularmente las fumonisinas, que tienen efectos tóxicos cuando son consumidas por humanos y los animales (Peiretti-Uzal y col., 2007). Este hongo se encuentra dentro de las especies que pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi* perteneciente a la sección Liseola y Elegans (López y col., 2004), es endémica del maíz y en la planta causa pudrición del tallo, raíz y mazorca (Gallardo-Reyes y col., 2006). Además tiene la capacidad de penetrar entrando sistémicamente en la semilla a través de heridas o infecciones en la planta (Leslie y Summerell, 2006).

Características morfológicas de *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides presenta la capacidad de infectar los tejidos vegetativos y reproductivos sin desarrollar los síntomas, donde la presencia de insectos y el estrés fisiológico al que puede estar expuesto el grano facilitan el desarrollo de la enfermedad. Sus macronidias varían desde forma de hoz a casi recto con el lado dorsal y ventral casi paralelo, con paredes delgadas y célula basal con forma de pie. Presenta de 3 a 5 septos, con micronidios abundantes, unicelulares o de forma oval a claviforme con una base aplanada. Se forman apicalmente en cadenas largas sobre monofiálides, y no presenta clamidiosporas (Desjardins y col., 2006) (Figura 1). Se ha sugerido que los conidios son críticos en el proceso de infección de este hongo y pueden ser necesarios para la colonización sistémica de la planta de maíz. Las cadenas de conidios son distribuidas fácilmente por el viento, la lluvia y otros vectores de dispersión como los insectos, facilitando así una eficiente dispersión de sus micronidias en los campos de cultivo de maíz (Glenn y col., 2004).

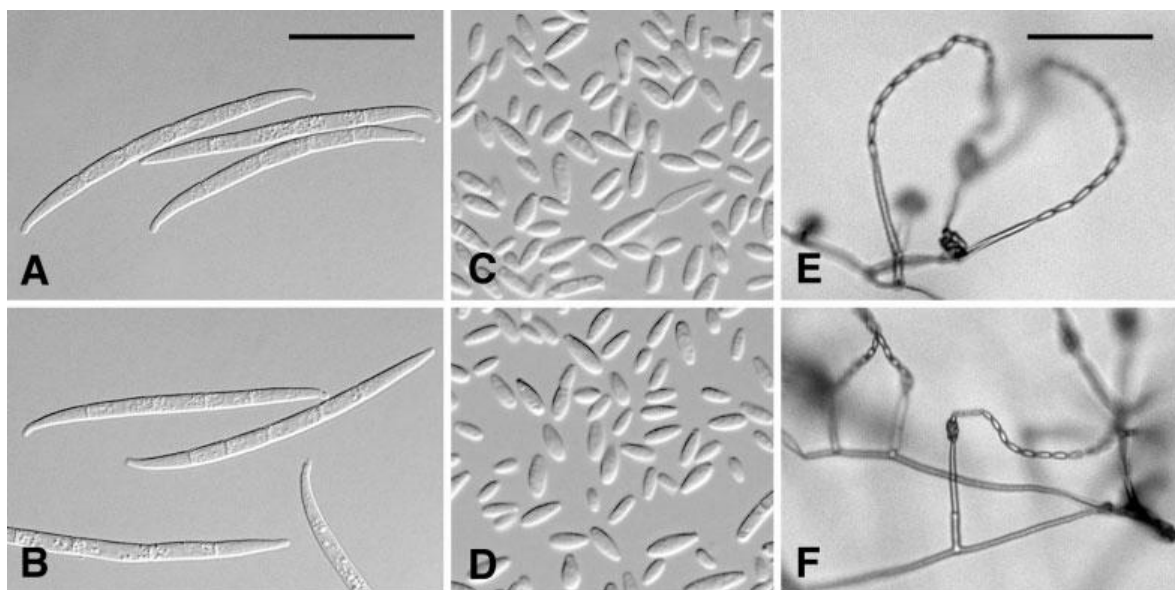


Figura 1. Características microscópicas de *Fusarium verticillioides*.

A – B: Macroconidia; C – D: Microconidia; E – F: Microconidia *in situ* sobre agar hoja de clavel (CLA).

A – D, barra de la escala = 25 µm; E – F, barra de la escala = 50 µm.

Fuente: Leslie y Summerell (2006).

Factores ambientales para el crecimiento de *Fusarium verticillioides*

Este hongo se encuentra como contaminante natural en maíz y está ampliamente distribuido a nivel mundial (Marasas y col., 1984). Para su desarrollo necesita alto contenido de humedad, actividad de agua (A_w) mínima de 0.87 y temperatura óptima de 25°C (Tabla 1), mientras que la mínima es de 5°C y la máxima de 42°C. La germinación de esporas se puede dar en un amplio rango de temperatura que va de los 25 a 37°C, requiriéndose una A_w entre 0.96 - 0.98 (Reyneri, 2006). *F. verticillioides* ataca todos los estadios de crecimiento de la planta de maíz y a diferentes partes de la misma, induciendo enfermedades de pre- y post-cosecha que causan reducción de rendimiento y afectan la calidad de la semilla (Peiretti-Uzal y col., 2007). El hongo aparece presentando color salmón pálido en el pedicelo de la punta de los granos, seguido de un crecimiento de moho polvoso de color rosa en los granos infectados, el cual está compuesto por numerosas esporas (Mendoza-Elos y col., 2006). Cuando el hongo es cultivado en agar papa dextrosa (PDA), los cultivos inicialmente presentan micelio blanco, pero con el tiempo pueden desarrollar un color violeta, sin embargo, el color que puede presentar en agar varía desde la falta de pigmentación o naranja grisáceo a gris violeta o violeta oscuro (Desjardins y col., 2006).

Tabla 1. Temperatura y actividad de agua (A_w) mínima, máxima y óptima para el crecimiento de hongos toxicogénicos.

Especie	Temperatura			A_w	
	Mínima (°C)	Máxima (°C)	Óptima (°C)	Mínima	Óptima
<i>Aspergillus flavus</i>	6	46	36-38	0.78	0.95
<i>Aspergillus parasiticus</i>	6	46	36-38	0.78	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	12	37	36-38	0.77	
<i>Penicillium verrucosum</i>	-2	36	23	0.81	
<i>Fusarium culmorum</i>	2	37	25	0.78	0.99
<i>Fusarium graminearum</i>	2	40	24 - 26	0.89	0.98 - 0.99
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	-2	35	12-15	0.89	
<i>Fusarium moniliforme</i>	5	42	25	0.87	
<i>Fusarium proliferatum</i>	5	42	25		

Fuente modificada: Reyneri (2006).

Micotoxinas producidas por especies de *Fusarium*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos y tienen estructuras químicas muy diversas, todas son compuestos orgánicos de masa molecular relativamente baja (Peraica y col., 1999). Se ha reportado que el género *Fusarium* produce varios tipos de micotoxinas y metabolitos biológicamente activos, incluyendo el ácido fusárico, fusarinas, naftoquinonas (Desjardins y col., 2006) y particularmente las fumonisinas, siendo estas de gran importancia, ya que cuando son consumidas producen efectos tóxicos (Peiretti-Uzal y col., 2007). La producción de fumonisinas en maíz se ve afectada por diversos factores ambientales como la humedad, temperatura, los periodos de sequía, la cantidad de precipitación (Gallardo-Reyes y col., 2006).

Fumonisin

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas producidas por *Fusarium* que fueron caracterizadas por Gelderblom y col. (1988), y que han demostrado estar presentes en maíz (cuando está en la planta hay putrefacción del tallo, raíz y mazorca) y sus derivados, causando una serie de enfermedades en equinos y cerdos y, se les ha relacionado con el cáncer esofágico en humanos (Rheeder y col., 1992; Marasas, 1995). Son producidas principalmente por las especies *Fusarium proliferatum*, *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg antes *Fusarium moniliforme* Sheldon),

siendo las especies que más comúnmente son aisladas del maíz y otros cereales (Del Rio y col., 2007).

Las fumonisinas son metabolitos secundarios y comprenden un grupo de moléculas estructuralmente relacionadas entre sí. Se caracterizan por tener dos cadenas laterales de ácido tricarbálico esterificadas a una cadena aminopentol con uno o más grupos hidroxilos (Gelderblom y col., 1988) (Figura 2).

Se han descrito más de 15 diferentes tipos de fumonisinas, sin embargo; la fumonisina B₁ (FB₁) y la fumonisina B₂ (FB₂) se reportan en niveles significativos en maíz y productos a base de él.

Gelderblom y col. (1988), describen a las fumonisinas como sólidos amorfos. No absorben en la luz, ni en el intervalo ultravioleta, ni en el visible y además no fluorescen (Scott, 1993). La FB₁ presenta un punto de fusión de 103 a 105°C, su espectro infrarrojo incluye absorciones a 3450, 2934, 1729 y 1632 cm⁻¹ (Vesonder y col., 1992). Son compuestos altamente polares, solubles en agua y en mezclas de acetonitrilo: agua y metanol, pero nada solubles en solventes apolares.

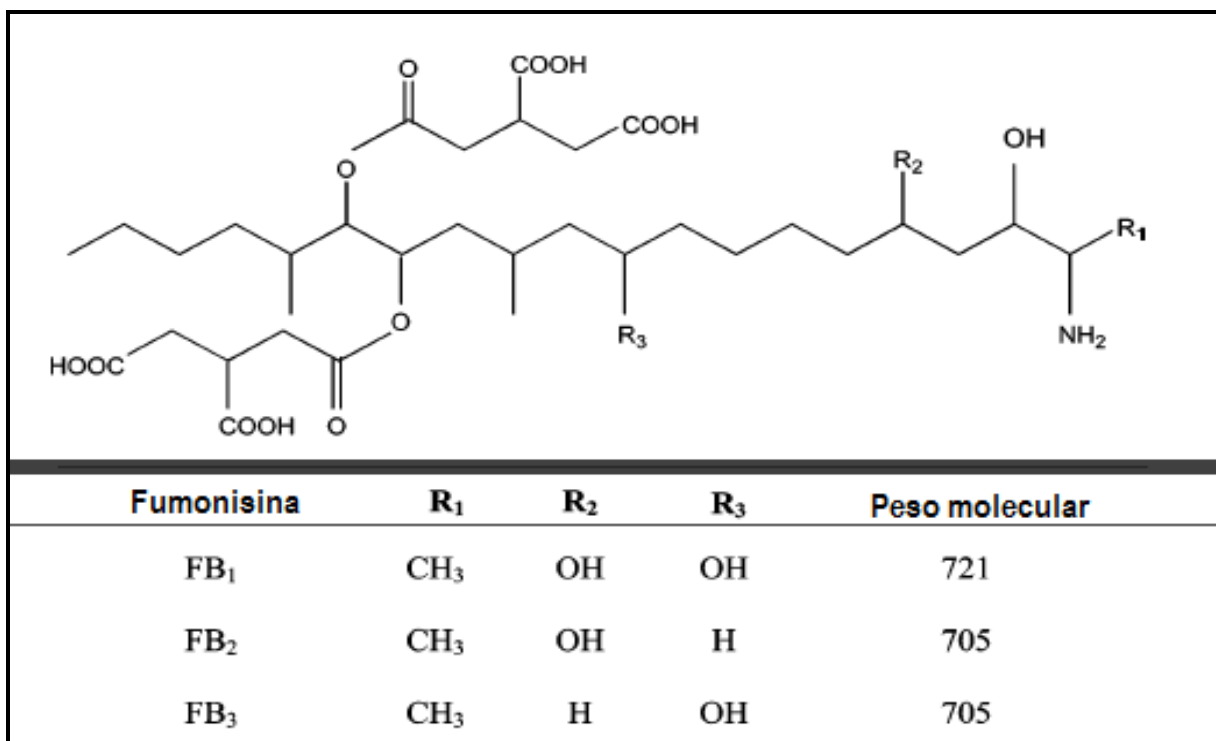


Figura 2. Estructura química y peso molecular de las fumonisinas B₁, B₂ y B₃.

Fuente: Sewram y col. (2005).

Presencia de las fumonisinas en alimentos

La distribución de *F. verticilloides* se ha reportado a nivel mundial, por lo tanto, la presencia de fumonisinas en maíz es de magnitud parecida y pueden ser encontradas en casi cualquier producto de origen vegetal y sus derivados. No han sido detectadas en productos de origen animal, excepto en la leche en polvo donde se han reportado bajos niveles (Gelderblom y col., 1993).

Sydenham y col., (1990) reportaron la presencia de fumonisina B1 en maíz mohoso ($44-83 \mu\text{g g}^{-1}$) de manera natural, que provenía de una cosecha utilizada para autoconsumo en África del Sur. A partir de esa fecha, se inició la búsqueda de la presencia de fumonisinas en maíz, productos a base de él así como en otros alimentos en el mundo (Marasas, 1996).

En México se han realizado estudios que confirman que las especies de hongos predominantes en maíz cosechado son de *Fusarium*, al igual que su capacidad productora de fumonisinas. El primer reporte de la presencia de fumonisinas en grano de maíz cosechado en Sonora se realizó en el 2003 por Cortez-Rocha y col., siendo la FB₁ la que estuvo presente en niveles superiores a los considerados seguros para usarse en alimento para caballos de acuerdo con las recomendaciones de la FDA. Gallardo-Reyes y col. (2006), realizaron un estudio de la capacidad de producción de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* aisladas de grano de maíz cosechado en Sonora, reportando la producción mínima de fumonisina como superior a los $500 \mu\text{g g}^{-1}$, siendo las cepas de muestras provenientes del Valle del

Mayo las que presentaron el nivel más alto, seguida de las cepas de muestras aisladas de maíz de la región del Río Sonora, representando un riesgo potencial por ser el maíz un producto de importancia en la alimentación de humanos y animales. Este estudio concordó con los resultados reportados por Sánchez-Rangel y col. (2005), en cuanto a la capacidad de producción de fumonisinas, ya que ellos también encontraron que las cepas aisladas de Sonora son altamente productoras de esta micotoxina en comparación con las de otras regiones del país.

Toxicidad de las fumonisinas

Las fumonisinas han sido relacionadas con una serie de trastornos en el sistema nervioso de equinos causando leucoencefalomalacia equina (ELEM), también como agentes mutagénicos y teratogénicos en ratas, cerdos, conejos, monos, entre otros (García y Heredia, 2006). En humanos se han correlacionado con una alta incidencia de cáncer esofágico en los habitantes del área de Transkei en África del Sur y en Linxian, una provincia China (Cortez-Rocha y col., 2012).

El mecanismo de acción tóxico está involucrado con la inhibición de la enzima ceramida sintetasa, ocasionando un acumulamiento de bases esfingoides y una disminución de los esfingolípidos complejos, (Duarte y Villamil, 2006); lo cual es atribuida la similitud entre las estructuras de las fumonisinas y las bases de cadena larga como esfinganina y esfingosina (Figura 3) (Merril y col., 1993).

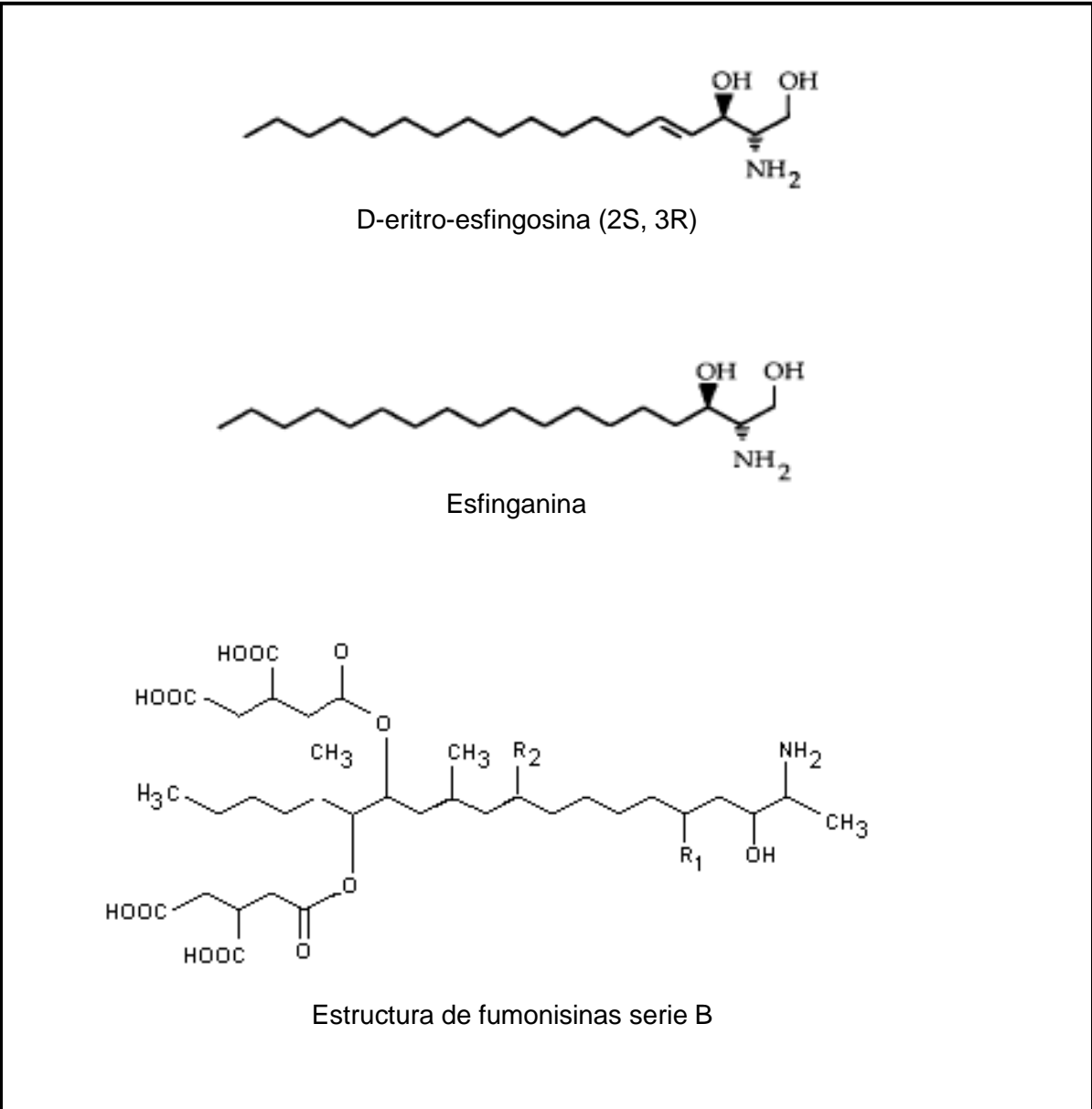


Figura 3. Estructura química de la esfingosina, esfinganina y fumonisinas serie B.

Fuente: Cortez-Rocha y col. (2012).

Debido a la similitud estructural, se presenta una inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos al interferir la fumonisina con la enzima esfinganina N-aciltransferasa, la cual tiene una función clave en la síntesis de *novo* de los esfingolípidos. La N-acetiltransferasa cataliza a conversión de esfinganina a dihidroceramida, y enseguida es convertida a ceramida, la cual se encarga de producir complejos con esfingolípidos como glicoesfingolípidos y esfingomielina. Por otra parte, la esfingosina es producida por la conversión de ceramida y otros esfingolípidos complejos (Landeros y col., 2005; Marasas y col., 2000; Merrill y col., 1996), por lo que si hay acumulación de esfinganina, como consecuencia se lleva a cabo el bloqueo de la síntesis de ceramidas y esfingolípidos complejos.

Wang y col. (1991), propusieron que lo comentado anteriormente puede ser una de las causas de la toxicidad de las fumonisinas (particularmente la FB1, ya que puede tener una presencia natural del 70 % en maíz), ya que los esfingolípidos regulan el crecimiento, la diferenciación y la transformación de las células.

Estudios *in vivo* han demostrado que el consumo de alimento contaminado con fumonisinas causa una serie de desórdenes en el sistema nervioso de equinos, edema pulmonar en porcinos y cáncer de hígado en ratas. El consumo de maíz contaminado con fumonisinas y los efectos en salud humana aún son confusos, sin embargo; se ha asociado con la incidencia de cáncer de esófago y otras enfermedades. Además, se ha sugerido que son posiblemente un factor de riesgo para los defectos de nacimiento ocasionando defectos en el tubo nervioso neural (NTD), (Voss y col., 2006).

Se han establecido límites para consumir alimentos contaminados por fumonisinas, donde en productos de maíz molido el límite es de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ y para maíz consumido por caballos es de $5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Bush y col., 2004; Figueroa-Gómez y col., 2007).

Control de *Fusarium verticillioides*

Es menester que los alimentos a base de maíz utilizados y consumidos por el hombre y animales sean inocuos. Para ello, se han establecido una serie de métodos de control que tendientes a minimizar el desarrollo de estos organismos, en especial los que producen algún tipo de micotoxinas que afecte a la salud de los consumidores.

El control de organismos fitopatógenos, es difícil de lograr y representa un costo elevado (López-Benítez y col., 2005), ya que los hongos han desarrollado resistencia a los compuestos químicos utilizados comúnmente para su control. Así mismo, el uso de estos compuestos ha incrementado la contaminación del ambiente, ya que algunos de ellos no se degradan en corto tiempo, y por consecuencia causan severos daños a la salud tanto de las personas encargadas de aplicar los productos como de los consumidores (Tequida-Meneses y col., 2002).

Debido a la necesidad de desarrollar nuevos fungicidas se han explorado diversos recursos naturales, tanto de origen vegetal, como de origen animal.

Dentro de los compuestos de origen animal se encuentra el quitosano, que se obtiene de la quitina extraída de desechos de productos marinos como son el camarón, jaiba y la pluma de calamar. Se ha demostrado que presenta acción protectora y antifúngica en las plantas, induciendo un mecanismo de defensa contra la infección y ataque de parásitos, incluso a concentraciones muy bajas (Srinivasa y Tharanathan, 2007). Entre los diversos estudios realizados con quitosano para controlar la presencia de hongos del género *Fusarium*, se ha reportado que aún cuando se utilizan concentraciones menores a 1 g L^{-1} hay inhibición de crecimiento (Benhamou y col., 1994). Quintana-Obregón y col., (2010) realizaron un estudio *in vitro* de la inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* cultivado en agar papa dextrosa (PDA) a diferentes concentraciones de quitosano de baja, media y alta viscosidad. Sus resultados mostraron que el quitosano de baja viscosidad presentó la mayor inhibición del crecimiento radial. Esto ha sido atribuido a que cuando se utilizan altas concentraciones de quitosano, se inducen cambios morfológicos en el hongo, los cuales producen enzimas de defensa reduciendo la capacidad de inhibir y se le atribuye únicamente cierta propiedad fungistática al hongo (El Ghaouth y col., 1992). De igual manera, las variaciones observadas en el crecimiento radial con respecto a la concentración y tipo de quitosano, pueden ser atribuidas a la etapa de adaptación del hongo (Romanazzi y col., 2006). Una de las alternativas de control más prometedoras es el uso de moléculas biológicamente activas provenientes de las plantas (Bernal-Alcocer y col., 2005). Estas poseen compuestos con diferentes estructuras y mecanismos de acción (Thobunluepop y col., 2007), dentro de los

cuales se encuentran los flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, entre otros (Davicino y col., 2007). La diversidad de plantas a nivel mundial es amplia, por lo tanto, la diversidad de los compuestos antifúngicos tiene una magnitud similar y solo se empieza a conocer una pequeña parte de ellos. La formulación de productos vegetales utilizados y evaluados ha sido en forma de extractos acuosos, alcohólicos y hexánicos, como polvos y en aceites.

La actividad antifúngica de los aceites esenciales se ha estudiado desde hace años y se ha propuesto que los compuestos oxigenados que contienen son sustancias que presentan mayor oportunidad de interactuar con las células. López y col. (2004), caracterizaron la actividad antifúngica *in vitro* de aceites esenciales procedentes de plantas aromáticas para controlar la producción de FB1 de una cepa toxicogénica de *F. verticillioides* en grano de maíz. Ellos observaron que los compuestos presentes en el aceite esencial de *Origanum vulgare* disminuyeron el nivel de producción de fumonisinas, mientras que el aceite esencial de *A. triphylla* estimuló la producción de fumonisinas con respecto a los controles (maíces inoculados con *F. verticillioides* sin aceites esenciales).

Existen diversos estudios donde se reporta que los extractos de plantas tienen efectos sobre el desarrollo y crecimiento de hongos fitopatógenos. Para el control de *Fusarium verticillioides* se ha reportado que el extracto de *Tagetes lucida* obtenido con cloroformo/metanol causó 89.0 % de inhibición del crecimiento radial, siendo comparado con el antifúngico sintético cetoconazol (Céspedes y col., 2006).

En relación a esta problemática se han realizado estudios para evaluar la eficacia de plantas de algunas regiones de Sonora, donde se ha encontrado que *Larrea tridentata*, *Baccharis glutinosa*, *Krameria erecta* y *Jacquinia macrocarpa* entre otras, presentan actividad antifúngica sobre *F. verticillioides* y otras especies de hongos fitopatógenos (*A. flavus*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*) (Tequida-Meneses y col., 2002; Vargas-Arispuro y col., 2005; Suárez-Jiménez y col., 2007; Rosas-Burgos y col., 2009; 2010). Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios que evalúen el potencial tóxico de las mismas, y por lo tanto la inocuidad de dichos compuestos para ser utilizados en el control de hongos filamentosos de importancia en alimentos.

Se han reportado estudios de plantas con propiedades curativas utilizadas en la medicina tradicional de algunos pueblos indígenas, mediante pruebas de laboratorio eficaces y poco costosas (García-Mateos y col., 2000; Remigio-Montero y col., 2001; Piloto-Ferrer y col., 2009), utilizando organismos comunes y fáciles de manejar. Dichos estudios son concluyentes en cuanto a la necesidad de realizar evaluaciones genotóxicas, que no se han hecho, siendo requisito de carácter obligatorio, y no existen criterios coincidentes para clasificarlos como genotóxicos o como no genotóxicos (Remigio y col., 2001).

Los estudios en microorganismos y animales son el eslabón más importante en la cadena de evaluaciones toxicológicas de cualquier compuesto químico nuevo, antes de ser administrado o utilizado como alimento, fármaco, agroquímico, entre otros (Martínez y col., 2010). Además, las pruebas con animales constituyen el principal

recurso para conocer experimentalmente la toxicidad de los compuestos químicos (Gutiérrez y col., 2007).

Los laboratorios han desarrollado un gran número de ensayos de toxicidad relacionados con el estudio de productos naturales en los últimos años, en los que la respuesta ha sido medida en invertebrados. Estas pruebas tienen las ventajas de ser económicas, reproducibles, fáciles de realizar y no tienen gran impacto en el ambiente. En este contexto, un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizado lo ocupa el ensayo de *Artemia salina*, que ha sido utilizado en la mayoría de las pruebas requeridas por las instancias reguladoras para evaluar riesgos ambientales de plaguicidas, productos químicos y contaminantes (Pino y col., 2010). Por otra parte, las pruebas del potencial mutagénico se consideran un paso esencial en la evaluación de la inocuidad de los productos químicos. En el contexto de los alimentos, este enfoque ha demostrado ser adecuado para mantener la seguridad de los productos químicos desarrollados recientemente tales como, aditivos y plaguicidas, entre otros (Mazzatorta y col., 2007).

El estudio de mutagénesis, carcinogénesis y la búsqueda de compuestos químicos con propiedades genotóxicas está bien establecido y una de las pruebas más utilizadas es la recomendada por Maron y Ames (1983). El ensayo de Ames es utilizado para estudiar una gran variedad de sustancias ambientales y es ampliamente aceptado para identificar sustancias que pueden producir daño genético que conduce a mutaciones del gen (Mustafayeva y col., 2010). El principio de esta prueba es exponer bacterias auxótrofas que necesitan de ciertos aminoácidos para

crecer, los cuales son proporcionados en el medio de cultivo junto con el compuesto a evaluar; si el compuesto ocasiona una mutación, las bacterias pasan a ser protótrofas (que pueden sintetizar sus propios aminoácidos). Esto es observado durante el crecimiento de las colonias bacterianas en un medio que contiene la mínima cantidad de los aminoácidos necesarios para el desarrollo de dichas bacterias, las que han sido modificadas genéticamente.

Ante la necesidad actual de controlar la presencia de hongos toxicogénicos como *F. verticillioides* y la producción de fumonisinas en granos de importancia alimenticia como lo es el maíz, principalmente en México y algunos otros países y conociendo de los problemas que ha ocasionado el uso excesivo de fungicidas sintéticos como el incremento de la contaminación ambiental, desarrollo de resistencia por medio de los organismos a controlar, presencia de residuos en los alimentos y graves daños en la salud humana, se conduce a la búsqueda de alternativas naturales para su control. El uso de extractos de plantas endémicas del estado de Sonora a nivel laboratorio, ha demostrado que los extractos metanólicos y sus fracciones tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo. Sin embargo, la obtención de compuestos provenientes de las plantas representa un reto de grandes proporciones ya que para poder ser aplicado en el maíz como una alternativa segura o inocua se requiere de estudios que demuestren dicha inocuidad. Por lo anterior surge la necesidad de garantizar el uso seguro de cada uno de los extractos metanólicos particionados mediante pruebas que determinen su potencial tóxico.

OBJETIVOS

General

Determinar el potencial tóxico de extractos metanólicos provenientes de las plantas *Jacquinia macrocarpa*, *Baccharis glutinosa* y *Krameria erecta* con actividad antifúngica sobre el desarrollo de *Fusarium verticillioides*.

Específicos

1. Evaluar y verificar el efecto de las fracciones en butanol de *J. macrocarpa* y acetato de etilo de *B. glutinosa* y *K. erecta* en el crecimiento radial y germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*.
2. Evaluar la toxicidad aguda de las fracciones obtenidas por partición en *n*-butanol y acetato de etilo a partir de los extractos metanólicos en el modelo *Artemia salina*.
3. Evaluar el potencial mutagénico de las fracciones obtenidas por partición en *n*-butanol y acetato de etilo a partir de los extractos metanólicos de plantas utilizando como modelo *Salmonella typhimurium*.

HIPÓTESIS

La utilización de los extractos metanólicos de las plantas *Jacquinia macrocarpa*, *Baccharis glutinosa* y *Krameria erecta*, obtenidos por partición en butanol y acetato de etilo no son tóxicos para *Artemia salina* ni mutagénicos para *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas utilizadas en este estudio fueron *Jacquinia macrocarpa*, *Baccharis glutinosa* y *Krameria erecta*, cuya actividad antifúngica sobre *F. verticillioides* ha sido reportada previamente (Tequida-Meneses y col., 2002; Suárez-Jiménez y col., 2007; Rosas-Burgos y col., 2009 y 2010).

Recolección de las muestras

La colecta de las plantas *K. erecta* y *J. macrocarpa* se llevó a cabo en la región de Los Arrieros, Sonora, ubicada en las coordenadas N 28° 20.538' W 111° 08.911' altitud 280 pies y N 28° 19.526' W 111° 08.828' altitud 227 pies durante el mes de agosto de 2010. *B. glutinosa* fue colectada en el mes de octubre de 2010 en la región Este del Arroyo de Tecoripa, Sonora, en dirección al poblado de San Javier, Sonora.

Una vez colectadas, las plantas fueron trasladadas al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA). Un espécimen de cada una fue llevado para su identificación y registro en el herbario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS-UNISON).

Obtención de los extractos con actividad antifúngica

Para la preparación de los extractos se utilizaron solamente las partes aéreas (tallos, hojas y flores), las cuales se secaron a temperatura ambiente y a la sombra por dos semanas. Una vez secas, se molieron en una máquina quebradora, donde se redujo su tamaño y después se molió en un molino (Pulvex 200) hasta obtener un tamaño de partícula de 0.5-1.0 mm. Posteriormente se prepararon los extractos de cada planta mezclando 60 g de polvo con 940 ml de metanol al 70 % (p/v), con agitación constante por una hora. Transcurrido ese tiempo se dejó a temperatura ambiente por 72 h en oscuridad, agitando periódicamente. Después, los extractos se filtraron con papel filtro Whatman No. 1 para eliminar los sólidos (Tequida-Meneses y col., 2002), se evaporaron a 45°C y 95 rpm usando un rotavapor (Yamato RE300) y los sólidos obtenidos fueron re-suspendidos en 1 L de agua destilada. Para la fraccionación secuencial se utilizaron los siguientes solventes: hexano, acetato de etilo y n-butanol, hasta obtener la fracción deseada de cada una de las plantas.

Una vez obtenidas las fracciones, se destilaron en el rotavapor como se indicó antes para posteriormente evaluar y verificar la actividad antifúngica de cada una de ellas sobre *F. verticillioides* (ATCC 52539).

Preparación del inóculo

El hongo utilizado se obtuvo de una cepa comercial de *F. verticillioides* ATCC 52539. La especie fue cultivada en tubos de ensayo con agar papa dextrosa (PDA, Difco,

Laboratories, Detroit, MI), incubando a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 10 días. A partir de los cultivos se obtuvo el inóculo, el cual consistió en una suspensión de esporas del hongo en matraces Erlenmeyer con agar PDA, bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La suspensión de esporas se obtuvo agregando a cada matraz con las colonias, un volumen aproximado de 50 mL de solución Tween 80 al 0.1 % (v/v), agitando durante 5 minutos con una barra magnética estéril. Finalmente se determinó la concentración de esporas mediante conteo de esporas en una cámara de Neubauer (Suárez-Jiménez y col., 2007).

Evaluación y verificación de la actividad antifúngica de los extractos fraccionados de plantas

Crecimiento radial (Técnica de inoculación por pozo)

Se prepararon medios de cultivo de PDA adicionado con 5 mg mL^{-1} de cada una de las fracciones de los extractos de plantas re-disueltos en metanol *Baccharis glutinosa* (FAe Bg) y *Krameria erecta* (FAe Ke) en acetato de etilo y *Jacquinia macrocarpa* (FB Jm) en *n*-butanol, además de tratamientos control con PDA (cPDA) y PDA con la cantidad equivalente a la que se re-disolvieron los extractos en metanol (1ml) (cPDAMeOH). Con una pipeta Pasteur estéril se hizo un pozo de 0.6 cm en el centro de la placa Petri en el cual se depositó el inóculo del hongo a una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} y se incubó a 25°C . El diámetro de la colonia se midió cada 24 h

hasta que el control alcanzó el borde de la placa (Rosas-Burgos y col., 2009). Cada tratamiento (extractos fraccionados) fue realizado por triplicado.

El porcentaje de inhibición fue calculado a partir de los datos experimentales de crecimiento radial con respecto al control, el cual se consideró como el 100 % de crecimiento radial ó cero porciento de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\bar{R}_c - R_1)}{\bar{R}_c} \times 100$$

Donde:

R_c = Es el radio de la colonia en el medio control PDA (cm).

R_1 = Es el radio de la colonia del medio con el extracto de planta corregido tomando en consideración el efecto del solvente (Suárez-Jiménez y col., 2007).

Germinación de esporas (Técnica inoculación por siembra en placa)

Este ensayo se realizó utilizando placas Petri con medio PDA adicionado con 5 mg mL⁻¹ de cada una de las fracciones de los extractos (FAe Bg, FAe Ke y FB Jm), además de los tratamientos control (solo PDA y PDA con MeOH). Se inocularon esporas de *F. verticillioides* dispersando 3 µl de suspensión una concentración de 1 x 10⁴ esporas mL⁻¹ sobre la superficie del agar. Enseguida se incubaron a 25°C con ciclo de 12 h luz/oscuridad. El número de esporas germinadas por placa se

determinó contando 200 esporas al azar (germinadas y no germinadas) cada 4 h utilizando un microscopio óptico (Leica DME XL). Se consideró una espora germinada cuando la longitud del túbulo germinal creció al diámetro total de la espora (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Cada tratamiento (extractos fraccionados y los controles) fue realizado por duplicado. El porcentaje de inhibición de la germinación fue calculado con respecto al control utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\%S_c - \% S_t}{\%S_c} \times 100$$

Donde:

%Sc= es el porcentaje de esporas germinadas en el control.

%St= es el porcentaje de esporas germinadas en los diferentes tratamientos corregido tomando en consideración el efecto del solvente (Plascencia-Jatomea y col., 2003).

Estudio de toxicidad

El ensayo de toxicidad aguda se realizó utilizando la técnica descrita por Jiménez y col. (1997), con algunas modificaciones, que se describen a continuación:

Se colocaron 0.1 g de huevecillos de *Artemia salina* suspendidos en 1 L de agua de mar estéril, con aireación e iluminación constante por 24 h para permitir su eclosión. El ensayo se llevó a cabo utilizando nauplios de *A. salina* vivos con 24 h de edad, los cuales fueron expuestos a las concentraciones de 5.0, 0.5, 0.005 y 0.0005 mg mL⁻¹ de cada una de las fracciones de extractos durante 24, 48 y 72 h. Los extractos de plantas fraccionados (FAe *Bg*, FAe *Ke* y FB *Jm*) fueron re-disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO Fermont). Al final de cada periodo de exposición se contabilizó el número de nauplios (estadio en el cual *A. salina* se encuentra como larva) vivos para obtener el porcentaje de mortalidad. Este ensayo se realizó por quintuplicado con dos repeticiones.

Ensayo de Ames

En el presente estudio se utilizaron cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, dependientes de histidina adquiridas del laboratorio Molecular Toxicology, Inc., USA.

Primeramente cada una de las cepas se colocó en caldo nutritivo (Difco Nutrient Broth) para su reproducción, incubándose por 12 h a 37°C en baño (Precision 368A) con agitación constante a 120 rpm en la obscuridad. El experimento se llevó a cabo una vez que la densidad del cultivo fue de aproximadamente 1.2x10⁸ células mL⁻¹.

Se utilizaron diferentes concentraciones de las fracciones de extractos (FAe *Bg*, FAe *Ke* y FB *Jm*), siendo éstas de 5, 0.5, 0.005, 0.0005, 0.00005 y 0.000005 mg mL⁻¹ de cada una.

Se añadieron 2000 μL de agar bacteriológico (Sigma Chemical Co.) adicionado con histidina y biotina a tubos de ensaye mantenidos a 45°C . A dichos tubos se agregaron 100 μL de cultivo fresco de *S. typhimurium* TA 100 y TA 98, 100 μL de las fracciones de los extractos con (500 μL) y sin la adición de extracto metabólico S9. Como control positivo de mutagenicidad se utilizó azida de sodio (sin S9) y aflatoxina B_1 (con S9). Los tubos se agitaron y la mezcla fue vertida sobre placas con agar mínimamente glucosado. Las placas se incubaron (incubadora Precision GCA Corporation) a 37°C por 48 h, contabilizando el número de bacterias revertantes por placa (Figura 4). Como control (revertantes espontáneas) utilizaron 100 μL de caldo con la bacteria en los 2000 μL de agar superior (con y sin la presencia de S9), el cual también se vació sobre placas conteniendo agar mínimamente glucosado. Los resultados fueron expresados cuantitativamente a través del número de revertantes por placa (Maron y Ames, 1983).

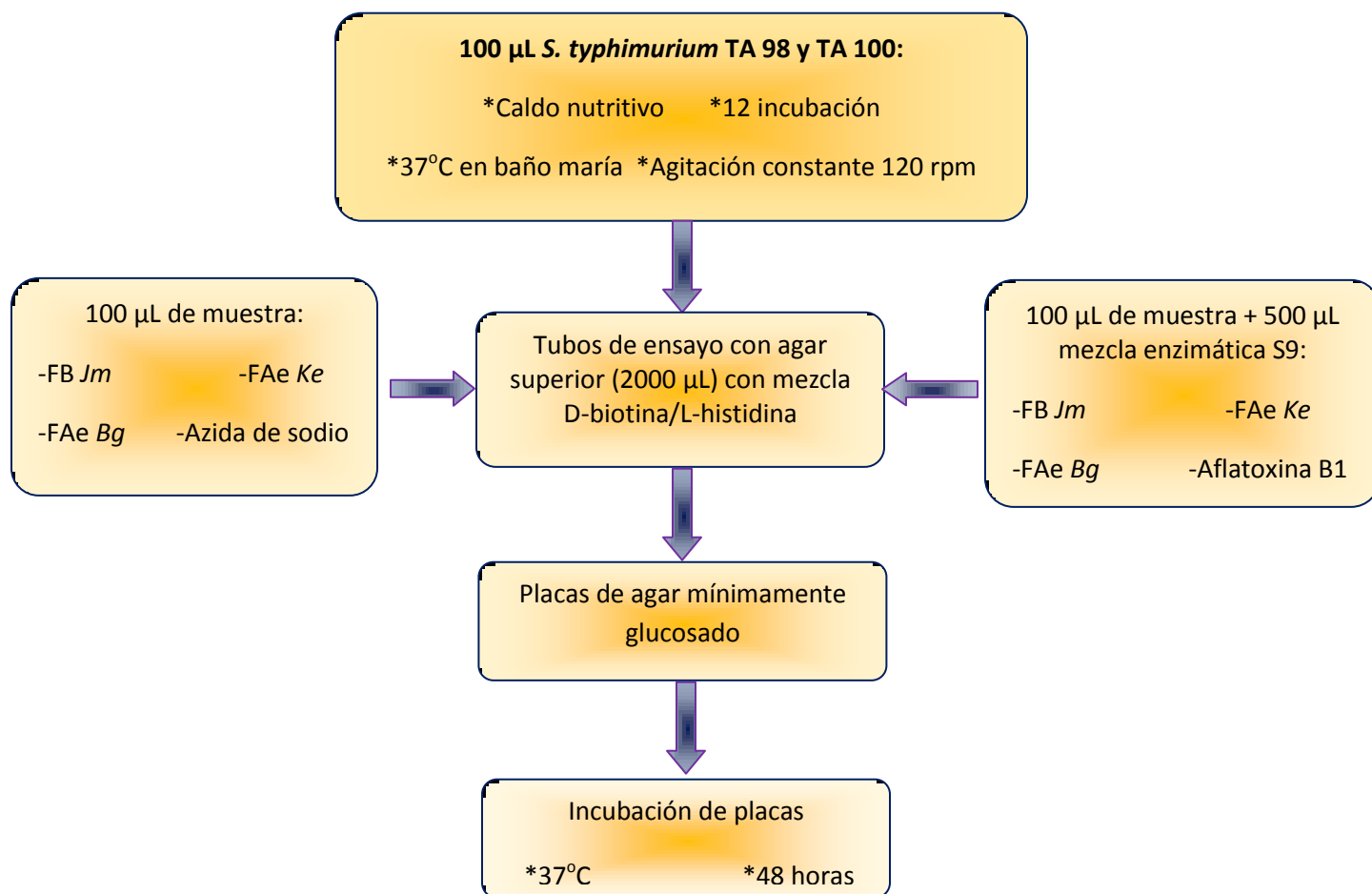


Figura 4. Diagrama del procedimiento de Ames empleado con los extractos de las plantas *Jacquinia macrocarpa* (FB *Jm*), *Krameria erecta* (FAe *Kr*) y *Baccharis glutinosa* (FAe *Bg*).

Análisis de datos

Cada experimento se realizó por lo menos dos veces, con tres réplicas por condición experimental como mínimo.

Se llevó a cabo una comparación de medias de cada experimento y la desviación estándar, utilizando el paquete estadístico JMP 5.0.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental, desde la evaluación y verificación del efecto de cada uno de los extractos metanólicos fraccionados en la cinética de crecimiento de *F. verticillioides*, hasta la evaluación de toxicidad aguda con *Artemia salina* y de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* mediante la técnica de Ames.

Crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se utilizaron los controles PDA con y sin metanol, donde se consideró el efecto que presentó el metanol sobre el crecimiento radial del hongo.

Se observó que el extracto de *Jacquinia macrocarpa* presentó un mayor efecto antifúngico sobre el crecimiento radial del hongo, encontrando un porcentaje de inhibición de 100 % hasta las 144 h (Figura 5). A las 168 h se observó un incremento en el diámetro, encontrando una inhibición de 95 %. Esto concuerda con lo encontrado por Buitimea y col. (2010), quienes reportaron un efecto de 94-100 % en *F. verticillioides*. Por otra parte, el extracto de *B. glutinosa* inhibió en un 72 % el crecimiento radial a las 168 h, lo que sugiere que los compuestos activos presentan un efecto fungistático sobre el hongo. El efecto inhibitorio de *Baccharis glutinosa* ya ha sido reportado anteriormente por Rosas-Burgos y col. (2009), con una inhibición radial de 67 % (336 h de incubación).

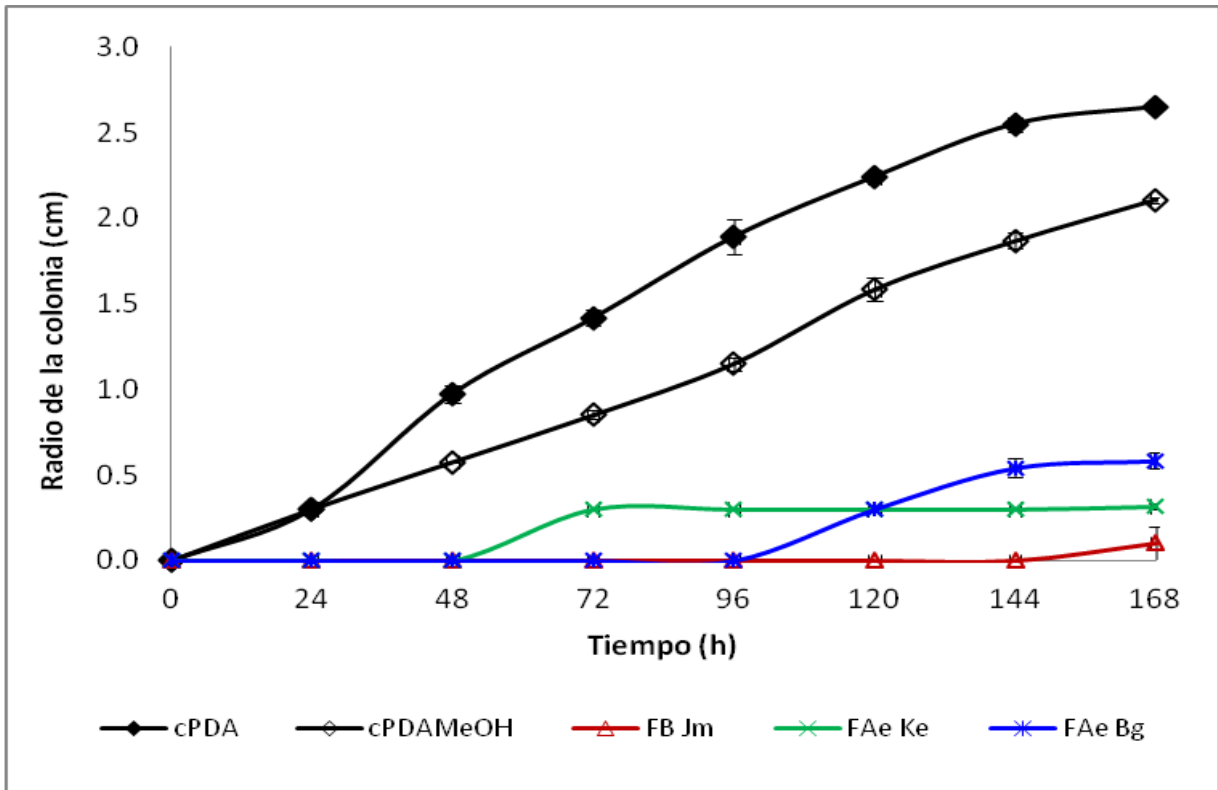


Figura 5. Crecimiento radial de *Fusarium verticillioides* en medios adicionados con extractos fraccionados de *Jacquinia macrocarpa* (FB Jm), *Krameria erecta* (FAe Ke) y *Baccharis glutinosa* (FAe Bg) a una concentración de 5 mg mL⁻¹.

cPDA= Control PDA, cPDAMeOH= Control PDA con metanol.

Por último, en el extracto de *Krameria erecta* se observó que hasta las 48 h se retrasa por completo el crecimiento del radio de la colonia (100 %), mientras que a las 72 h se observó un incremento del diámetro, encontrando una capacidad para inhibir el crecimiento radial de 85 %. Es importante mencionar que los mecanismos de acción de los compuestos presentes en los extractos provenientes de las plantas son variables y pueden ser atribuidos a la inhibición enzimática por oxidación de compuestos, a la formación de canales iónicos en la membrana microbiana o bien causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero. Así mismo, existen compuestos que se intercalan con el ADN y en algunos otros el mecanismo de acción no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos (Hernández-Delgado y col., 2007).

En la tabla 2 se presenta la velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* en cada uno de los extractos de plantas con sus respectivos controles. La velocidad de crecimiento en los tres extractos fue más lenta en relación a los controles, donde la variación entre estos no fue superada por los tratamientos en ningún caso. Fue más lenta en el extracto de FB *Jm*, seguido del extracto FAe *Ke* y por último FAe *Bg*. Esto corresponde con los resultados obtenidos en la inhibición del crecimiento radial, indicando que la presencia de los compuestos en la FB *Jm* y FAe *Bg* retardan la fase de adaptación del hongo, y con ello, su velocidad de crecimiento, asimismo que en la fase estacionaria FAe *Ke* tiene efecto constante, ya que se pudo observar que se mantuvo estable a partir de las 72 h.

Tabla 2. Velocidad de crecimiento radial de *Fusarium verticillioides* en medio PDA adicionado con los extractos fraccionados (5 mg mL⁻¹)

Tratamiento	Velocidad específica de crecimiento (cm h⁻¹)
cPDA	0.0185
cPDAMeOH	0.0129
FB <i>Jm</i>	0.0003
FAe <i>Ke</i>	0.0125
FAe <i>Bg</i>	0.0113

cPDA= Control PDA, cPDAMeOH= Control con metanol, FB *Jm*= Fracción butanólica de *Jacquinia macrocarpa*, FAe *Ke*= Fracción acetato de etilo de *Krameria erecta*, FAe *Bg*= Fracción acetato de etilo de *Baccharis glutinosa*.

Germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*

El extracto de *B. glutinosa* de la fracción acetato de etilo (FAe Bg) inhibió en 100 % la germinación de esporas de *F. verticillioides* (Figura 6). Lo anterior fue reportado por Rosas-Burgos y col. (2010), quienes encontraron que este mismo extracto inhibe en 87 % la germinación de esporas de *F. verticillioides* aisladas de maíz contaminado de forma natural, el cual tenía 99 % de semejanza en la secuencia de ADN de la cepa de *Fusarium* spp. FJ210580.1. Asimismo, con el extracto de *K. erecta* de la fracción acetato de etilo (FAe Ke) se inhibió en 95 % la germinación de esporas y con el extracto de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica (FB Jm) solamente 19 %, lo cual difiere al 41 % de inhibición para el mismo hongo reportado por Fimbres-López y col. (2010). Esta diferencia se puede atribuir a la concentración evaluada por estos autores, que fue de 1.883 mg mL⁻¹, la cual es baja comparada a la utilizada en este estudio (5 mg mL⁻¹). Probablemente el hongo al recibir una sustancia extraña en el medio habitual, activa sus mecanismos de supervivencia, y por ello la germinación de esporas es mayor, dando como resultado la disminución en la capacidad de inhibición por el extracto. Las esporas expuestas al extracto de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica (FB Jm) presentaron un alto porcentaje de germinación (1.438 %) en comparación con los otros dos extractos (Tabla 3). Esto es diferente a los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento radial, donde el extracto de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica (FB Jm) presentó la mayor capacidad para inhibir el crecimiento del radio de la colonia. También se observa que los tres extractos tienen la capacidad de retardar este proceso en comparación con los

controles. Vargas y col. (2010), sugieren que los compuestos presentes en el extracto no necesariamente deben ser los mismos que actúan sobre las esporas inhibiendo su germinación. Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede sugerir que el extracto de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica (FB *Jm*) se utilice para el control del crecimiento radial de *F. verticillioides*.

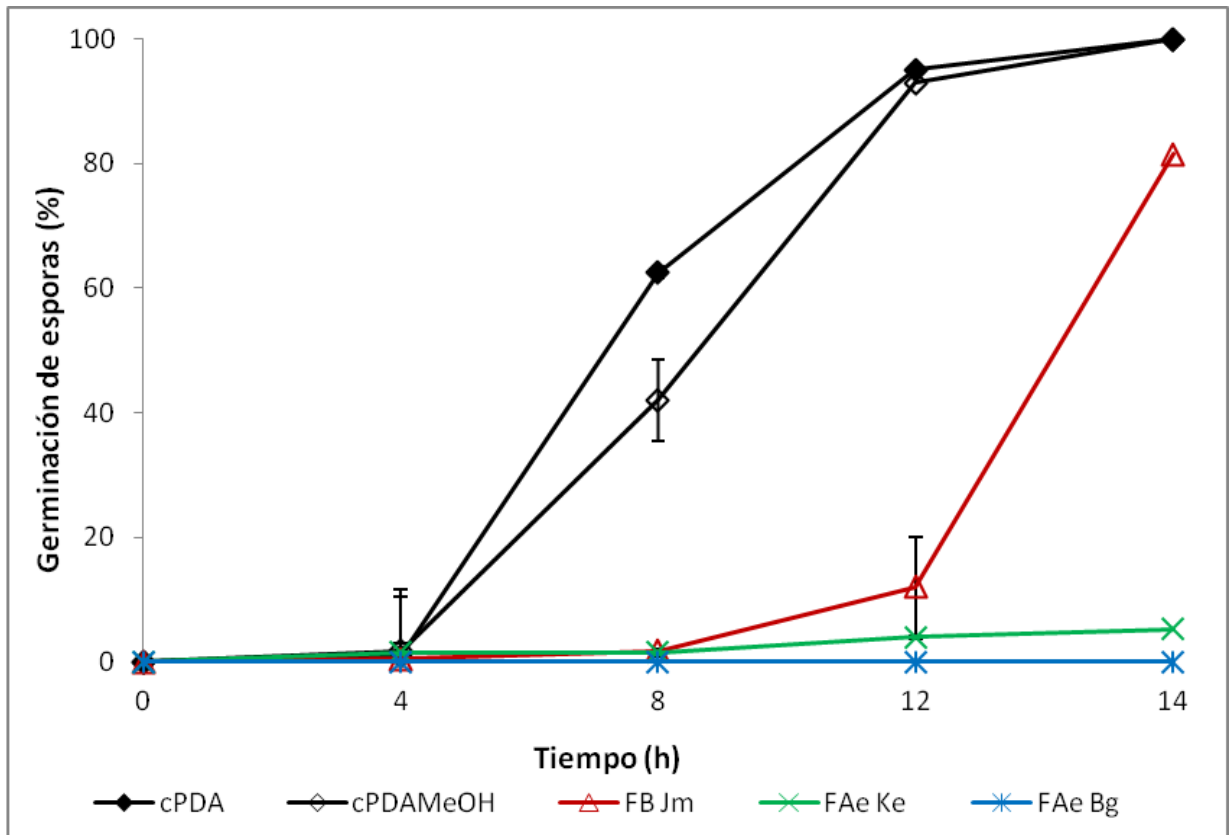


Figura 6. Germinación de esporas de *Fusarium verticillioides* en medio con extractos fraccionados de *Jacquinia macrocarpa* (FB Jm), *Krameria erecta* (FAe Ke) y *Baccharis glutinosa* (FAe Bg) a una concentración de 5 mg mL⁻¹.

cPDA= Control PDA, cPDAMeOH= Control PDA con metanol.

Tabla 3. Velocidad de germinación de esporas de *Fusarium verticillioides* en los medios adicionados con extractos fraccionados (5 mg mL⁻¹).

Tratamiento	Velocidad de germinación (% EG h ⁻¹)
FAe <i>Bg</i>	0.000
FAe <i>Ke</i>	0.354
FB <i>Jm</i>	1.438
cPDAMeOH	11.406
cPDA	11.750

FAe *Bg* = Fracción acetato de etilo de *Baccharis glutinosa*, FAe *Ke* = Fracción acetato de etilo de *Krameria erecta*, FB *Jm* = Fracción butanólica de *Jacquinia macrocarpa*, cPDAMeOH = Control con metanol, cPDA = Control PDA. EG h⁻¹ = esporas germinadas h.

El mecanismo de acción que inhibe el crecimiento de los hongos, varía en función del lugar sobre el que actúen, ya sea la pared, la membrana o el núcleo celular, lo cual está relacionado con la estructura química del compuesto antifúngico (Arenas, 2005). Debido a que la pared celular de los hongos, por su localización en el exterior de la célula, es el primer lugar de interacción con cualquier compuesto u objeto del medio exterior, resulta ser una estructura esencial y su eliminación o los defectos en su formación tienen profundos efectos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica. La pared celular está compuesta básicamente de polisacáridos (destacando la quitina, glucano y manano o galactomanano) y proteínas que se unen a estos carbohidratos dando lugar a glicoproteínas (Pontón, 2008).

Con base a lo anterior, el posible modo de acción de los extractos fraccionados de las plantas en estudio pueden estar relacionados con la interacción de los extractos con el polisacárido estructural más importante de la pared celular, el β -1,3-D-glucano. Este representa el 50-60 % del peso seco de la pared celular y está unido covalentemente con otros componentes de esta estructura (otros glucanos, quitina o manoproteínas) que le proporcionan resistencia mecánica esencial para mantener la integridad de la célula. Es probable que al estar en contacto la pared celular del hongo con los compuestos activos de los extractos vegetales, estos se unen a la β -1,3-D-glucano sintetasa, afectando la síntesis del β -1,3-D-glucano (Pontón, 2008). Dentro de los estudios que se han llevado a cabo para dilucidar los mecanismos de acción de algunos compuestos obtenidos de extractos de plantas con actividad

antifúngica, 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).

Ensayo de toxicidad aguda

En la evaluación de toxicidad aguda de los extractos primeramente se muestra la figura 7, en ella se presenta el control negativo donde *A. salina* se mantuvo suspendida en agua de mar. En la figura 8 presenta la mortalidad de nauplios en presencia del control positivo de toxicidad aguda de azida de sodio, y en ella se observa una mortalidad del 100 % al exponer los nauplios a las concentraciones de 5 y 0.5 mg mL⁻¹ por 24 h.

En la figura 9 se presenta la mortalidad de nauplios en presencia del extracto de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica (FB *Jm*). En donde se puede observar que las concentraciones de 5 y 0.5 mg mL⁻¹ ocasionaron la muerte de los nauplios desde las 24 h de exposición.

En las figuras 10 y 11 se muestra la mortalidad de nauplios en presencia de los extractos de la fracción acetato de etilo de *K. erecta* y *B. glutinosa*. Se observó 100 % de mortalidad al exponer los nauplios a una concentración de 5 mg mL⁻¹ de cada extracto a las 24 h.

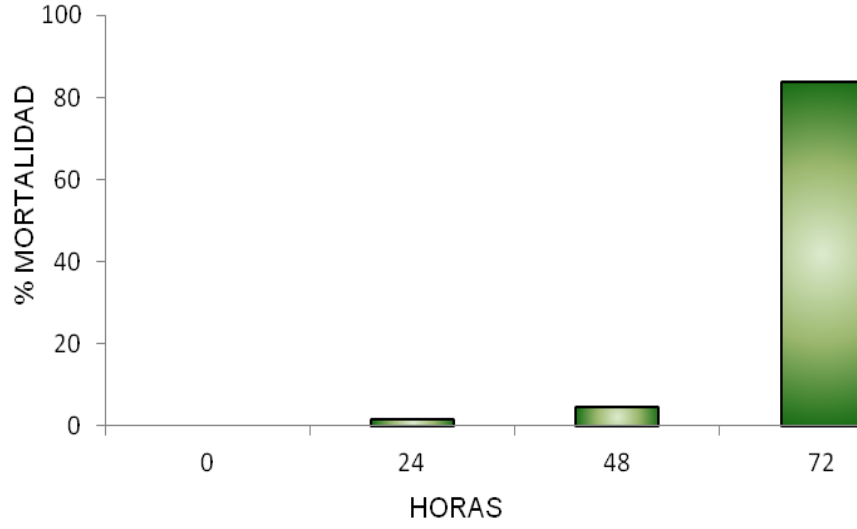


Figura 7. Mortalidad de *Artemia salina* en agua de mar estéril (control negativo de toxicidad aguda).

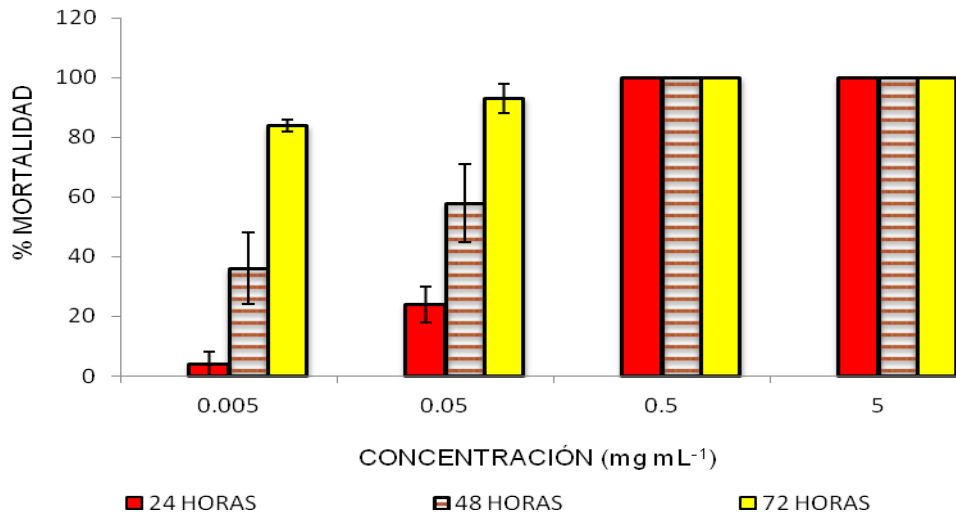


Figura 8. Mortalidad de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de azida de sodio (control positivo de toxicidad aguda).

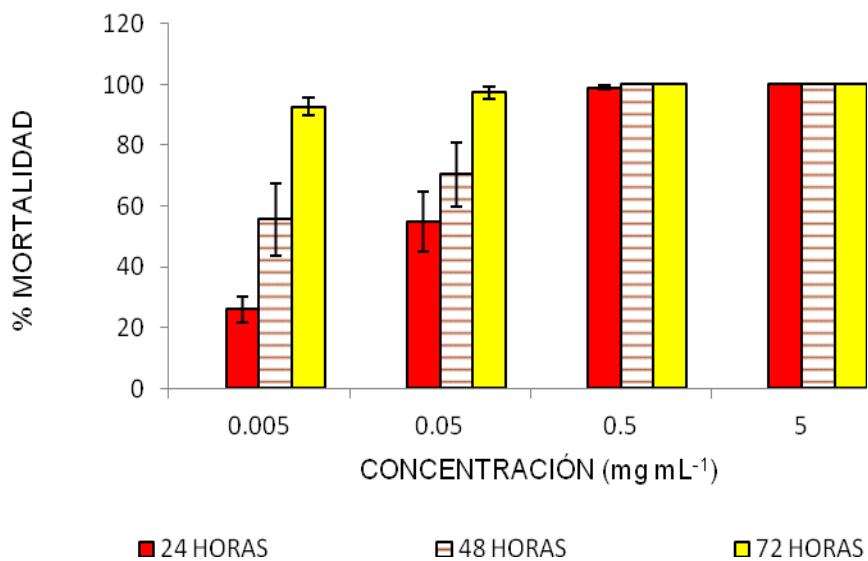


Figura 9. Mortalidad de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* FB.

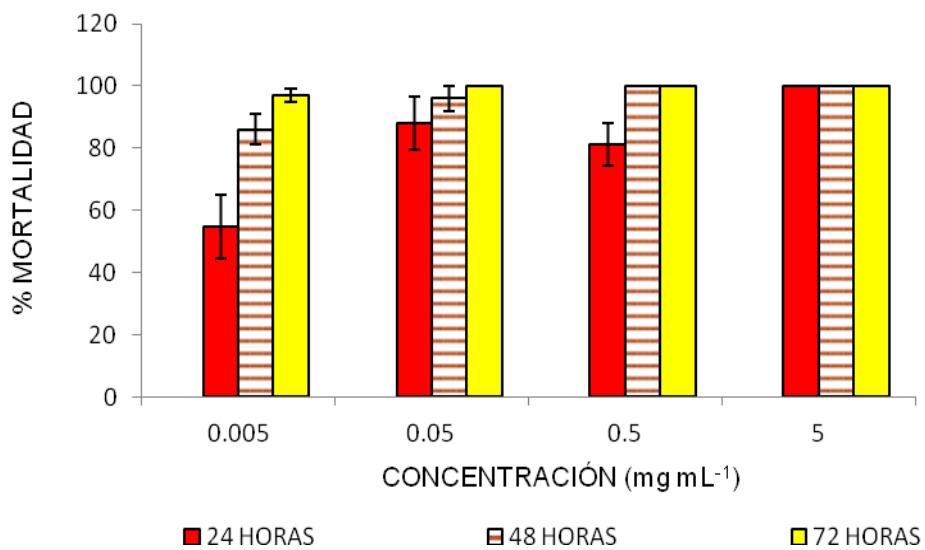


Figura 10. Mortalidad de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Krameria erecta* FAe.

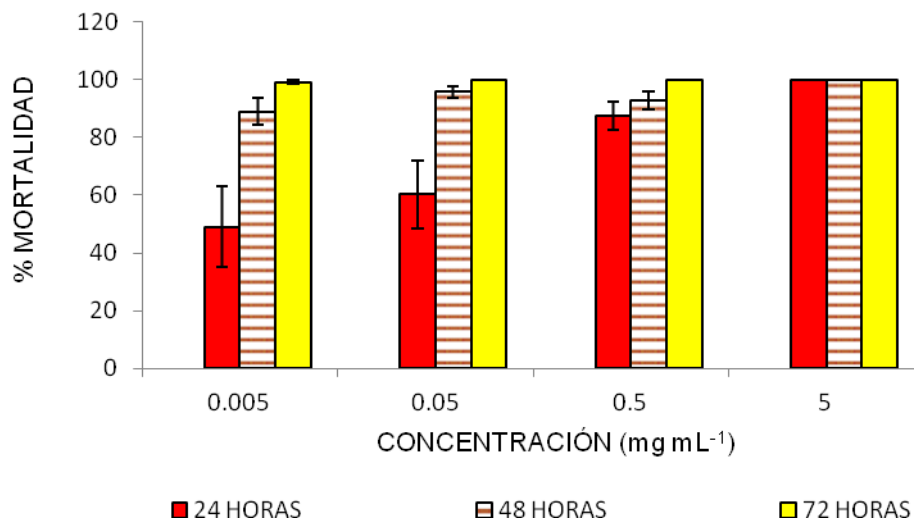


Figura 11. Mortalidad de *Artemia salina* expuesta a diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Baccharis glutinosa* FAe.

Se observó que el extracto de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica mostró una toxicidad similar a la producida por la azida de sodio a las concentraciones de 5 y 0.5 mg mL⁻¹, que ocasionaron la muerte total de los organismos en estudio a las 24 h. Este mismo extracto presentó menor toxicidad en el periodo de estudio, ya que a concentraciones menores de 0.5 mg mL⁻¹ se obtuvo menor mortalidad de nauplios (92 %), seguido por el extracto de *K. erecta* de la fracción acetato de etilo (97 %) y por último el extracto de *B. glutinosa* de la fracción acetato de etilo (99 %).

Estos resultados sugieren que la mortalidad de los nauplios se puede atribuir a la presencia de compuestos activos en cada uno de los extractos metanólicos fraccionados. Bouzada y col., (2009), indican que el ensayo de toxicidad aguda en *A. salina* puede dar una amplia idea de que existen a menudo componentes fisiológicamente activos que son tóxicos. Si bien hasta el momento no se han caracterizado los compuestos activos presentes en los extractos de plantas, se ha reportado que los organismos en estudio a las 24 h presentan una cutícula delgada, lo que los hace especialmente sensibles a sustancias que pudiesen ser tóxicas, haciendo más fácil su penetración a través de la barrera fisiológica absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones que pueden ser efectos subletales sobre la movilidad y la reproducción hasta la muerte de la larva (Sanabria y col., 1997; González y Aportela, 2001; González y col., 2007). Al realizar la revisión bibliográfica no se encontraron sobre la toxicidad aguda de los tres extractos empleados, sin embargo; existen investigaciones de extractos provenientes de plantas donde uno de los principales organismos en estudio es *A. salina*. Brugués y

Reguero-Reza (2007), realizaron una evaluación preliminar de la toxicidad de extractos y fracciones de *Sida rhombifolia* L., donde uno de los organismos de prueba fue *A. salina* poniendo de manifiesto que los mayores valores de toxicidad se encuentran en las fracciones y, dentro de este grupo la que presentó mayor toxicidad fue la fracción acetato de etilo. Lo anterior es similar a lo ocurrido en este estudio.

Ensayo de mutagenicidad

En este estudio se evaluó la mutagenicidad sobre *S. typhimurium* TA 98 y TA 100 a través del número de bacterias revertidas por placa al estar en contacto con cada uno de los tres extractos vegetales propuestos para el control de *F. verticillioides* (FB *Jm*, *Bg* FAe y *Ke* FAe). Así mismo, se utilizó azida de sodio y aflatoxina B₁ (AFB₁) como controles positivos de mutagenicidad.

En la figura 12 se muestra la mutagenicidad inducida por azida de sodio en las cepas TA 98 y TA 100, misma que se debe a una sustitución en los pares de bases de *S. typhimurium* por la interacción del metabolito orgánico identificado químicamente como L-azidoalanina (Prieto y col., 2005). El otro agente mutagénico utilizado fue la aflatoxina B₁ con activación metabólica mediante la adición de un grupo de enzimas del complejo S9. Los resultados mostraron que en las dos cepas utilizadas (TA 98 y TA 100) a la concentración de 500 ng se logró la mayor razón de mutagenicidad (Figura 13).

Los resultados indican que los extractos de *J. macrocarpa* de la fracción butanólica, *B. glutinosa* y *K. erecta* de la fracción acetato de etilo no inducen daño en el ADN en las células procariotas de *S. typhimurium* TA 98 y TA 100 (Figuras 14-19). Ninguno de los tres extractos presentó efecto mutagénico, y de acuerdo con Maron y Ames (1983), para que una sustancia sea considerada mutagénica, es este caso los extractos, se necesita que ocasione la multiplicación al doble de las colonias en relación a las colonias revertantes espontáneas (incluidas en las figuras 14-19).

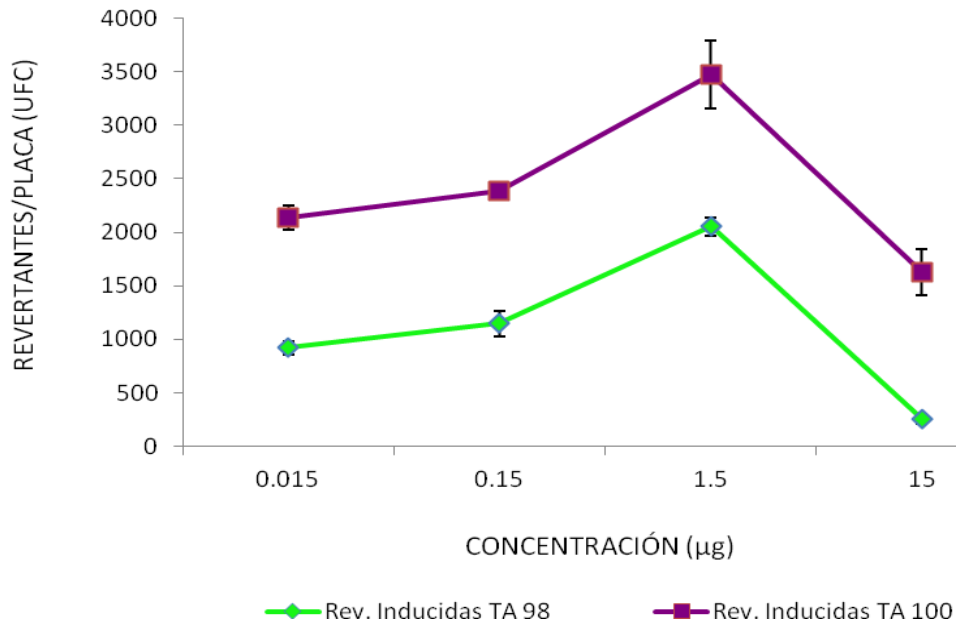


Figura 12. Revertantes inducidas por placa de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 con azida de sodio.

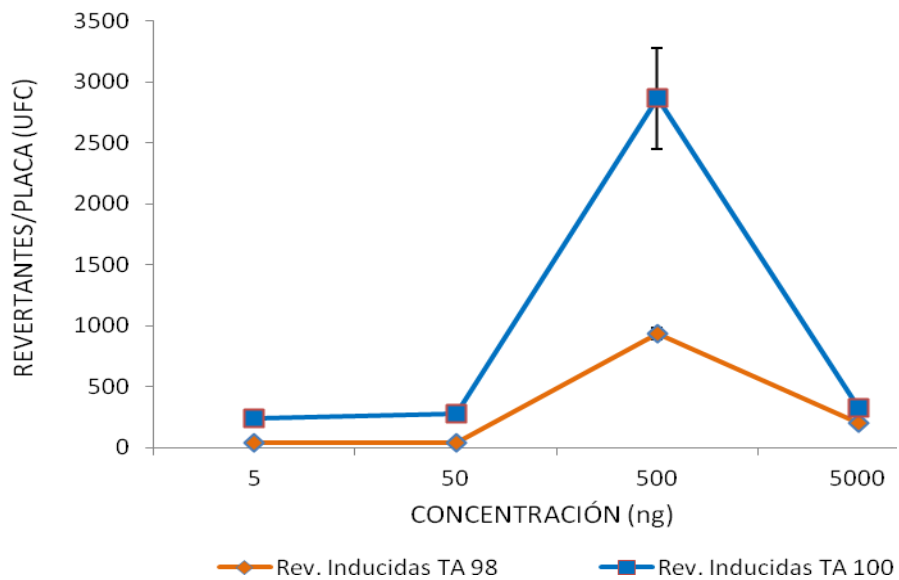


Figura 13. Revertantes inducidas por placa de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 con aflatoxina B₁.

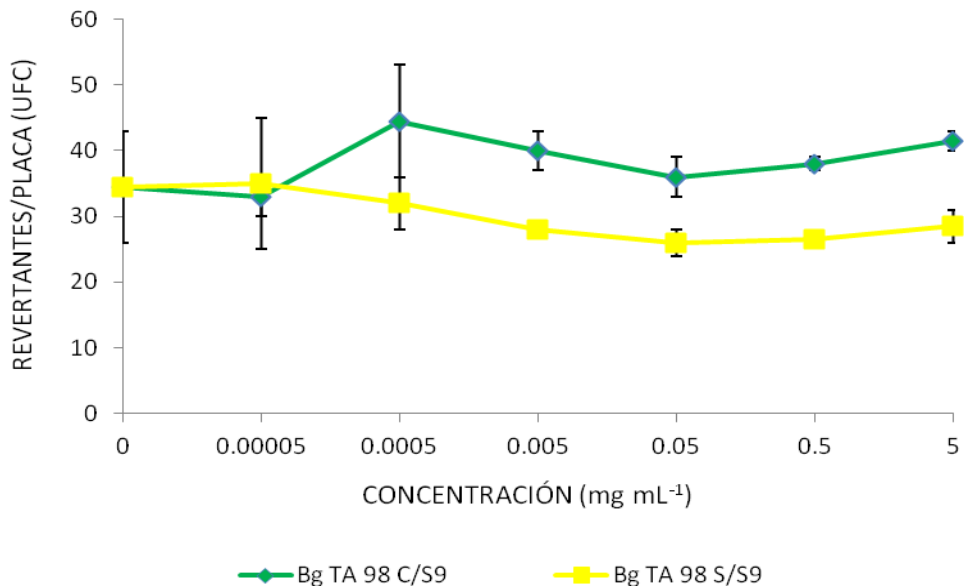


Figura 14. Revertantes por placa de *Salmonella typhimurium* TA 98 expuestas al extracto de *Bg* FAe con y sin enzima S9.

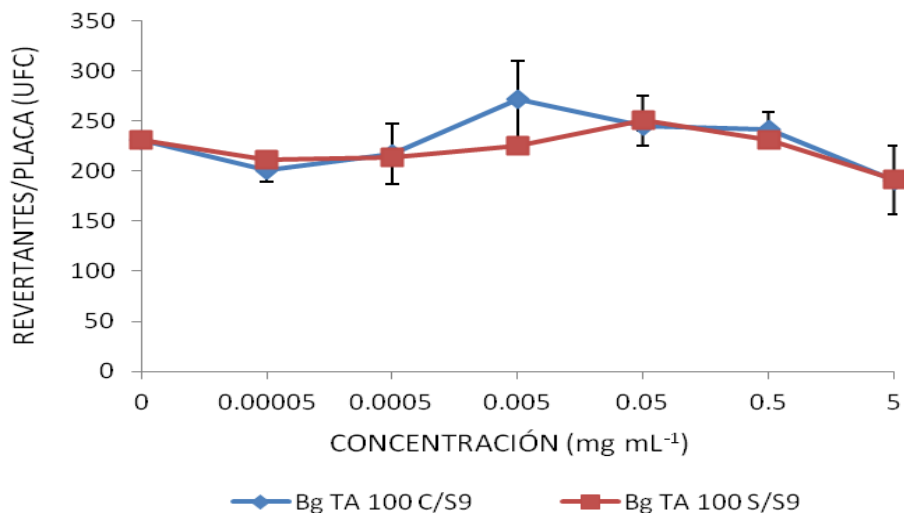


Figura 15. Revertantes por placa de *Salmonella typhimurium* TA 100 expuestas al extracto de *Bg* FAe con y sin enzima S9.

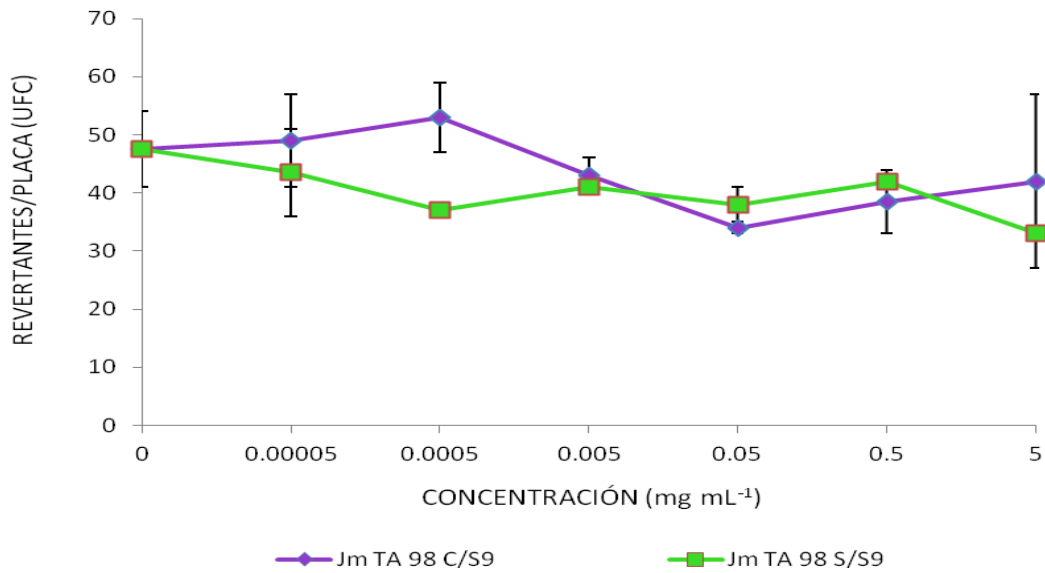


Figura 16. Revertantes por placa de *Salmonella typhimurium* TA 98 expuestas al extracto de *Jm* FB con y sin enzima S9.

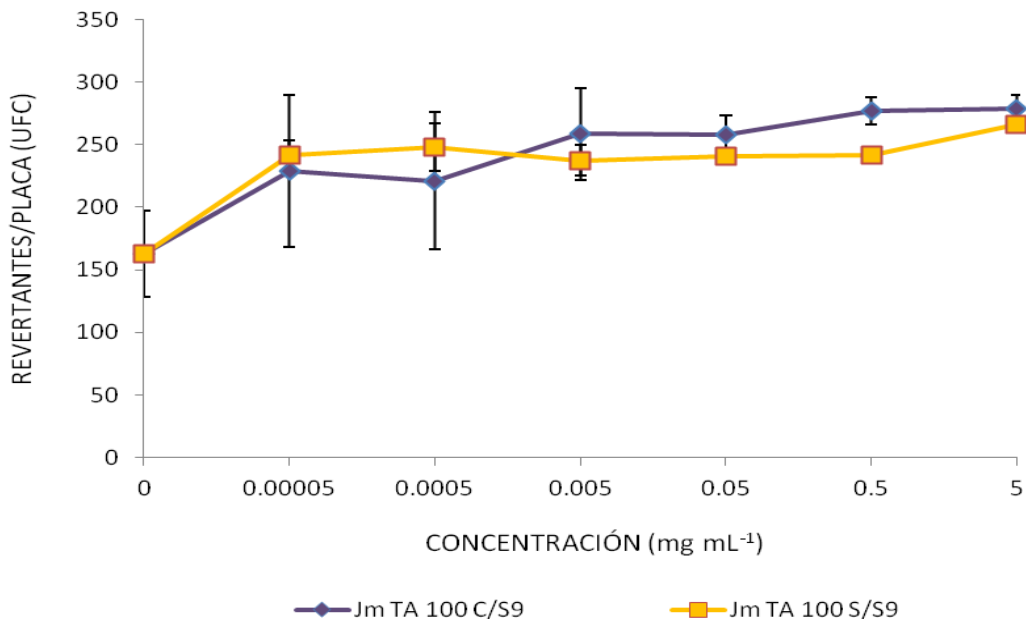


Figura 17. Revertantes por placa de *Salmonella typhimurium* TA 100 expuestas al extracto de *Jm* FB con y sin enzima S9.

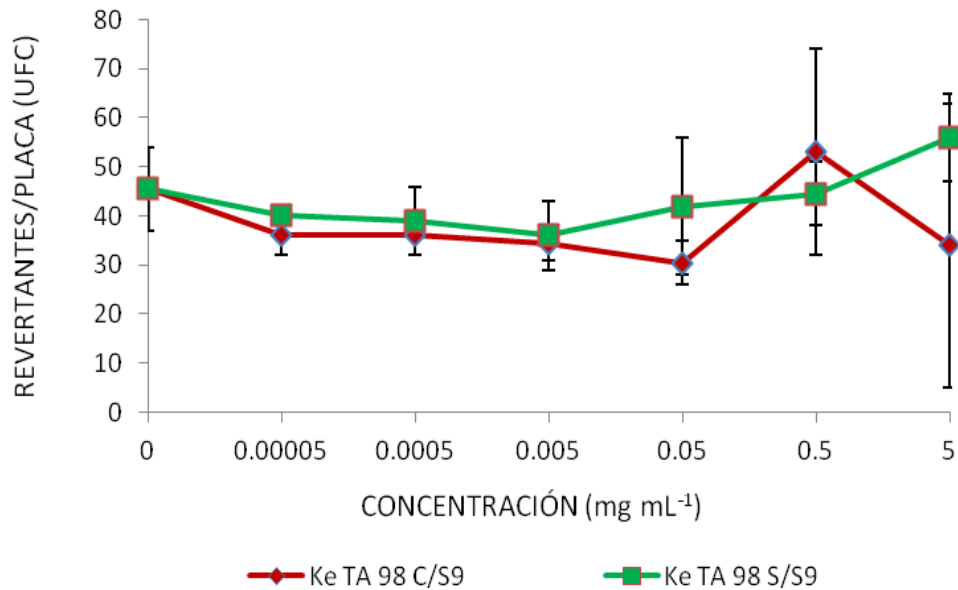


Figura 18. Revertantes por placa de *Salmonella typhimurium* TA 98 expuestas al extracto de Ke FAe con y sin enzima S9.

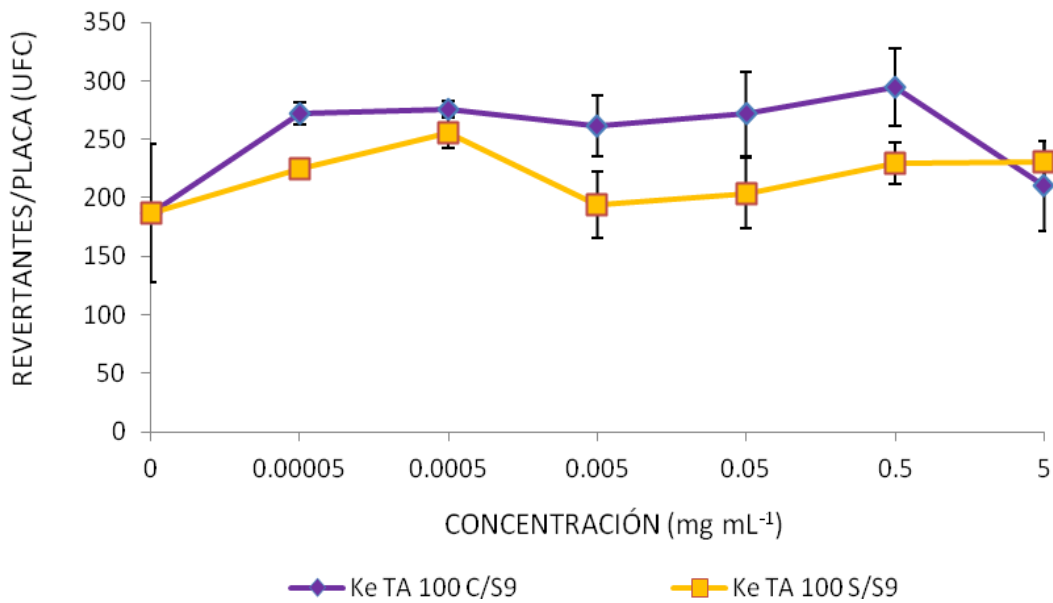


Figura 19. Revertantes por placa de *Salmonella typhimurium* TA 100 expuestas al extracto de Ke FAe con y sin enzima S9.

Hasta el momento no se han reportado estudios acerca del potencial mutagénico de los extractos de las tres plantas utilizadas en este estudio. Sin embargo, el estudio de plantas y sus compuestos activos se ha venido realizando desde años atrás. Recientemente, Nogueira y col. (2011) evaluaron *in vitro* e *in vivo* los efectos toxicológicos de extractos y fracciones de *Baccharis trímpera*, además mediante el ensayo de Ames estudiaron la mutagenicidad de los mismos, encontrando que son no mutagénicos, similar a lo encontrado en nuestro estudio. Por su parte Berzain y Rodrigo (2006), evaluaron la actividad genotóxica de la planta *Baccharis incarum* sobre *Drosophila melanogaster* mediante una prueba de mutación y recombinación somática a partir del extracto etéreo en concentraciones de 0.625 hasta 10 mg mL⁻¹, sin observar actividad genotóxica. De igual forma Cotelle y col. (2012), evaluaron con la prueba de Ames el potencial de toxicidad de un formícida obtenido a partir de una mezcla de cafeína, ácidos grasos y pulpa de cítricos teniendo como modelo a *S. typhimurium* cepas TA 97, TA 98, TA 100, TA 102 y TA 1535, con y sin activación metabólica de la fracción S9. Ellos reportan que el formícida no indujo un aumento significativo en el número de revertantes en comparación con los controles positivos y negativos, sugiriendo que el formícida podía ser clasificado como producto de bajo impacto ambiental en comparación con los formicidas comerciales comúnmente aplicados.

CONCLUSIONES

Las fracciones en butanol de *J. macrocarpa*, acetato de etilo de *B. glutinosa* y *K. erecta* en concentración de 5 mg mL⁻¹ afectaron el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides* (95, 85 y 72 %, respectivamente) así como la germinación de esporas (19, 95 y 100 %, respectivamente).

Los extractos de las fracciones obtenidas por partición ocasionaron toxicidad aguda en *Artemia salina* a las concentraciones de 0.005, 0.05, 0.5 y 5 mg mL⁻¹ (*Jm* FB 92 %, *Ke* FAe 97% y *Bg* FAe 99 %).

No se observó efecto mutagénico en *Salmonella typhimurium* cepas TA 98 y TA 100 por las fracciones en butanol de *J. macrocarpa*, acetato de etilo de *B. glutinosa* y *K. erecta* en las concentraciones de 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5 y 5 mg mL⁻¹.

RECOMENDACIONES

Una vez obtenidos resultados favorables en el estudio, se proponen las siguientes recomendaciones y sugerencias para futuras investigaciones:

Se necesita conocer cuál es el compuesto activo presente en cada uno de los extractos evaluados para su utilización masiva y segura en el control del crecimiento de *F. verticillioides*.

Evaluar el efecto de los extractos a partir de combinaciones entre ellos, ya que se pudo observar que no actúan en las mismas etapas de crecimiento del hongo y tal vez haciendo una mezcla de estos, se logre un mejor control de la cinética de crecimiento del hongo.

Estudiar el efecto de los extractos en el uso práctico dentro de un sistema de control integral de plagas *in situ* y enfermedades para maíz.

Se recomienda además, estudiar los mecanismos de acción de estos compuestos con actividad antifúngica.

Por último utilizar otros ensayos que determinen su potencial tóxico en organismos más complejos o que se asemejen más al organismo que será finalmente el consumidor del maíz y productos a base de este.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, E. 2005. Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. *Rev. Ciencia y Trabajo*. 15 (1): 52-67.
- Benhamou, N., Lafontaine, P.J. y Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*. 84: 1432.
- Bernal-Alcocer, A., Zamora-Natera, J.F., Virgen-Calleros, G. y Nuño-Romero, R. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23 (2):140-146.
- Berzaín, C., y Rodrigo, G. 2006. Evaluación genotoxicológica del extracto etéreo de *Baccharis incarum*. *BIOFARBO*. XIV (1): 11-15.
- Bouzada, M., Fabri, R., Noriega, M., Konno, T., Duarte, G., y Scio, E. 2009. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharm. Biol.* 47 (1): 44-52.
- Brugés, K., y Reguero-Reza, M.T. 2007. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Rev. Colomb. Biotecnol.* IX (1): 5-13.
- Buitimea, G., Rosas, E.C., Cortez, M.O., Gálvez, J.C. y Sánchez, R.I. 2010. Aislamiento biodirigido y análisis químico de un extracto con actividad antifúngica de *Jacquinia macrocarpa* (San Juanico). Presentado en el VII Congreso del Noroeste, III Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo., Son. Noviembre 10-13.
- Bush, B.J., Carson, M.L., Cubeta, M.A., Hagler, W.M. y Payne, G.A. 2004. Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology*. 94 (1): 88-93.

- Céspedes, C.L., Ávila, J.G., Serrato, B., Calderón-Mugica, J.C. y Salgado-Garciglia, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). J. Agric. Food. Chem. 54 (10): 3521-3527.
- Cortez-Rocha, M.O., Ramírez-Astudillo, W.R., Sánchez-Mariñez, R.I., Rosas-Burgos, E.C., Wong-Corral, F.J., Borboa-Flores, J., Castellón-Campaña, L.G. y Tequida-Meneses, M. 2003. Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70(4):668-673.
- Cortez-Rocha, M.O., Parra-Vergara, N.V. y Sánchez-Mariñez, R.I. 2012. "Nuevas Tendencias en Ciencias y Tecnología en Alimentos. Tópicos Selectos". Cap. 14. Hongos de importancia en granos y productos almacenados. Editorial Trillas, Pp: 381-407.
- Cotelle, S., Testolin, R.C., Foltête, A.S., Bossardi-Rissardi, G., Silveira, R.A. y Radetski, C.M. 2012. Genotoxicity potential of a new natural formicide. Environ. Sci. Pollut. Res. 19: 628–635.
- Davicino, R., Mattar, M.A., Casali, Y.A., Correa, S.G., Pettenati, E.M. y Micalizzi, B. 2007. Antifungal activity of plant extracts used in folk medicine in Argentina. Rev. Peru. 14 (2): 247-251.
- Del Rio, J.C., Moreno-Ramos, C., Pintón, P., Mendoza, E. y Oswald, I. 2007. Evaluación de la citotoxicidad de la aflatoxina y la fumonisina en células intestinales de porcino. Rev. Iberoam. Micol. 24: 136-141.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Brown, D.W., McCormick, S.P., Butchko, R.A.E., Alexander, N. y Busman, M. 2006. Biosynthesis of *Fusarium* mycotoxins and genomics of *Fusarium verticillioides*. Mycotoxin Research. 22 (2): 75-78.
- Duarte Vogel, S. y Villamil Jiménez, L. 2006. Micotoxinas en salud pública. Rev. Salud Pública. 8 (1): 129-135.

- El Ghaouth A., Arul G. y Asselin A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*. 82: 398-402.
- Figueroa-Gómez, R.M., Reynoso, M.M. y Reyes-Velázquez, W.P. 2007. Control del crecimiento y producción de fumonisinas por *Fusarium verticillioides* usando butilhidroxianisol bajo diferentes condiciones de actividad de agua. *Scientia CUCBA*. 9(1): 23-30.
- Fimbres-López, F., Plascencia-Jatomea, M., Aldana-Madrid, L., Robles-Zepeda, R. y Cortez-Rocha, M.O. 2010. Efecto de extractos de plantas silvestres en el desarrollo de *Fusarium verticillioides*. Presentado en el VII Congreso del Noroeste, III Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo. Son. Noviembre 10-13.
- Gallardo-Reyes, E.D., Ibarra-Moreno, G.M., Sánchez-Mariñez, R.I., Cuamea-Cruz, G., Molina-Gil, D., Parra-Vergara, N.V., Rosas-Burgos, E.C., y Cortez-Rocha, M.O. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays L.*) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24 (1): 27-34.
- García, S. y Heredia, N. 2006. Mycotoxins in Mexico: epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*. 162 (3): 255-264.
- García-Mateos, R., Soto-Hernández, M. y Martínez-Vázquez, M. 2000. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum.* 7 (2): 166-170.
- Gelderblom, W.C., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, M.J., Vleggaar, R. y Kriek, N.O.J. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806-1811.

- Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E., Snyman, S.D., Vleggar, R. y Marasas, W.F.O. 1993. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxic.* 31: 407-414.
- Glenn, E.A., Richardson, A.E. y Bacon, W.C. 2004. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides*, conidiation mutant. *Mycologia.* 96 (5): 968-980.
- González, A., Presa, M., Latorre, M. y Lurá, M. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Rev. Iberoam. Micol.* 24: 59-6.
- González, Y. y Aportela, P. 2001. Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anu. Toxochol.* 1(1):104-108.
- Gutiérrez, H., Gutiérrez, R., Herles, E., Hernández, M., Horna, P., Hoyos, P., Huby, C., Jiménez, M., Jiménez, L., Kollmann, A., Castañeda, B., Ibáñez, L. y Scotto, C. 2007. Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii Walp*) en tres especies de animales modelos: *Artemia franciscana* (*Crustácea, Anostraca*), pez Guppy (*Poecilia reticulata*) y ratón (*Mus musculus*). *Rev. Horizonte Médico.* 7(2): 103-108.
- Hernández-Delgado, S., Reyes-López, M.A., García-Olivares, J.G., Mayek-Pérez, N. y Reyes, C.A. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25 (2):127-133.
- Jiménez, M., Huerta, T. y Mateo, R. 1997. Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from bananas. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2): 364–369.
- Landeros, P., Reyes, W., Torres, A.M., Rojo, F. y Chulze, S.N. 2005. Sphinganine/Sphingosine (SA/SO) ratio and intake of fumonisin contaminated tortillas in a Mexican population. *Acta Toxicol. Argent.* 13 (2): 8-11.

- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Ed. Blackwell Publishing. 1ª ed. USA. Pp: 388.
- López, A.G., Theumer, M.G., Zygadlo, J.A. y Rubinstein, H.R. 2004. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathologia*. 158: 343-349.
- López-Benítez, A., López-Betancourt, S.R., Vázquez-Badillo, M.E., Rodríguez-Herrera, S.A., Mendoza-Elos, M. y Padrón-Corral, E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. F. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizocnia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23 (2): 183-190.
- Marasas, W.F.O. 1996. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact. *Adv. Exp. Med. Biol.* 392: 1-17.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. y Toussoun, T.A. 1984. *Toxicogenic Fusarium species: identity and mycotoxicology*. The Pennsylvania State University Press. University Park, PA, USA. Pp: 328.
- Marasas, W.F.O. 1995. Fumonisin. Their implications for human and animal health. *Natural Toxins*. 3: 193-198.
- Maron, D. y Ames, B. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113: 173-215.
- Martínez, S., Vela, A., Botero, A., Arandía, F. y Mollinedo, P. 2010. Nuevo microbioensayo de ecotoxicidad de extractos acuosos de plantas medicinales sobre *Daphnia magna* sp. *Rev. Boliv. de Química*. 27 (1): 29-32.
- Mazzatorta, P., Tran, L.A., Schilter, B. y Grigorov, M. 2007. Integration of structure-activity relationship and artificial intelligence systems to improve in Silico prediction of Ames test mutagenicity. *J. Chem. Inf. Model.* 47: 34-38.

- Mendoza-Elos, M., Andrio-Enriquez, E., López-Benitez, A., Rodríguez-Guerra, R., Latournerie-Moreno, L. y Rodríguez-Herrera, S.A. 2006. Tasa de infección de la pudrición del tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía Mesoamericana*. 17 (1): 19-24.
- Merrill, A.H., Van Echten, G., Wang, E. y Sandhoff, K. 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-Acyltransferase and the novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. *J. Biol. Chem.* 268 (36): 27299-27306.
- Montiel-González, L., González-Flores, F., Sánchez-García, B.M., Guzmán-Rivera, S., Gámez-Vázquez, F.P., Acosta-Gallegos, J.A., Rodríguez-Guerra, R., Simpson-Williamson, J., Cabral-Enciso, M. y Mendoza-Elos, M. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición en cinco estados del centro de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23 (1): 1-7.
- Mustafayeva, K., Di Giorgio, C., Elias, R., Kerimov, Y., Ollivier, E. y De Méo, M. 2010. DNA-damaging, mutagenic, and clastogenic activities of gentiopicroside isolated from *Cephalaria kotschyi* Roots. *J. Nat. Prod.* 73: 99-103.
- Nogueira, N.P.A., Reis, P.A., Laranja, G.A.T., Pinto, A.C., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., Paes, M.C., Bastos, F.F., Bastos, V.L.F.C., Sabino, K.C.C. y Coelho, M.G.P. 2011. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *J. Ethnopharmacology*. 138 (2): 513-522.
- Peiretti-Uzal, D.A., Nazar-Lovera, M.C., Biasutti-Valenzano, C.A. y Giorda-Lerda, L.M. 2007. Susceptibilidad a *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg en la población de maíz MPB-FCA 856¹. *Rev. Agronomía Mesoamericana*. 18 (2): 171-176.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A. y Pavlovic, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Bull World Health Organization*. 77 (9): 754-766.

- Piloto-Ferrer, J., Vizoso-Parra, A., Ramos-Ruíz, A., García-López, A., Remigio-Montero, A., Vega-Hurtado, Y., Gonzáles-Sanabria, M.L., Rodríguez-Ferrada, C. y Carballo, C. 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogénicas en el CIDEM. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 8 (5): 428-434.
- Pino, P.O. y Lazo, F.J. 2010. Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Rev. Protección Vegetal. 22 (1): 34-43.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M. y Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecular Bioscience. 3: 582-586.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev. Iberoam. Micol. 25: 78-82.
- Prieto, Z., Fernández-Romero, R., Polo-Benites, E., Quijano-Jara, C., León-Incio, J., Villegas-Sánchez, L., Tirado-Pinedo, A., Vallejo-Rodríguez, R. y Gallardo-Bocanegra, J. 2005. Daño cromosómico en meristemos radiculares de *Allium cepa* por efecto de azida de sodio. Rebiol. 25 (1-2):31-36.
- Quintana-Obregón, E.A., Plascencia-Jatomea, M., Sánchez-Mariñez, R.I., Rosas-Burgos, E.C. y Cortez-Rocha, M.O. 2010. Inhibición del crecimiento radial "in vitro" de *Fusarium verticillioides* en presencia de quitosano. Rev. Iberoam. Polim. 11 (6): 386-391.
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen- Calleros, G. y Molina-Torres, J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. Agrociencia. 34 (2):207-215.
- Remigio-Montero, A.C., Pérez-Arnáez, G., Fernández-Esperón, N., Bada-Barro, A. M., Arteaga-Pérez M.E. y Mancebo-Rodríguez, A. 2001. Estudio genotóxico *in*

vivo de 6 extractos de plantas medicinales en células de médula ósea de roedores. Rev. Toxicol. 18: 75-78.

Reyneri, A. 2006. The role of climatic condition on micotoxin production in cereal. Vet. Res. Com. 30 (1): 87-92.

Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. y Van Schalkwyk, D.J. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology. 82: 353–357.

Romanazzi, G., Nigro, F.A., Ippolito, A., DiVenere, D. y Salerno, M. 2006. Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. J. Food. Sci. 67 (5): 1862-1867.

Rosas-Burgos, E.C., Cortez-Rocha, M.O., Cinco-Moroyoqui, F.J., Robles-Zepeda, R. E., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I. y Lares-Villa, F. 2009. Antifungal activity *in vitro* of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. World J. Microb. Biot. 25 (12): 2257-2261.

Rosas-Burgos, E.C., Cortez-Rocha, M.O., Plascencia-Jatomea, M., Moroyoqui, F.J., Robles-Zepeda, R.E., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I. y Lares-Villa, F. 2010. The effect of *Baccharis glutinosa* extract on the growth of mycotoxigenic fungi and fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ production. World J Microb Biot. 27 (5): 1025-1033.

Sanabria, A., López, S. y Gualdrón, R. 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Rev. Col. Cienc. Quim. Farm. 26:15-19.

Sánchez, D., Sanjuan, A., y Plasencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. J. Agric. Food Chem. 53 (22): 8565-8571.

Scott, P. M. 1993. Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.* 18: 257-270.

Sewram, V., Mshicileli, N., Shephard, G.S., Vismar, H.F., Rheeder, J.P. Lee, Y.W., Leslie, J.F. Marasas, W.F.O. 2005. Production of fumonisin B and C analogs by several *Fusarium* species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4861-4866.

Srinivasa, P.C. y Tharanathan, R.N. 2007. Chitin/chitosan- safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. *Food Reviews International.* 23: 53-72.

Suárez-Jiménez, G., Cortez-Rocha M.O., Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M. y Cinco-Moroyoqui, F.J. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B1 production. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25 (2): 134-142.

Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Van Schalkwyk, D.J. y Koch, K.R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium mycotoxins* in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. of Agric. and Food Chem.* 38:1900-1903.

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

Thobunluepop, P., Jatisatienr, C., Jatisatienr, A., Pawelzik, E. y Vearasilp, S. 2007. *In vitro* screening of the antifungal activity of plant extracts as fungicides against pathogenic seed borne fungi. *Acta Hort. (ISHS)* 837:223-228.

Urbina, J.M., Cortés, J.C.G., Palma, A., López, S.N., Zacchino, S.A., Enriz, R.D. Ribas, J.C. y Kouznetzov, V.V. 2000. Inhibitors of the fungal cell wall synthesis of 4-Aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds with inhibitory

activities on β (1-3) glucan and chitin synthases. *Bioorganic and Med. Chem.* 8: 691-698.

Vargas, I.A., Rosas, E.C., Cortez, M.O., Burgos, A. y Sánchez, R.I. 2010. Capacidad antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de cuatro plantas silvestres sobre hongos fitopatógenos y micotoxigénicos del maíz. Presentado en el VII Congreso del Noroeste, III Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo, Son. Noviembre 10-13.

Vargas-Arispuro, I., Reyes-Baez, R., Rivera-Castañeda, G., Martínez-Tellez, M.A. y Rivero-Espejel, I. 2005. Antifungal lignan from the creosote bush (*Larrea tridentata*). *Ind. Crop. Prod.* 22 (2):101-107.

Vesonder, R.F., Labeda, D.P. y Peterson, R.E. 1992. Phytotoxic activity of selected water-soluble metabolite of *Fusarium* against *Lemna minor* L. (Duckweed). *Mycopathologia*. 118: 185-189.

Voss, K.A., Gelineau-van Waes, J.B. y Riley, R.T. 2006. Fumonisin: current research trends in developmental toxicology. *Mycotoxin Research*. 22 (1): 61-69.

Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. y Merrill, A.H., Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 266: 14486-14490.

Zacchino, S., Rodríguez, G., Pezzenti, G., Giannin, F. y Enriz, R. 1998. *In vitro* studies on mode of action of antifungal 8.0.4'-neolignans occurring in certain species of *Virola* and related genera of *Myristicaceae*. *J. Ethnopharmacol.* 62: 35-41.