

1998-A

085583263

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**Efectividad Antibacterial y Antifúngica de Quitosan y *Larrea tridentata*  
contra Microorganismos que Afectan a Humanos y Productos Agrícolas**

BAJO LA MODALIDAD DE TESIS

Presentada Como Requisito Para Obtener el Título de:

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Presenta:

**MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco

Octubre de 2005



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y  
Agropecuarias

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura  
en Biología*

225/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARCELA HERNÁNDEZ SUÁREZ  
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título : " **Efectividad antibacterial y antifúngica de quitosan y *Larrea tridentata* contra microorganismos que afectan a humanos y productos agrícolas**" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **DR. R. HUGO LIRA SALDIVAR** y el Asesor es: **DR. ARTURO OROZCO BAROCÍO**.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 29 de Julio del 2005.

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**DRA. ANA ISABEL RAMÍREZ QUINTANA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

C.c.p. **DR. R. HUGO LIRA SALDIVAR** - Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya  
Presidente del Comité de Titulación  
División de Ciencias Biológicas  
CUCBA  
Presente

Por este medio nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción Tesis, con el título: **“Efectividad Antibacterial y Antifúngica de Quitosan y *Larrea tridentata* contra Microorganismos que Afectan a Humanos y Productos Agrícolas”**, que realizó la pasante **Marcela Hernández Suárez** con número de código **85583263**, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

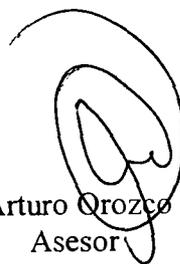
Sin otro particular, reciba usted con un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dr. R. Hugo Lira Saldivar  
Director

Sinodales



Dr. Arturo Orozco Barocio  
Asesor

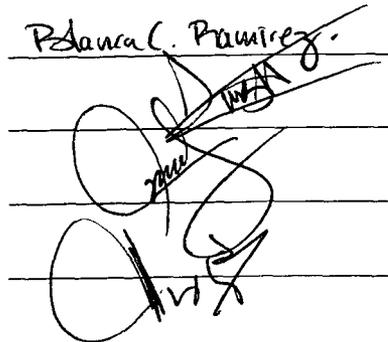
Firmas

M.C. Blanca Catalina Ramírez Hernández

M.C. Luis Villaseñor Ibarra

Q.F.B. Rosa María Domínguez Arias

M.C. Margarita Bonilla Moreno



Las Agujas, Nextipac Zapopan Jal., 10 de Octubre de 2005

## DEDICATORIA

*A mis padres: Amparo y Antonio con cariño y respeto.*

*A mis hermanos: Genaro, Abraham, Katalina, Alfonso, Diana y Juan Carlos, por su cariño y apoyo.*

*A mi esposo: Herman, por el amor y apoyo que me has dado siempre.*

*A mi querido hijo: Luis Herman, porque eres lo principal para mí.*

*A Lizeth, espero que ser un buen ejemplo para ti, querida hermana.*

*A Fanny, porque siempre haz sido una niña especial.*

*A todos mis sobrinos con mucho cariño.*

*A la Sra. Ma. Guadalupe Ramírez, por su apoyo comprensión.*

*A mi maestro y amigo José Luis Navarrete Heredia.*

## AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**, por darme las herramientas necesarias para mi formación profesional.

Al **Dr. Hugo Lira Saldívar**, por la confianza que depositó en mí para la realización de este trabajo, por su amistad y apoyo. Además de ser un ejemplo de trabajo y dedicación; gracias mi querido Doctor.

Al **Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA)**, por haberme dado la oportunidad y todo el apoyo necesario para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Arturo Orozco Barocio**, por su colaboración y disposición para asesorarme en este trabajo y durante mi formación académica.

A mis evaluadores: **M.C. Margarita Bonilla, Q.F.B. Rosa Ma. Domínguez, M.C. Blanca Ramírez y M.C. Luis Villaseñor** por su disposición y ayuda.

A **Biol. Claudia Luquin**, por tu ayuda además de la amistad que siempre me diste.

A todo el comité de titulación del **CUCBA**, por las facilidades dadas para la realización de mis trámites a distancia.

A los **Investigadores del CIQA** que me apoyaron durante mi estancia en este centro: **M.C. Aída García, M.C. Federico Cerda, M.C. Luis Villarreal** y a todo el personal del Laboratorio Microbiología.

A todos mis maestros y amigos.

A todos los que de una u otra forma influyeron para que este objetivo se realizara.

**¡Muchas Gracias!**

## ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Revisión de literatura</b> .....	4
<b>Generalidades del quitosan</b> .....	4
Potencial industrial del quitosan .....	5
Evidencias de la actividad antifúngica del quitosan .....	5
Bioensayos <i>in vitro</i> .....	5
Bioensayos <i>in vivo</i> .....	7
Hipótesis sobre los diversos mecanismos de acción del quitosan .....	8
El quitosan como inductor de defensas bioquímicas de en el hospedero.....	8
Formación de barreras estructurales de defensa en las plantas .....	9
Conservación de frutas y hortalizas durante el almacenamiento .....	9
Control de las enfermedades poscosecha .....	9
Efecto del quitosan en la calidad de los frutos .....	10
<b>Generalidades de la gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>)</b> .....	11
Distribución geográfica .....	12
Descripción botánica .....	13
Constituyentes fitoquímicos de la resina .....	14
Propiedades antifúngicas <i>in vitro</i> de <i>Larrea tridentata</i> .....	17
Efecto bactericida, nematocida y antiviral de <i>L. tridentata</i> y sus derivados .....	19
Propiedades de <i>Larrea tridentata</i> observadas <i>in vivo</i> .....	22
<b>Importancia de las bacterias</b> .....	23
Importancia médica y económica .....	24
<i>Escherichia coli</i> .....	24
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
<i>Pseudomona</i> .....	24
<i>Salmonella</i> .....	25

<i>Enterococcus</i> .....	25
<i>Proteus</i> .....	25
<i>Klebsisella</i> .....	26
<b>Morfología Microscópica de las Bacterias Estudiadas</b> .....	26
Introducción a la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	26
<i>Escherichia coli</i> .....	27
Patogenia y signos clínicos .....	28
Aislamiento e identificación .....	28
Asociación con alimentos .....	28
<i>Salmonella</i> .....	29
Patogenia y signos clínicos .....	31
Aislamiento e identificación .....	31
<i>Klebsiella</i> .....	31
<i>Pseudomona</i> .....	33
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	33
Aislamiento e identificación .....	34
<i>Proteus</i> .....	35
<i>Enterococcus</i> .....	35
<i>Enterococcus faecalis</i> .....	36
Asociación con alimentos .....	37
Aislamiento e identificación .....	37
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
Características .....	38
Patogenia y signos clínicos .....	39
Asociación en alimentos .....	40
Aislamiento e identificación .....	40
<b>Generalidades de Hongos Productores de Toxinas</b> .....	41
<i>Aspergillus</i> .....	41

Micotoxinas en los alimentos .....	43
Toxinas producidas por el género <i>Aspergillus</i> .....	44
Efecto de las aflatoxinas en la salud humana y animal .....	47
Asociación de las aflatoxinas con los alimentos .....	48
Patogenia y signos clínicos .....	49
<b>Hipótesis</b> .....	50
<b>Objetivo General</b> .....	50
<b>Objetivos Particulares</b> .....	50
<b>Materiales y métodos</b> .....	52
Colecta de follaje y cribado de las hojas secas .....	52
Preparación de los extractos .....	52
Determinación de la concentración del ingrediente activo contenido en la resina de gobernadora .....	53
Microorganismos empleados .....	54
Tratamientos con extractos de <i>L. tridentata</i> o gobernadora .....	54
Preparación de los tratamientos de quitosan (Q) .....	54
Tratamientos con mezclas de quitosan- <i>Larrea</i> .....	56
Tratamientos aplicados contra las bacterias .....	57
Preparación de los medios de cultivo .....	59
Siembra de los hongos .....	59
Siembra de las bacterias .....	60
Análisis estadístico de los resultados .....	60
<b>Resultados y Discusión</b> .....	61
Efectividad de los extractos de <i>Larrea tridentata</i> contra bacterias Gram negativas y Gram positivas .....	62
Efecto antibacterial de las soluciones de quitosan .....	64
Efecto antibacterial de las mezclas quitosan / <i>Larrea tridentata</i> .....	66
Inhibición de <i>Aspergillus niger</i> por los extractos de <i>L. tridentata</i> .....	66

Efecto inhibitorio de los extractos de <i>L. tridentata</i> contra <i>Aspergillus flavus</i> .....	69
Efecto inhibitorio de los extractos de <i>L. tridentata</i> contra <i>A. parasiticus</i> .....	70
Efecto inhibitorio del quitosan sobre los hongos del género <i>Aspergillus</i> .....	73
Actividad inhibitoria de las mezclas quitosan/ <i>Larrea</i> .....	74
Comparación del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> vs. el fungicida clorothalonil..	75
<b>Conclusiones</b> .....	<b>78</b>
<b>Literatura citada</b> .....	<b>80</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>88</b>
Equipo y materiales de laboratorio .....	89
Figura 1. Cromatograma del estándar de NDGA .....	91
Figura 2. Cromatograma de la resina de <i>L. tridentata</i> extraída con cloroformo .....	92
Figura 3. Cromatograma de la resina de <i>L. tridentata</i> extraída con metanol .....	93
Figura 4. Cromatograma de la resina de <i>L. tridentata</i> extraída con etanol .....	94
Figura 5. Cromatograma de la resina de <i>L. tridentata</i> extraída con hexano .....	95
Resumen de la ponencia presentada en el XVII Congreso Internacional de Botánica realizado en Viena, Austria, Julio de 2005; con base en los resultados de este trabajo .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la quitina, quitosan y celulosa.....	4
2. Representación esquemática de las áreas en los desiertos Sonorense y Chihuahuense, donde se encuentran poblaciones naturales de <i>L. tridentata</i> en el norte de México y sur de los Estados Unidos.....	12
3. Follaje de un arbusto de <i>L. tridentata</i> donde se aprecian algunas características distintivas.....	14
4. Corte transversal de un foliolo de <i>Larrea tridentata</i> que muestra la resina contenida en las células epidermales.....	14
5. Estructura química del ácido nordihidroguaiaretico (NDGA).....	16
6. Morfología microscópica de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .....	27
7. Morfología microscópica del género <i>Salmonella</i> .....	30
8. Método tradicional para el aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> .....	32
9. Morfología microscópica de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	33
10. Morfología microscópica de <i>Proteus vulgaris</i> .....	34
11. Morfología microscópica de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	36
12. Morfología microscópica del género <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
13. Microfotografía del conidioforo y conidias de <i>Aspergillus flavus</i> .....	42
14. Cadenas de conidias de <i>Aspergillus parasiticus</i> .....	42
15. Mecanismo de intoxicación por micotoxinas en hombres y animales .....	44
16. Semillas de maíz contaminadas por <i>Aspergillus flavus</i> .....	45
17. Semillas de cacahuete contaminadas por <i>Aspergillus flavus</i> .....	45
18. Estructura química de las aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> .....	47
19. Representación esquemática mostrando la inhibición <i>in vitro</i> de <i>E. faecalis</i> y <i>E. coli</i> a 125 ppm con el extracto etanólico al 30 % de IA.....	63
20. Cajas petri con crecimiento de <i>E. Coli</i> lo que indica la falta de efectividad antibacterial del quitosan.....	65
21. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> a tres concentraciones de IA contra el hongo <i>A. niger</i> .....	68

22. Comparación del efecto inhibitorio de tres extractos (etanólico, metanólico y sódico) de <i>Larrea tridentata</i> al 30% de IA contra el hongo <i>A. niger</i> .....	68
23. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> a tres concentraciones de ingrediente activo contra el hongo <i>A. flavus</i> .....	69
24. Comparación del efecto inhibitorio de tres extractos de <i>L. tridentata</i> al 30% de ingrediente activo contra el hongo <i>A. flavus</i> .....	70
25. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> a tres concentraciones de IA contra el hongo <i>A. parasiticus</i> .....	71
26. Comparación del efecto inhibitorio de tres extractos de <i>L. tridentata</i> al 30% de IA contra el hongo <i>A. parasiticus</i> .....	71
27. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> al 30% de IA contra tres hongos del género <i>Aspergillus</i> .....	72
28. Comparación del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de quitosan contra tres hongos del género <i>Aspergillus</i> .....	73
29. Comparación del efecto inhibitorio entre el fungicida sintético clorothalonil y el extracto etanólico de <i>L. tridentata</i> al 30% de IA contra los hongos <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> .....	76

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Principales constituyentes fitoquímicos de <i>L. tridentata</i> .....	15
2. Dosis de extractos de <i>L. tridentata</i> a tres concentraciones de ingrediente activo aplicados contra <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> y <i>A. niger</i> .....	55
3. Concentraciones de soluciones de quitosan aplicadas contra <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> y <i>A. parasiticus</i> .....	56
4. Concentraciones de las mezclas quitosan/ <i>Larrea</i> aplicadas contra los hongos <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> y <i>A. niger</i> .....	57
5. Concentraciones de extracto de <i>L. tridentata</i> aplicadas contra las bacterias .....	57
6. Concentraciones de quitosan aplicadas contra las bacterias .....	58
7. Concentraciones de los bioproductos quitosan/ <i>Larrea</i> aplicados <i>in vitro</i> contra siete cepas bacterianas .....	58
8. Determinación de la concentración de NDGA contenido en la resina de <i>L. tridentata</i> mediante la técnica de HPLC.....	61
9. Efecto de diferentes concentraciones (ppm) del extracto etanólico al 30% de IA en el crecimiento <i>in vitro</i> de siete cepas bacterianas.....	63
10. Efecto de diferentes concentraciones (ppm) del extracto metanólico al 30% de IA en el crecimiento <i>in vitro</i> de siete cepas bacterianas.....	64
11. Efecto del quitosan en el crecimiento <i>in vitro</i> de siete cepas bacterianas.....	65
12. Efecto de las mezclas quitosan/ <i>Larrea</i> en el crecimiento <i>in vitro</i> de siete cepas bacterianas.....	66
13. Inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>A. parasiticus</i> con mezclas a diferentes concentraciones de quitosan/ <i>Larrea</i> al 30% de IA.....	74

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, después de los insectos los hongos son los principales causantes en la reducción de la calidad de los cereales almacenados. En países desarrollados, donde los insectos y roedores son controlados eficazmente, los hongos causan la mayoría de las pérdidas durante el almacenamiento, además ocasionan una baja en la viabilidad o poder de germinación de la semilla, decoloración en el grano, pudrición y producción de micotoxinas. Las toxinas que producen algunas especies de estos hongos son de mucha importancia debido a su alto potencial para producir enfermedades en humanos y animales. Aunque 15 especies de *Aspergillus* y varias de *Penicillium*, producen aflatoxinas, solamente *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* han sido consistentemente considerados como productores de aflatoxinas (González, 1995).

La presencia de aflatoxina en alimentos ingeridos por los animales, es muy dañina, no solamente para el animal, ya que también sus residuos pueden aparecer en la carne, en los huevos y pueden ser excretados en la leche. Hay evidencias de que si las aflatoxinas se encuentran en los alimentos, son causa de enfermedades en seres humanos principalmente en África, India, Asia y Filipinas ([www.aflatoxin.info/food\\_safeti.asp](http://www.aflatoxin.info/food_safeti.asp)).

Los patógenos antes mencionados son controlados básicamente con pesticidas sintéticos; sin embargo, el uso de fungicidas tradicionales empleados para el control de estas y otras enfermedades ha tenido graves consecuencias en la salud humana y el medio ambiente, así como en el desarrollo de resistencia por los fitopatógenos a estos productos sintéticos; lo que ha ocasionado un inevitable incremento en las dosis empleadas para su control y en la contaminación ambiental (Baker *et al.*, 2002).

Las propiedades antimicrobianas de extractos de varias plantas y sus propiedades fungicidas han sido probadas y validadas *in vitro* e *in vivo* en diferentes cultivos agrícolas. La formación y germinación de esporas, desarrollo micelial e infección, puede ser inhibido por extractos de plantas. Por lo tanto, los productos naturales de origen vegetal pueden contribuir a la sustitución de agroquímicos sintéticos, haciendo posible la

producción de alimentos con bajos residuos de pesticidas inorgánicos tradicionales (Wedge, *et al.*, 2003).

Una buena alternativa lo constituyen los pesticidas orgánicos con base en compuestos naturales, ya que son biodegradables y desaparecen rápidamente del medio ambiente después de ser aplicados en el campo. Además, la demanda de pesticidas orgánicos va creciendo significativamente, así que a corto y mediano plazo, el problema fundamental no será la falta de demanda sino una oferta insuficiente de bioproductos de bajo impacto ambiental y amigables con los ecosistemas.

Es importante señalar que las normas internacionales para la protección vegetal excluyen en los criterios de certificación de inocuidad, a una parte importante de los agroquímicos sintéticos utilizados en el agro Mexicano. Simultáneamente la Unión Europea y los Estados Unidos avanzan en programas nacionales de agricultura orgánica, en los cuales el eje tecnológico está dominado por los biopesticidas que permiten el control de los fitopatógenos, ayudando a incrementar la producción y asegurando la inocuidad alimentaria (Montes-Belmont *et al.*, 2000).

Por otra parte, la mayoría de los pesticidas orgánicos e inorgánicos son importados a nuestro país, siendo la fuga de divisas y dependencia extranjera bastante significativa, a pesar de que es factible desarrollar y producir agroquímicos orgánicos de bajo impacto ambiental con productos derivados de animales y plantas abundantes en México, los cuales tienen un enorme potencial y hasta la fecha son poco aprovechados. (Rodríguez, 2000).

La gobernadora (*Larrea tridentata*), es un arbusto perenne de los desiertos Chihuahuense, Sonorense y Mojave de Norteamérica, sus hojas contienen una resina espesa que se comporta como un antitranspirante debido a que forma una barrera que disminuye la transpiración. Los metabolitos secundarios de la resina (entre los que destacan fenoles, lignanos y flavonoides), son defensas bioquímicas para repeler la

agresión de animales herbívoros, hongos y microorganismos, ya que no se conocen plagas, enfermedades o animales que ataquen a esta planta.

Numerosos estudios han demostrado que los extractos de gobernadora tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica. Algunos bioensayos con microorganismos que atacan a humanos han indicado que más de 45 bacterias son susceptibles a la resina de *L. tridentata* o sus constituyentes, así como 10 levaduras, nueve hongos y tres parásitos intestinales (Lira-Saldivar *et al.*, 2003).

Por otro lado, el quitosán es un producto orgánico de origen animal, el cual es un biopolímero no tóxico, que se obtiene por desacetilación de la quitina, siendo considerado el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa; es el principal componente del exoesqueleto de crustáceos como cangrejos, langostas, jaibas y camarones (Roller y Covill, 1999).

Debido a que la biodegradación de la quitina es un proceso muy lento, la acumulación de grandes cantidades de desperdicios de conchas de crustáceos es un gran problema en la industria procesadora de mariscos (Shahidi *et al.*, 1999). Este subproducto orgánico animal ha venido recibiendo mucha atención por sus aplicaciones comerciales en la industria biomédica, química, electrónica, alimentaria y más recientemente en la agricultura. Debido a que el quitosán ha demostrado tener acción inhibitoria contra microorganismos fitopatógenos como bacterias, hongos, levaduras y nemátodos; esto lo hace un biopolímero muy viable para elaborar agroquímicos naturales con gran potencial en los programas de agricultura orgánica, mismos que están orientados a buscar la inocuidad agrícola, tanto en México como en todo el mundo.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Generalidades del quitosan

La quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza; se encuentra presente en la cutícula de los crustáceos, exoesqueleto de artrópodos y en las paredes celulares de los hongos (Figura 1). Está muy asociada con sales inorgánicas, proteínas, pigmentos y lípidos, por lo que el proceso convencional de extracción por métodos químicos incluye una desproteización con álcalis, seguido de una desmineralización con ácidos diluidos y por último se eliminan los lípidos presentes mediante solventes orgánicos, aunque este último paso se considera opcional (Matsumoto *et al.*, 1996).

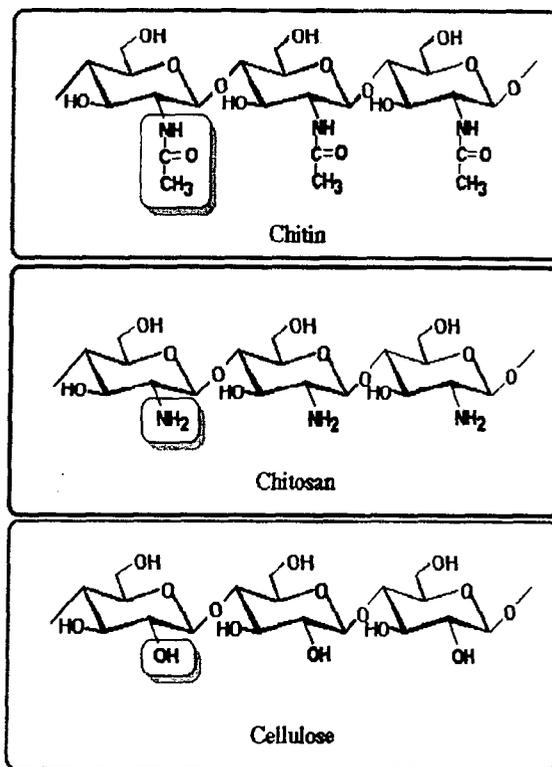


Figura 1. Estructuras químicas de la quitina, quitosan y celulosa

La quitina desacetilada se conoce como quitosan, polímero constituido fundamentalmente por unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) con uniones  $\beta$  (1-4). El quitosan se comporta como un polielectrolito lineal a pH ácido, posee una alta densidad de cargas, tiene la capacidad de quelatar iones metálicos (Fe, metales pesados, etc.) y de adherirse fácilmente a superficies cargadas negativamente. Este compuesto natural es biodegradable, no tóxico, y sus cargas positivas le confieren propiedades biológicas y fisiológicas únicas (Sandford, 1989).

### **Potencial industrial del quitosan**

El quitosan tiene un gran potencial industrial, destacándose su uso en la industria de los cosméticos: lociones, aditivos para el cabello, cremas faciales y para el cuerpo (Lang y Clausen, 1989); también se emplea como preservativo en productos alimenticios aprovechando sus características antimicrobianas, así como antioxidante (Shahidi *et al.*, 2001). En el área biotecnológica ha tenido diferentes usos, entre los que figuran la inmovilización de células y enzimas; y la posibilidad de actuar como un excelente agente floculante (Sandford y Hutchings, 1987).

En farmacología y medicina se viene empleando el quitosan como fibra dietética y para elaborar medicamentos; en la agricultura se ha reportado su utilidad como modificador de suelos y fungicida, entre otros usos. Un uso muy importante en poscosecha de productos agrícolas ha sido su aplicación en forma de películas o cubiertas de frutos, con la finalidad de conservarlos frescos y contribuir a extender su vida de anaquel (Lafontaine y Benhamou, 1996).

### **Evidencias de la actividad antifúngica del quitosan**

#### **Bioensayos *in vitro*.**

La actividad antifúngica del quitosan se ha evaluado en diferentes especies de hongos fitopatógenos, los resultados derivados de los estudios *in vitro* básicamente han estado relacionados con el crecimiento micelial, la esporulación, la germinación y la morfología de las hifas y esporas. Los efectos obtenidos han sido diferentes, algunos autores los relacionan con las concentraciones de quitosan aplicadas, otros con el grado

de polimerización de la cadena de glucosamina, el nivel de desacetilación e inclusive con el tiempo de exposición del polímero en la célula fúngica. Cepas de *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Rhizopus stolonifer* aisladas de papaya (*Carica papaya*), presentaron inhibición del crecimiento micelial (más del 50%) a concentraciones de quitosan de 1.5% en adelante, observándose una correlación directa entre la concentración de quitosan y la inhibición del crecimiento. La esporulación mostró un comportamiento similar, a excepción de *P. digitatum*, la cual se estimuló en presencia de quitosan (Bautista-Baños *et al.*, 2004a).

También se reportan cambios en la morfología de las esporas (área, longitud y forma) de acuerdo al tratamiento y/o tiempo de incubación, comparadas con las esporas no tratadas. Por otro lado, concentraciones bajas de quitosan (0.5 y 0.2%) inhibieron marcadamente el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* aislado de durazno y kiwi. En contraste, lo reportado por Cheah *et al.*, (1997), indica que *Sclerotinia sclerotiorum* presentó inhibición de su crecimiento radial sólo con altas concentraciones de quitosan (4%). Otros estudios sugieren que el quitosan puede tener efecto fungicida o fungistático dependiendo de la concentración a la que se utilice.

Por ejemplo, el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya se inhibió totalmente con concentraciones de quitosan de 2.5 y 3.0% durante 7 días de incubación, mientras que a 0.5 y 1.5% el hongo comenzó a crecer al segundo y cuarto día, respectivamente. Además, comprobó una reducción en la esporulación, así como cambios morfológicos en los conidios (área y factor de forma elíptica) a concentraciones de quitosan superiores a 1.5% (Bautista-Baños *et al.*, 2003). Sin embargo, a esa misma concentración de quitosan (1.5%) se le atribuye un efecto fungicida en el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *C. gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer*, lo cual es asociado al grado de desacetilación del quitosan (El Ghaouth *et al.*, 1992c).

Por otra parte, Hirano y Nagao (1989) encontraron que el crecimiento micelial de 18 hongos fitopatógenos se inhibió en presencia de quitosan dependiendo del grado de polimerización de la cadena. Adicionalmente, en los hongos *B. cinerea* y *R. stolonifer* se ha observado la salida de aminoácidos y proteínas del interior de la célula, manifestándose este efecto durante la hora siguiente de aplicarse el tratamiento. Observaciones microscópicas reflejaron que las hifas redujeron su tamaño y mostraron una forma inusual, evidenciándose un crecimiento aéreo anormal de las mismas. No obstante, la germinación de las esporas y la elongación del tubo germinativo sólo se afectaron con altas concentraciones (6 mg/ml) de quitosan (El Ghaouth *et al.*, 1992a).

### **Bioensayos *in vivo*.**

En el área del manejo de poscosecha en frutas y hortalizas son escasos los estudios realizados donde se reportan los efectos que suceden a partir de la interacción quitosan-fruto. Así por ejemplo, en frutos de manzana tratados con quitosan al 1.2% se observó que los conidios de *B. cinerea* presentaron una forma anormal, inhibiéndose la germinación de los mismos y el crecimiento micelial (Du *et al.*, 1998).

Estudios realizados con el apoyo de la microscopia de transmisión, mostraron cambios intraestructurales y citoquímicos en la interacción quitosan-*B. cinerea* en pimiento morrón, encontrándose que las hifas tratadas con quitosan presentaban varios grados de desorganización celular, lo cual se manifestó al perder la consistencia de la célula, así como la degradación del protoplasma; mientras que en los tratamientos donde no se aplicó este biopolímero las hifas conservaron su apariencia normal (El Ghaouth *et al.*, 1994). En estudios posteriores se analizaron otros aspectos bioquímicos y citoquímicos, corroborándose que el quitosan induce severos daños citológicos en las hifas invasoras, similares a los reportados anteriormente (El Ghaouth *et al.*, 1997).

## **Hipótesis sobre los diversos mecanismos de acción del quitosan.**

Los mecanismos por los cuales se presenta el efecto antifúngico del quitosan no han sido del todo esclarecidos, sin embargo, existen hipótesis fundamentales que contribuyen a explicar este efecto. A pesar de que los estudios realizados en este sentido, son atribuidos por los autores a diferentes causas (concentración, polimerización, acetilación, tiempo de incubación, etc.) existe un factor común alrededor del cual tratan todas las explicaciones y es el relacionado con la naturaleza policatiónica de la molécula de quitosan, la cual le confiere propiedades biológicas y fisiológicas únicas.

### **1. El quitosan como inductor de respuestas bioquímicas de defensa en el hospedero.**

El uso del quitosan como inductor de resistencia a enfermedades puede ser significativo si consideramos la naturaleza sistémica y persistente de las enzimas de defensa en los tejidos de las plantas en respuesta a la presencia del quitosan, lo cual puede ser importante en retardar la reanudación de una infección latente que típicamente comienza a activarse cuando la resistencia de los tejidos declina. Una de las tendencias actuales en el control de las enfermedades poscosecha es la de “ayudar” al producto hortofrutícola a reactivar sus propios mecanismos de defensa (Bautista-Baños y Barrera-Necha, 2001).

La inducción de resistencia promete ser una nueva tecnología para el control de las enfermedades poscosecha. En la última década, ha cobrado auge el interés por inducir la resistencia natural a enfermedades en productos hortofrutícolas una vez que son cosechados. Se considera que son cuatro los factores que fundamentalmente influyen en esta temática: Los requerimientos nutricionales del patógeno, la activación de los factores de patogenicidad de los hongos (ambos factores se incrementan en los tejidos maduros), los compuestos antifúngicos existentes y el potencial para inducirlos, se sabe que ambos factores tienden a suprimirse en frutos maduros (Terry y Joyce, 2004).

## **2. Formación de barreras estructurales de defensa en las plantas.**

La formación de barreras estructurales de defensa es un proceso muy común que tiene lugar en respuesta a la invasión de microorganismos patógenos. En los frutos también se ha observado la formación de barreras estructurales que limitan la disponibilidad de nutrientes al patógeno, además de impedirles físicamente avanzar hacia el interior de los tejidos. El Ghaouth *et al.* (1994) estudiaron el efecto del tratamiento del quitosán en el proceso de infección de *B. cinerea* en pimiento morrón, y observaron que en el tejido no tratado e inoculado, la colonización del hongo se realizó rápidamente, causando la degradación de las paredes del hospedero, sin embargo, en los tejidos tratados con quitosán el crecimiento de las hifas se restringió al sitio de infección.

Los autores atribuyeron este efecto en los tejidos donde se aplicó quitosán a la formación de deposiciones en las paredes celulares y al llenado de los espacios intercelulares con material fibrilar. Estudios posteriores permitieron confirmar este efecto, dado que el tratamiento con quitosán estimuló la formación de barreras estructurales en pimiento morrón, siendo la observación más común el adelgazamiento de la pared celular del hospedero, la formación de protuberancias celulares y el llenado de los espacios intercelulares con un material de naturaleza fibrilar (El Ghaouth *et al.*, 1997).

### **Conservación de frutas y hortalizas durante el almacenamiento:**

#### **Control de las enfermedades poscosecha**

El uso de quitosán en el control de enfermedades de poscosecha se atribuye a la propiedad de formar películas que protegen la superficie de los frutos y vegetales, regulando el intercambio de gases y la humedad; la actividad fungicida y/o fungistática y a la capacidad de inducir una respuesta de resistencia en los tejidos vegetales (Wilson *et al.*, 1994).

Actualmente, el quitosan también se ha aplicado a los frutos como tratamiento individual o combinado con tratamientos hipobáricos (baja presión); con extractos vegetales o con antagonistas microbianos (bacterias o levaduras), sin embargo, los resultados obtenidos no han superado los efectos de la aplicación del quitosan de manera individual (Romanazzi *et al.*, 2003).

En el caso de papayas tratadas con quitosan al 1.5% se detectó un menor porcentaje de infección y menor índice de severidad al ser inoculadas con *C. gloesporioides*, sin embargo, al combinarse el quitosan con extractos vegetales no se observó efecto sinérgico (Bautista-Baños *et al.*, 2003). De manera similar, la combinación de quitosan (0.2% glycolquitosan) con el antagonista microbiano *Candida saitoana*, no repercutió favorablemente en el control de la pudrición de manzanas y cítricos (El Ghaouth *et al.*, 2000).

### **Efecto del quitosan en la calidad de los frutos**

De manera general, se puede señalar que el recubrimiento de los frutos con diferentes películas ha sido una técnica que ha dado buenos resultados en la conservación de los mismos. Las películas elaboradas con polisacáridos han sido muy utilizadas y dentro de ellas destaca el uso del quitosan, mostrando un efecto positivo en la calidad de los frutos (buena viscosidad, propiedades emulsificantes, etc.). Se han realizado diversos estudios enfocados a evaluar la calidad de los frutos, sin embargo, son escasos los trabajos que abordan el aspecto sensorial (Du *et al.*, 1997).

El quitosan permite prolongar la vida media de frutos y vegetales al formar una capa semipermeable que regula el intercambio de gases y reduce las pérdidas por transpiración. Este efecto se ha reportado en numerosos productos hortofrutícolas tales como fresas, manzanas, tomates y pimiento morrón, entre otros. En el proceso de maduración se ha encontrado que el quitosan interviene en la reducción de los niveles de etileno y CO<sub>2</sub> en manzanas, pepinos, pimientos, etc. (El Ghaouth *et al.*, 1991).

En otros parámetros relacionados con la calidad de los frutos también se ha evidenciado un efecto positivo al aplicar quitosan, observándose que disminuye la pérdida de peso, aumenta la firmeza, la acidez de los frutos, además el contenido de sólidos solubles totales tiende a mantenerse o incrementarse (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

### **Generalidades de la gobernadora (*Larrea tridentata*)**

Las zonas áridas representan un gran potencial porque guardan una riqueza basada no tanto en su densidad, como en su especialización biológica, donde la flora y la fauna son el producto de miles de años de adaptación fisiológica para su sobrevivencia. Un caso típico de estas condiciones lo representa la gobernadora (*L. tridentata*) de la familia *Zygophyllaceae*. Esta especie perenne es la más ampliamente distribuida en las zonas áridas de los desiertos Mojave, Sonorense y Chihuahuense (Barbour, 1969). Comúnmente se le conoce en México con el nombre de gobernadora por su dominancia en las grandes extensiones de las zonas áridas del norte de México. Pero también se le conoce como sonora, tasajo, jarilla y hediondo o hediondilla por el peculiar olor que tiene, sobre todo después de una lluvia (Brinker, 1993).

Las hojas de este arbusto xerófito están envueltas en una gruesa capa de resina que es producida por tricomas glandulares durante el desarrollo de las hojas y puede llegar a formar parte del 20% del peso seco de las hojas o más (Lira-Saldivar *et al.*, 2003b). La resina tiene la propiedad de hacer menos digestivo el follaje, de manera similar al efecto que producen los taninos (Rhoades, 1977), también se comporta como un antitranspirante ideal debido a que forma una barrera en la superficie de las hojas que disminuye más la transpiración que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> (Meinzer *et al.*, 1990; González-Coloma *et al.*, 1994).

Se considera que la resina funciona como un filtro contra la radiación solar UV y que protege a la planta contra el herbivorismo de insectos y animales (Barbour *et al.*, 1977; Downum *et al.*, 1988). Las hojas de *L. tridentata* están siempre verdes durante los meses del año sin lluvia, época en que son pocos los recursos vegetales que pueden

encontrar insectos y animales, sin embargo, el herbivorismo en este arbusto es muy limitado, esto se debe probablemente a los metabolitos secundarios como los biopolímeros fenólicos y el ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) que se encuentran presentes en la resina producida en hojas y tallos, los cuales resultan ser defensas bioquímicas para repeler el ataque de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos (Rundel *et al.*, 1994).

### Distribución geográfica.

*L. tridentata* domina aproximadamente 17.5 millones de hectáreas desde el oeste de Texas hasta el sur de California en los Estados Unidos (Duisberg, 1952). Su rango en el desierto Mojave va desde la parte sur de California y Nevada a la parte central de Arizona y Nuevo México, limitado por heladas invernales o lluvias excesivas de invierno. En la República Mexicana, la gobernadora se encuentra en parte del desierto Sonorense, incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur y Sonora; y en el desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí y Durango. Se estima que el 25% del territorio nacional está cubierto con este arbusto de las zonas áridas (Lira-Saldívar, 2003).

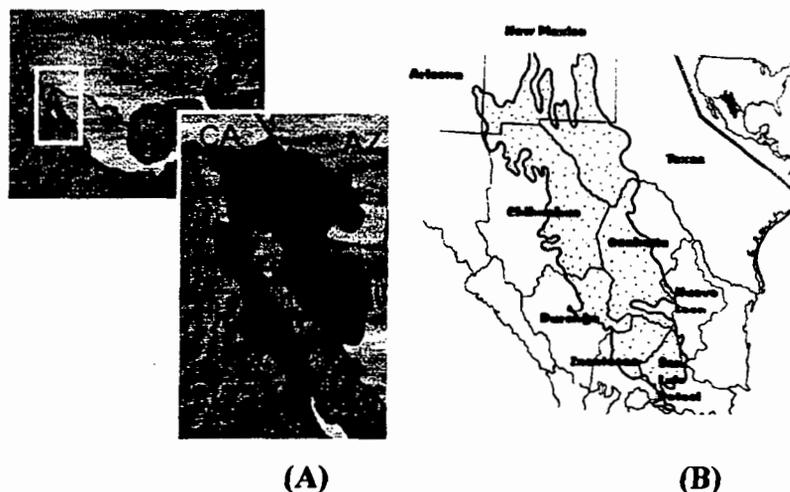


Figura 2. Representación esquemática de las áreas en los desiertos Sonorense (A) y Chihuahuense (B), donde se encuentran poblaciones naturales de *Larrea tridentata* en el norte de México y sur de los Estados Unidos

Este arbusto xerófito crece bien en planicies secas y mesas, habitando colinas y declives y en varios tipos de suelos, excepto arcillosos, salinos o graníticos (Shreve y Wiggins, 1964). Sus poblaciones naturales ampliamente distribuidas en áreas generalmente consideradas como improductivas, han conducido a hacer estudios de su potencial valor como alimento para ganado.

### **Descripción botánica.**

*L. tridentata* es un arbusto perenne xerófito siempre verde. Su edad puede exceder los 100 años, aunque algunas plantas pueden sobrevivir cientos o miles de años a través de reproducción vegetativa asexual, ya que las raíces producen brotes o retoños que después se convierten en nuevas plantas (Barbour, 1969). La edad se determina por el tamaño de la corona radicular. La raíz crece solo cerca de 170 cm hacia abajo, pero se ramifica hasta más de 4 metros lateralmente (Brinker, 1993). El tamaño de la planta varía de 0.5 a 4 m de altura dependiendo de la lluvia de invierno o verano, no hay un tallo principal, pero las ramas gruesas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotómica lateralmente (Coyle y Roberts, 1975).

Las hojas son pequeñas y bifoliadas, de un verde oscuro a verde amarillento con cutículas gruesas y una capa resinosa, tienen pecíolos cortos y crecen opuestas en las ramas. Las flores son amarillas con cinco pétalos, usualmente aparecen al final del invierno o a principios de primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia; crecen cerca de las terminaciones de los retoños jóvenes. Los frutos son pequeños (4 a 7 mm de diámetro), tienen una cubierta vellosa (Figura 3) y contienen cinco semillas, las cuales son transportadas por el viento y la lluvia (Shreve y Wiggins, 1964; Coyle y Roberts, 1975).



Figura 3. Follaje de un arbusto de *L. tridentata* donde se aprecian algunas características distintivas de las hojas bifoliadas, flores y los frutos con su cubierta vellosa.

### Constituyentes fitoquímicos de la resina

Los principales compuestos en la resina de *L. tridentata* que han sido hasta ahora reportados en la literatura son muy numerosos, sin embargo, un resumen de los más importantes se presentan en el Cuadro 1. En la resina de gobernadora destacan los lignanos fenólicos por su mayor contenido en base al peso seco del follaje, seguidos por flavonoides, saponinas, aminoácidos y minerales que se encuentran en la resina producida en las células cercanas a la epidermis superior e inferior de las hojas (Figura 4).

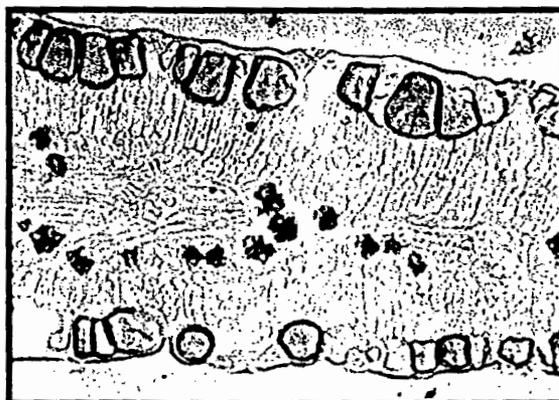


Figura 4. Corte transversal de un foliolo de *Larrea tridentata* que muestra la resina contenida en las células epidermales del haz y envés (Tomado de Lira-Saldivar, 2003).

Peso seco (%)	Tipo	Compuesto
16-21	Lignanos Fenólicos	Ácido Dihidroguaiarético Hemi-nosisoguaiacin Ácido nordihidroguaiarético Nordihidroguaiacin
5-7.5	Flavonoides	Apigenin Kaempferol
10-15	Saponinas	Larreagenin A
	Triterpenos	Ácido Larreico
0.1-0.2	Monoterpenos	Alpha penene
	Volátiles	Delta-3-carene
	Hidrocarburos 35	limoneno
	Aromáticos	Benzaldeido Benzilbutano Belzilbutano Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol Colesterol Campesterol
	Taninos	Glucosa
	Carbohidratos	Sucrosa
70.1 (de tallos)	Lípidos	Alkil esterres (C43-C56)
16.6	Aminoácidos	Fenilalanina Isoleucina Ácido glutámico Ácido aspártico Glicina

Cuadro 1. Principales constituyentes fitoquímicos de *L. tridentata* (Brinker, 1993).

El compuesto más importante que se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidermales superior e inferior de las hojas y tallos de *L. tridentata* es el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Figura 5), uno de los antioxidantes orgánicos mejor conocido (Seigler *et al.*, 1974).

Se ha determinado que este ácido tiene propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, citotóxico, antimicrobial e inhibidor de enzimas (Fernández, 1979; Brinker, 1993). Este antioxidante se presenta en todas las especies de *Larrea*. El NDGA también se considera que es un repelente de herbívoros (Rundel *et al.*, 1994).

El ganado no consume normalmente el follaje de *Larrea* (Zamora, 1988), pero puede hacerlo si la resina es removida, ya que es una excelente fuente de proteína, semejante a la alfalfa (Duisberg, 1952).

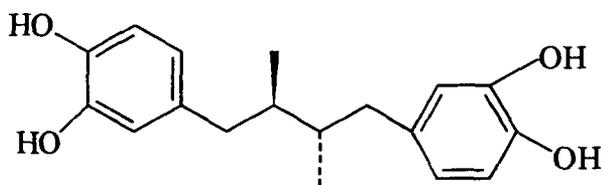


Figura 5. Estructura química del ácido nordihidroguaiaretico (NDGA)

Estudios interpopulacionales de *L. tridentata* realizados en el desierto Sonorense revelaron que las concentraciones de NDGA encontradas en la resina de sus hojas variaron en función de la latitud y de la época del año (Downum *et al.*, 1988), así como con factores ecológicos, ya que la concentración de NDGA puede verse reducida por la contaminación ambiental provocada por concentraciones elevadas de ozono (González-Coloma *et al.*, 1988).

La concentración de NDGA es de alrededor del 50% de la resina que forma parte de un 10 a 15% del peso seco de las hojas (Sakakibara *et al.*, 1976). También hay más de 20 flavonoides metil aglyconas que constituyen la otra mitad de la resina. Los posibles efectos de todos los diferentes flavonoides y otros constituyentes son numerosos y variados. Los efectos combinados de estos constituyentes de *L. tridentata* apuntan hacia un sinergismo que amplía el efecto del compuesto activo primario (NDGA), esto sugiere usar un extracto de la estructura entera hojas/ramas en comparación con usar una preparación de NDGA purificado sintetizado (Lira-Saldívar, 2003).

## Propiedades antifúngicas *in vitro* de *Larrea tridentata*

Uno de los primeros trabajos sobre el efecto fungicida y/o fungistático de la resina de gobernadora reporta que al utilizar extractos crudos de cloroformo y etanol los hongos *Rhizoctonia solani*; *Pythium sp.* y *Rhizopus nigricans* fueron controlados *in vitro*, tanto con el extracto metanólico como con el clorofórmico; no fue el caso de *Fusarium oxysporum*, ya que con 1000 ppm de cada extracto, este hongo solamente se logró controlar en un 76 y 93%, respectivamente (Fernández *et al.*, 1979).

Posteriormente otros autores han venido corroborando las propiedades antifúngicas *in vitro* de la gobernadora, ya sea de productos obtenidos con diferentes solventes o bien, con material vegetativo seco y molido. Los resultados obtenidos por Velásquez (1981), indican que el extracto de gobernadora que mejor efecto manifestó en estudios *in vitro* fue la fracción etanólica a dosis de 2,000 ppm observando un crecimiento nulo a los 15 días después de la inoculación del hongo *Cytosporina sp.*, estado asexual de *Eutypa armeniacae* agente causal del brazo muerto de la vid; además inhibió la germinación de ascosporas de *E. armeniacae* a la misma dosis, pero con extractos obtenidos con etanol y cloroformo.

Los estudios efectuados por Salazar *et al.* (1990) mostraron que el polvo de hojas y el extracto en acetona de *L. tridentata* también inhibieron *in vitro* el crecimiento de *Pythium aphanidermatum*. En el trabajo realizado por Vargas-Arispuro *et al.* (1997) sobre la actividad antiaflatoxigénica *in vitro* de 10 extractos vegetales, se destaca el efecto del extracto de *L. tridentata* obtenido con diclorometano, ya que inhibió el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en 92 y 86% respectivamente, en cambio los extractos metanólicos tuvieron poco efecto sobre la inhibición de ambos hongos.

En un ensayo realizado por Lara *et al.* (1997) se aplicó gobernadora en polvo y extractos obtenidos con acetona y agua para estudiar el efecto inhibitor *in vitro* de estos productos de *Larrea* sobre *Phytium ultimum*. El polvo de gobernadora así como los

extractos se adicionaron a la concentración del 2% en el medio de cultivo 3P (selectivo a Pythiaceos) antes del vaciado en cajas Petri. Los resultados de estos autores indican que el polvo y el extracto en acetona inhibieron el crecimiento del patógeno, mientras que el extracto en agua tuvo un comportamiento similar al testigo.

Por su parte, Verástegui *et al.* (1996) determinaron el efecto de extractos etanólicos de *L. tridentata* en el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias que afectan la salud de humanos y animales. Sus resultados mostraron que los extractos de gobernadora inhibieron diversos hongos entre los que destacan: *Candida krusei*, *C. albicans*, *C. rugosa*, *Cryptococcus neoformans*, *C. laurenti* y *C. albidus*, así como las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica* y *Proteus vulgaris*.

Debido a que existen pocos fungicidas comerciales que han sido efectivos en inhibir la germinación de teliosporas de *Tilletia indica*, el agente causal del carbón karnal del trigo, Rivera-Castañeda *et al.* (2001), realizaron un trabajo para estudiar el efecto inhibitorio sobre este hongo de varios extractos de plantas del estado de Sonora. Sus resultados indican que la inhibición total *in vitro* del hongo ocurrió con 500 mg/ml del extracto de *L. tridentata* obtenido con diclorometano. Las teliosporas tratadas con este extracto no mostraron viabilidad cuando se transfirieron a medio de cultivo fresco, por lo que el extracto de gobernadora mostró su potencial como agente de control de *T. indica*. En comparación, los extractos obtenidos de *Chenopodium ambrosioides* y *Encelia farinosa* sólo mostraron ser parcialmente efectivos contra *T. indica*.

Al comparar el efecto de extractos etanólicos de resina de gobernadora obtenida de follaje colectado en los desiertos Chihuahuense (D.Ch) y Sonorense (D.S.), Balvantín (2001) encontró que el hongo *Pythium* sp. fue significativamente inhibido en su crecimiento micelial, ya que con 500 ppm se logró una inhibición del 100% con el extracto del D.S., mientras que a esa misma dosis pero con el extracto del D.Ch. se redujo el crecimiento en un 70% en comparación con el testigo.

El efecto fungitóxico sobre *Alternaria solani* de los extractos hidrosolubles etanólico, metanólico y clorofórmico obtenidos de poblaciones nativas de *L. tridentata* provenientes de los D.Ch y D.S. también fue señalado por Lira-Saldivar *et al.* (2003). En este trabajo se encontró que el crecimiento micelial del hongo fue significativamente afectado a partir de 2,000 y 4,000 ppm; y totalmente inhibido a 8,000 ppm con los tres extractos de ambos desiertos.

Con base en los resultados hasta ahora reportados en la literatura, queda claro que los compuestos fitoquímicos presentes en la resina de gobernadora tienen una potente acción antifúngica *in vitro* contra diversos hongos fitopatógenos de gran importancia económica, algunos de ellos caracterizados por tener una gran capacidad metabólica como los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Montes-Belmont *et al.*, 2000).

En cuanto a los principios activos encontrados en la resina de *Larrea*, diversos autores (Brinker, 1993; Gnabre *et al.*, 1995) señalan a los lignanos fenólicos y especialmente al NDGA que solamente es producido por esta planta, como el metabolito secundario que confiere las propiedades biocidas de la gobernadora, sin embargo, esto no ha sido plenamente demostrado con hongos fitopatógenos; quedando también pendiente la realización de trabajos de investigación para documentar en detalle el modo de acción de los extractos de *L. tridentata* sobre diversos microorganismos.

#### **Efecto bactericida, nematocida y antiviral de *L. tridentata* y sus derivados.**

Muchas sustancias fenólicas son bactericidas porque reaccionan químicamente con los sistemas sensitivos de las enzimas y las vuelve catalíticamente inactivas. Debido al efecto inhibitor en numerosos sistemas enzimáticos, *L. tridentata* y el NDGA tienen un amplio espectro de actividad como agentes antisépticos. Los estudios comparando varios extractos de *L. tridentata* mostraron que la fracción de NDGA no era responsable de toda la actividad antimicrobiana (Zamora, 1988).

La resina de gobernadora ha probado tener efectos bactericidas y bacteriostáticos a bajas dosis, como lo demuestra el trabajo de Velásquez (1983) al evaluar *in vitro* diversas dosis del extracto etanólico contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E. atroseptica* y *Pseudomona solanacearum*, sus resultados revelaron que la resina de gobernadora presenta un efecto selectivo contra las tres bacterias evaluadas, al no inhibir a la dosis de 2,000 ppm el desarrollo de *E. amylovora*, mientras que el crecimiento de *E. atroseptica* fue mínimo a dosis relativamente bajas (250, 500 y 1,000 ppm), además los extractos de *L. tridentata* mostraron una excelente acción bactericida contra *P. solanacearum* incluso con la dosis mínima.

En el trabajo de Brinker (1993), enfocado a los usos etnobotánicos de *L. tridentata* se ha reportado que más de 45 bacterias, diez levaduras, nueve hongos y tres parásitos intestinales son susceptibles a la resina de *L. tridentata* o sus constituyentes.

El efecto de la resina de gobernadora como nematicida solo ha sido consignado en pocos casos. Huerta (1986) en pruebas *in vitro* señaló que la resina etanólica de *L. tridentata* mostró una inactivación de los nematodos a los 27 minutos, mientras que en el testigo (agua) la actividad duró 3.5 h. Recientemente en un trabajo *in vitro* con nematodos colectados de suelo infestado donde se tenía sembrado melón, vid y nogal, se compararon los efectos de cuatro dosis (1,000, 2,000, 4,000 y 8,000 ppm) del extracto etanólico de gobernadora contra el nematicida comercial Mocap. Los resultados obtenidos por De Anda (2003), reportan un claro efecto nematicida con las dosis de 4,000 y 8,000 ppm, en este trabajo también se señala que el efecto de esas dosis resultaron ser estadísticamente iguales que el nematicida sintético utilizado como referencia para comparar el efecto del extracto de gobernadora.

Una actividad muy interesante demostrada por ciertos constituyentes flavonoides de *L. tridentata* es el efecto antiviral reportado por los 3-metoxiflavonoides, incluyendo 3-metil-kaempferol, 3,3'-dimetil-quercetin, y 3,7,3'-trimetil-quercetin (Xue *et al.*, 1988). En su estudio encontró que estos flavonoides son activos contra los virus que afectan el RNA, incluyendo polio, coxsackie B2 y rino virus, y también contra la estomatitis

vesicular y el virus bunya. Las sustancias antes mencionadas son consideradas como verdaderos antivirales, ya que afectan la replicación de los virus y la iniciación de la síntesis de RNA (Zamora, 1988).

La actividad antiviral de los metabolitos de *L. tridentata* también ha sido claramente detectada en el trabajo de Gnabre *et al.* (1995), donde se consigna que el lignano 3-O-methyl del ácido nordihydroguaiaretico aislado de la resina del follaje de la gobernadora tiene un efecto inhibitor en la actividad del virus del SIDA, ya que este lignano impide la replicación del virus.

Un reporte muy completo sobre las propiedades antivirales de *L. tridentata* contra el virus causante de los diferentes tipos de herpes encontrados en humanos ha sido presentado por Clark (1999), quien menciona que el extracto de esta planta es 1000 veces más potente que las drogas sintéticas antivirales. En su trabajo se señala que cultivos de células de los virus causantes de herpes de los tipos HSV-1 y HZV sin extracto de *Larrea* fueron destruidos en 72 h, mientras que células conteniendo 10 µg/ml del extracto de *Larrea* no fueron afectadas por el virus; los resultados clínicos de este autor indican que el derivado de gobernadora elimina más rápido el virus del herpes que la droga Zovirax (acyclovir), la cual es específica para este virus.

Otros constituyentes fenólicos aparte de los flavonoides que imitan la actividad biológica del NDGA incluyen los lignanos norisoguaiacin y el ácido dihidroguaiaretico parcialmente demetilado. El lignano norisoguaiacin demostró actividad antimicrobiana y antioxidante, así como en el transporte mitocondrial de electrones e inhibición enzimática (Gisvold y Taker, 1974).

Entre los organismos inhibidos están los causantes de algunas enfermedades bacterianas como paratifoidea, ántrax, fiebre escarlata, nocardiosis, neumonía lobar, infecciones en las heridas, infecciones del tracto respiratorio superior e urinarias y caries. El efecto en los organismos ha sido solamente demostrado *in vitro* (excepto de *Streptococcus pneumoniae* tipo II en ratones), así que no es muy difícil asumir que los

extractos de *Larrea* pueden controlar exitosamente las infecciones arriba mencionadas (Brinker, 1993).

### **Propiedades de *Larrea tridentata* observadas *in vivo*.**

No son muchos los resultados generados *in vivo* con extractos, hojas o productos derivados de la gobernadora. Estudiando el efecto de residuos de *L. tridentata* sobre el hongo *P. aphanidermatum* y su efecto sobre la germinación y crecimiento de plántulas de frijol, Salazar *et al.* (1990) descubrieron que la muerte en la preemergencia fue más alta (80 al 100%) en los tratamientos inoculados con los patógenos, excepto en aquellos donde se adicionó gobernadora, en los cuales el porcentaje de germinación fue del 100%.

Al evaluar la supervivencia de plántulas de tomate trasplantadas en un suelo infestado con los patógenos *R. solani*, *P. aphanidermatum*, *P. capsici* y con sus combinaciones, García *et al.* (1997) encontraron un notable efecto en la disminución del porcentaje de incidencia de mortandad en plantas de chile (*Capsicum annuum*), lo anterior se observó cuando se adicionó gobernadora molida en polvo en proporción de 1% p/p.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la gobernadora sobre patógenos radicales, Lara *et al.* (1997) sembraron bajo condiciones de invernadero semillas de frijol Canario 107 en suelo previamente infestado con *R. solani* y *P. aphanidermatum*, al cual se le agregó un polvo a base de hojas y ramas de gobernadora al 2% p/p. Ellos observaron que la muerte preemergente fue más alta (80 a 100%) en los tratamientos inoculados con los patógenos, excepto en aquellos tratados con gobernadora, en los cuales el porcentaje de germinación fue del 100%.

El efecto de la gobernadora también ha sido estudiado sobre los hongos de almacén *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* productores de aflatoxinas. Vargas-Arispuro *et al.* (1997), encontraron que los mejores resultados se obtuvieron con el extracto de *Larrea* a 500 ppm obtenido con diclorometano, ya que inhibió en 92 y 86%

respectivamente el crecimiento de los hongos antes mencionados. En cambio, el extracto metanólico tuvo poco efecto sobre la inhibición de ambos patógenos.

La acción benéfica de *L. tridentata* contra el ataque de insectos en granos también ha sido documentado por Cortéz-Rocha *et al.* (1993). Ellos determinaron que la gobernadora provoca repelencia a insectos, ya que granos de frijol tipo pinto, almacenados y previamente tratados con polvo de hojas de *L. tridentata*, el gorgojo del frijol (*Zabrotes subfasciatus*) fue menos atraído que los no tratados.

Por otro lado, en un trabajo donde se utilizó la técnica de solarización más la incorporación al suelo de un extracto etanólico hidrosoluble de *L. tridentata* a razón de 20 kg ha<sup>-1</sup>, Lira-Saldivar *et al.* (2003c) encontraron que las raíces de plantas de chile presentaron un ligero daño por patógenos del suelo (*A. alternata*, *Phytium* sp. y *Rhizoctonia solani*), mientras que en el tratamiento con solarización sin extracto etanólico, las raíces de las plantas de chile mostraron un incremento de 134% en la severidad del daño. En cambio, el suelo no solarizado que tampoco recibió extracto de gobernadora reportó un incremento de 567% en el daño radicular, en comparación con las plantas de parcelas solarizadas a las que se incorporaron 20 kg ha<sup>-1</sup> del extracto.

### **Importancia de las bacterias**

Las bacterias han sido históricamente la causa de graves enfermedades y propagación de epidemias en humanos; las enfermedades como tuberculosis, difteria, fiebre tifoidea, cólera, disentería y neumonía, han causado un gran daño en la humanidad. La purificación del agua, inmunización (vacunas) y tratamientos modernos con antibióticos continúan reduciendo la morbilidad y mortalidad por bacterias. Por otra parte, nuevas bacterias patógenas han sido reconocidas en los pasados 25 años y otras más antiguas como *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*, han emergido con nuevas formas de virulencia con patrones de resistencia a la mayoría de los agentes antimicrobianos sintéticos que resultan ser los de uso más común (<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).

## **Importancia médica y económica**

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es la especie más estudiada de la familia *Enterobacteriaceae*, por su importancia médica y económica, fácil de cultivar y aislar, tiempo de regeneración corto y por su capacidad de ser manipulada genéticamente. Las enterobacterias se encuentran ampliamente distribuidas, en agua, suelo, flora intestinal de humanos y muchos animales; viven como saprofitos, simbiosis, epifitas y parásitos. Su rango de hospederos incluye animales que van desde insectos hasta humanos, así como en frutas, vegetales, granos, plantas y una gran cantidad de árboles ([www.emedicine.com/med/byname/klebsiella-infections.htm](http://www.emedicine.com/med/byname/klebsiella-infections.htm)).

### ***Staphylococcus aureus***

Dos especies de *Staphylococcus* viven en asociación con humanos: *Staphylococcus epidermidis* vive normalmente en las fosas nasales, donde raramente es patógeno y probablemente ayuda al huésped a producir ácidos en la piel que retarda el desarrollo de hongos dermatóxicos; y *Staphylococcus aureus*, el cual puede permanecer en diferentes lugares pero principalmente en la membrana nasal (nariz); es un potencial causante de enfermedad y es considerado un patógeno. Las cepas de *S. aureus* varían en la calidad de enfermedades, también es notoria su resistencia a la penicilina y a otros antibióticos; tiene un amplio margen de virulencia y está presente como flora normal de humanos, lo cual asegura que puede ser fácilmente transmitido de un individuo a otro (<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>).

### ***Pseudomona***

El género de esta bacteria constituye un ejemplo clásico del patógeno oportunista. Se le relaciona con epidemias severas de diarrea en lactantes y enfermos hospitalizados e inmunocomprometidos, ya que provoca padecimientos serios como endocarditis, endoftalmitis, meningitis, neumonía y septicemia. Es importante señalar

que en algunos incidentes la fuente de infección de diversas especies del género *Pseudomona* se encontró en el instrumental y equipo médico e incluso en soluciones germicidas, tales como sales cuaternarias de amonio y yodóforos usadas en clínicas y hospitales (Gilardi, 1985).

### ***Salmonella***

En la actualidad, las salmonelas son consideradas universalmente como una de las causas más importantes de enfermedad transmitida por alimentos que afecta a cerca de 2,000,000 de individuos cada año. La salmonelosis en humanos es considerada regularmente como contaminación por alimentos (gastroenteritis), pero en otras ocasiones se manifiesta como una seria infección sistémica (fiebre entérica) la cual requiere un pronto tratamiento con antibiótico. Además, la salmonelosis también puede causar grandes pérdidas en el ganado ([www.textbookofbacteriology.net/enterics.html](http://www.textbookofbacteriology.net/enterics.html)).

### ***Enterococcus***

Los enterococos son la principal causa de infección en hospitales (una segunda infección adquirida en el hospital). Son responsables de aproximadamente 110,000 casos de infección en las vías urinarias, 25,000 casos de bacteremia y 1,100 casos de endocarditis anualmente en los Estados Unidos (Huycke, 1998).

### ***Proteus***

Son bacterias saprófitas comunes en el medio ambiente, se aíslan de una diversidad de alimentos. Participan en la descomposición de alimentos, generalmente en etapas avanzadas, el género *Proteus* tiene un intenso efecto putrefactivo; debido a que la descarboxilación de aminoácidos participa en la formación de aminas; común en la materia fecal y en la materia orgánica en descomposición (Fernández, 2000).

## ***Klebsiella***

*Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* son las dos especies de este género responsables de enfermedades en humanos; son patógenos oportunistas que se encuentran en el ambiente y en la mucosa de la cavidad nasal. El principal reservorio del patógeno es el tracto gastrointestinal y las manos del personal de hospitales. Estos patógenos pueden llegar a propagarse rápidamente y causar grandes epidemias en humanos ([www.emedicine.com/med/byname/klebsiella-infections.htm](http://www.emedicine.com/med/byname/klebsiella-infections.htm)).

## **MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE LAS BACTERIAS ESTUDIADAS**

### **Introducción a la familia *Enterobacteriaceae***

Una de las principales razones por las que la familia *Enterobacteriaceae* ha sido ampliamente estudiada es por el efecto negativo que causa en la salud humana, animales y en la agricultura. A la familia de las enterobacterias pertenecen especies deterioradoras de alimentos, que provocan infecciones adquiridas en el hospital, fiebre entérica (fiebre tifoidea) y plagas; causan también infecciones en animales domésticos, de granja y zoológico (Hayes, 1993).

Son bacilos Gram negativos que miden de 0.3 – 1.0 x 1.0 – 6.0  $\mu\text{m}$ , oxidasa negativo, fermentan el azúcar con producción de gas. Típicamente móviles con flagelos peritricos, anaerobios facultativos, crecen entre 22 y 35°C en medios que contienen peptona o extracto de carne. Se desarrollan también en agar MacConkey el cual puede ser usado como un medio de aislamiento selectivo (Fernández, 2000).

## ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un habitante casi universal del intestino de las personas y de los animales de sangre caliente donde es el anaerobio facultativo predominante. Por lo general es un comensal inofensivo, puede ser un patógeno oportunista que causa algunas infecciones de las vías urinarias, neumonía en enfermos con inmunosupresión y meningitis en recién nacidos. Su presencia corriente en las heces, su facilidad para cultivarlo, su carácter generalmente apatógeno y las características de supervivencia en el agua, determinaron que *E. coli* fuese adoptado como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua (Fernández, 2000).

### **Características generales**

*Escherichia coli* es un bacilo corto (Figura 6), Gram negativo, no esporógeno catalasa positivo, oxidasa-negativo, fermentador de la lactosa. Es un organismo mesófilo típico que crece a temperaturas desde 7 a 10°C hasta 50°C, con una temperatura óptima de 37°C, aunque ha habido referencias de algunas cepas que crecieron a temperaturas de 4°C. No presenta termo resistencia y es capaz de resistir el almacenamiento en refrigeración o en congelación durante tiempos prolongados. Un pH casi neutro es óptimo para su crecimiento, aunque puede crecer a pH inferior a 4.4 (Adams, 1997).

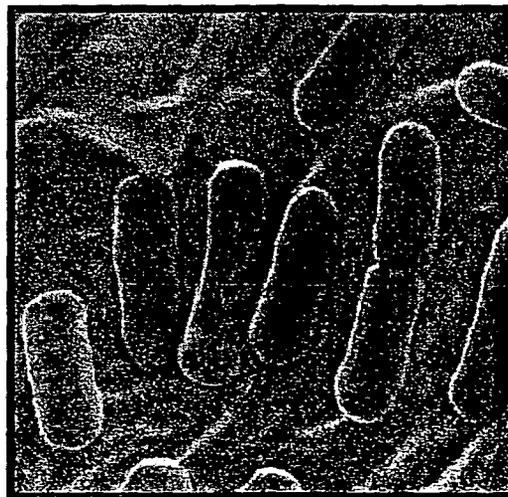


Figura 6. Morfología microscópica de la bacteria *Escherichia coli*

## **Patogenia y signos clínicos**

Varias especies de *E. coli* conocidas como *E. coli* enteropatógenos (EEC), producen graves diarreas y vómitos en los lactantes y niños; los informes en los que se implica a las cepas de EEC como causa de toxiinfección alimentaria en adultos son muy poco frecuentes. Se sabe que ciertas cepas de EEC producen enterotoxinas de las que se han descrito dos: una termosensible y otra termorresistente. El período de incubación varía de 2 a 48 horas y los síntomas principales son diarrea náuseas y dolor abdominal. Con frecuencia se presenta fiebre que a veces es alta, pero los vómitos son menos frecuentes. Las diferencias observadas en la sintomatología se deben probablemente a las distintas cepas de EEC implicadas (Hayes, 1993).

## **Aislamiento e identificación**

Las técnicas selectivas para *E. coli* se basan principalmente en la capacidad del microorganismo para tolerar la bilis y otros agentes tensoactivos por su habitat natural, que es el intestino. El medio utilizado es el agar MacConkey; las sales biliares (y a veces el colorante cristal violeta) actúan como inhibidores de las Gram-positivas y de algunas Gram negativas exigentes, lactosa y rojo neutro. Las colonias son de color rojo. El agar eosin/azul de metileno es un medio selectivo diferencial muy utilizado. Los colorantes eosina y azul de metileno son agentes selectivos pero también actúan como indicadores de la fermentación de la lactosa por formar un precipitado a un pH bajo, las colonias son de color verde oscuro con brillo metálico (Adams, 1997).

## **Asociación con alimentos**

Son muchos los alimentos implicados en la toxiinfección alimentaria por EEC, entre ellos diversas carnes de mamífero y aves, puré de papa, galletas de crema, leche y queso. Al parecer ningún alimento está especialmente asociado con esta forma de toxiinfección alimentaria (Hayes, 1993). La contaminación fecal de las redes de abastecimiento de agua y los manipuladores de alimentos contaminados, han sido implicados muy frecuentemente en brotes de enfermedad causados por diferentes cepas de *E coli*; también diversos alimentos han sido implicados entre los que se incluyen un

sustito del café, hortalizas, ensalada de papa y el sushi; y en quesos blandos madurados por hongos. Brotes causados por el serotipo O157:H7 han implicado principalmente a carne molida mal cocida y a leche fresca.

Un grave brote de *E. coli* ocurrido en Estados Unidos en 1993, causado por hamburguesas insuficientemente cocidas provocó que seiscientas personas enfermaron y cuatro niños murieron. Este brote generó una gran atención sobre la higiene de la carne y motivó entre otras cosas, la implantación de nuevas normas relativas al etiquetado de las carnes (Adams *et al.*, 1997).

### **Características de *Salmonella***

Las salmonelas son bacilos cortos (0.5  $\mu\text{m}$  por 1-3  $\mu\text{m}$ ) Gram negativos, no esporulados, con una rica composición antigénica: antígenos somáticos (O, de naturaleza lipopolisacárida) y flagelares (H, proteínas; generalmente son móviles con flagelos peritricos (Figura 7). Se ha registrado crecimiento en temperaturas de 5°C hasta 47°C con un crecimiento óptimo a 37°C. Las salmonelas son termosensibles por lo que son destruidas fácilmente por las temperaturas de la pasteurización. El género *Salmonella* comprende casi 2,000 cepas distintas (denominadas serotipos), su número está en constante aumento al aislarse nuevas cepas serológicamente distintas. Muchos serotipos reciben el nombre del lugar en donde se aislaron por primera vez, por ejemplo: *S. newport*, *S. derby*, *S. dublín*, *S. heidelberg*, originalmente las salmonelas se designaban de una forma más fortuita y a menudo teniendo en cuenta la enfermedad y el animal afectado (ejem: *S. typhimurium* que causa el tifus en los ratones) (Fernández, 2000).

La *Salmonella* es una bacteria primariamente parasitaria intestinal de los animales y el hombre, se libera al medio ambiente cuando es expulsada por las heces, muestra capacidad de sobrevivencia bajo condiciones favorables y también de multiplicarse; aunque difieren en cuanto a las características y gravedad de la enfermedad que causan. La fiebre tifoidea es la más grave, fue la primera infección por *salmonella* que fue descrita de modo inconfundible. Son anaerobios facultativos, mismos que se caracterizan bioquímicamente porque fermentan la glucosa, con

producción de gas y no atacan la lactosa ni la sacarosa. Su temperatura óptima de crecimiento, como la mayoría de las bacterias productoras de toxiinfecciones alimentarias es de 37°C. Son relativamente termosensibles pues se destruyen a 60°C en 15 a 20 minutos y no crecen por debajo de los 5°C. Las células sobreviven perfectamente en los alimentos desecados (Adams *et al.*, 1997).

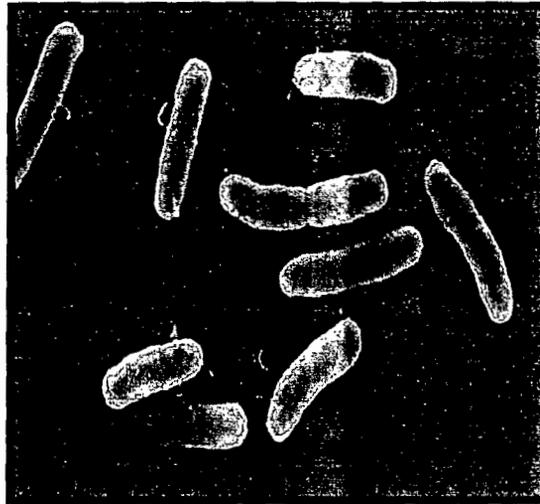


Figura 7. Morfología microscópica que ilustra el género *Salmonella*

Estos microorganismos son huéspedes habituales del tracto gastrointestinal; son transportadas por una gran variedad de animales de abasto, animales salvajes, roedores, mascotas de compañía, aves, reptiles e insectos, normalmente sin presentar ninguna enfermedad manifiesta; por lo que las enfermedades gastrointestinales están relacionadas principalmente con aquellos serotipos que existen en abundancia en los animales y en las personas. Por su gravedad, pueden variar desde la vehiculación asintomática hasta una diarrea grave y son el tipo de salmonelosis más corriente. Pueden ser diseminadas por medio de las heces al suelo, al agua, a los alimentos y desde estos medios a otros animales incluyendo a las personas. En cualquier edad, la enfermedad humana suele estar relacionada con un número limitado de serotipos. En la actualidad *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. virchow* son los más comunes, siendo los dos primeros las tres cuartas partes de los informes de laboratorio aproximadamente (Fernández, 2000).

## **Patogenia y signos clínicos**

Los brotes de enfermedades transmitidas por agua o alimento en EUA son frecuentemente asociadas con las *Enterobacteriaceae* según el Centro de Control de Enfermedades (CDC). Entre el 40 a 45% de cada epidemia es causada por la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente por *Salmonella*. La carne, leche, derivados de la leche y huevos son las vías más comunes de transmisión. Aunque muchos de los brotes son detectados, muchos no lo son o no son reportados al CDC; se estima que cada caso reportado representa cerca de un total de 100 casos reales. Durante 1985 los brotes de salmonelosis en Estados Unidos ocurridos en Illinois y Wisconsin, fueron de 170,000 a 200,000 personas infectadas con *Salmonella typhimurium* transmitida por leche de una sola planta pasteurizadora. Los síntomas comunes de una intoxicación por *Salmonella* es gastroenteritis (diarrea, dolor abdominal y fiebre) o fiebre entérica (incluyendo fiebre tifoidea).

## **Aislamiento e identificación**

Los métodos de aislamiento e identificación de salmonelas en los alimentos ha sido objeto de mayor cantidad de estudios que los correspondientes a cualquier otro organismo patógeno transmitido por alimentos. Utilizando las técnicas tradicionales, ha aparecido un procedimiento de cinco fases (Figura No. 8) que ha sido aceptado como norma universal.

## ***Klebsiella***

Las bacterias del género *Klebsiella*, son bacilos cortos no móviles Gram negativos con cápsula; son patógenos oportunistas que pueden ser causa de severas enfermedades como septicemia, neumonía e infecciones en las vías urinarias; posee resistencia antimicrobiana causando serios problemas. Es común la transmisión de cepas de *Klebsiella* entre pacientes, contaminación de superficies y ambiente en los hospitales (Jonas, 2003).

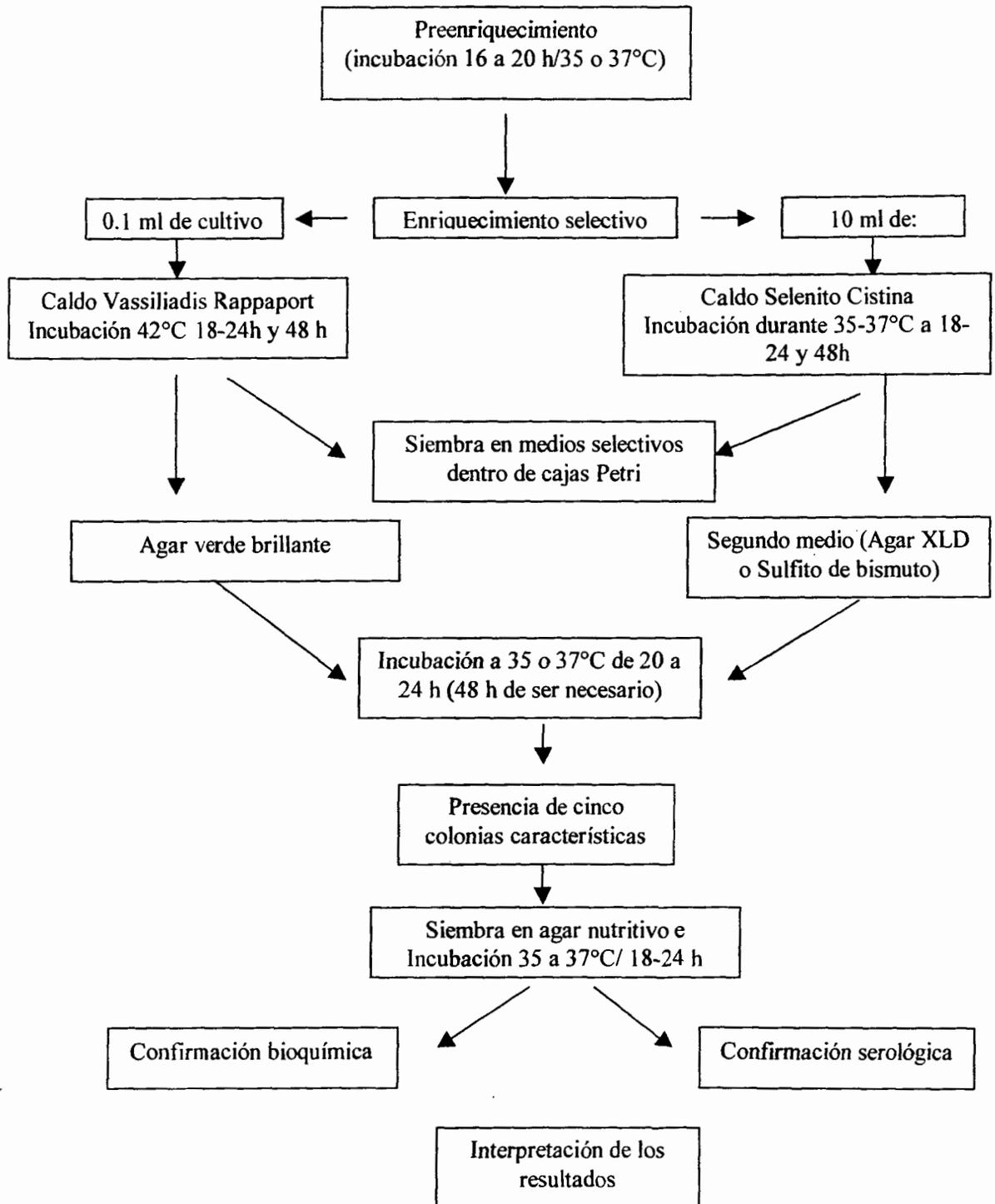


Figura 8. Método tradicional para el aislamiento e identificación de *Salmonella*

## *Pseudomona*

Bacilo recto o ligeramente incurvado (Figura 9), de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho por 1.5 a 5.0  $\mu\text{m}$  de largo, móvil mediante uno o más flagelos polares, aerobio estricto, no desarrolla a pH menor de 4.5, catalasa positivo. Muchas especies producen pigmentos solubles, como la pioverdina (fluorescente) y piocianina. Algunas especies son patógenas de plantas y también para el hombre; es común en el agua y en la tierra. Su actividad en los alimentos está relacionada frecuentemente con la descomposición, en especial por su carácter putrefactivo y en algunos casos lipolítico y no fermenta carbohidratos. La especie *P. aeruginosa* desarrolla a 41°C, pero a diferencia de *P. fluorescens* no lo hace ni a 0° ni a 4°C (Fernández, 2000).

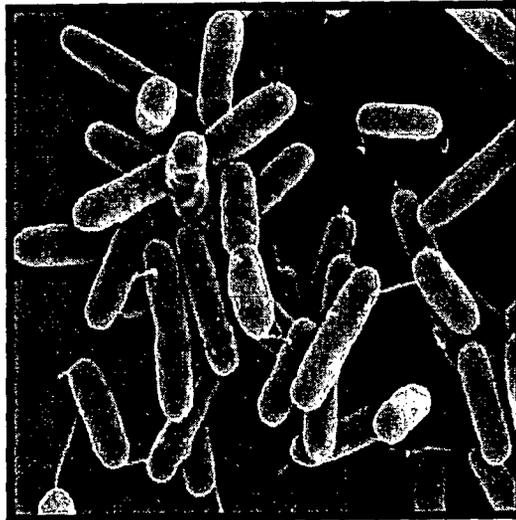


Figura 9. Morfología microscópica de la especie *Pseudomona aeruginosa*

## *Pseudomona aeruginosa*

Es muy común su presencia en el medio ambiente, con facilidad se recupera de verduras como jitomates, rábanos, apio, pepinos, cebollas y lechuga. Esto induce a restringir o cancelar el consumo de verduras crudas por individuos especialmente hipersensibles, con énfasis especial en hospitalizados (Joklik *et al.*, 1988). *P. aeruginosa*

aunque no parece formar parte de la microflora endógena de personas sanas, un 15% son portadores, la cifra es mayor en individuos con largos períodos de hospitalización o con heces flojas. La forma de infección más común es de persona a persona, pero también puede serlo de fuentes ambientales, incluidos los alimentos.

### **Aislamiento e identificación**

Masurovsky *et al.*(1963) describieron un medio de cultivo diseñado específicamente para detectar y enumerar las *pseudomonas* en los alimentos. Este medio contiene como nutrientes diversas sales inorgánicas: arginina y extracto de levadura, además dos antibióticos: eritromicina y cloranfenicol. Sus diseñadores comprobaron que dichos componentes inhibían por completo las bacterias gram positivas y que sólo sobrevivían un bajo número de gram negativas. Este medio se ha popularizado mucho y la sustitución de sus antibióticos originales por penicilina y estreptomicina ha mejorado su selectividad. (Solberg *et al.*, 1972) desarrollaron un medio que contiene como agentes selectivos bromuro de cetil-trimetil-amonio (cetrimida) y óxido de hidroxitriclorodifenilo que también es eficaz, aunque permite el crecimiento de ciertos coliformes, lo mismo que los medios ya descritos. Grant y Holt (1977) han descrito otro medio de cultivo que contiene diversos agentes selectivos y que permite el crecimiento casi exclusivamente de las *pseudomonas*; tales agentes son un antibiótico, el ácido nalidíxico (que suprime las bacterias gram negativas), nitrofurantoina y cloruro de trifetil terazol (que inhibe a los bacilos gram negativos distintos de las *pseudomonas*), el colorante fucsina básica (que suprime las bacterias gram positivas), y la ciclohexamida (que suprime los hongos). La incubación de todos los medios es de 2 a 3 días a 20-30°C; para su confirmación se deben someter a las colonias a pruebas bioquímicas (Hayes, 1993).

## ***Proteus***

*Proteus* es un bacilo (Figura 10) gram negativo que ha sido implicado en casos de infección en humanos junto con especies de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. Las especies de *Proteus* son comúnmente encontrados en el tracto intestinal como flora normal en humanos junto con *Escherichia coli* y *Klebsiella*, de las cuales *E. coli* es predominante. *Proteus* ha sido encontrado en diferentes habitats incluyendo asilos y hospitales; es aislado de pacientes con infecciones frecuentes en las vías urinarias ([www.emedicine.com](http://www.emedicine.com)).

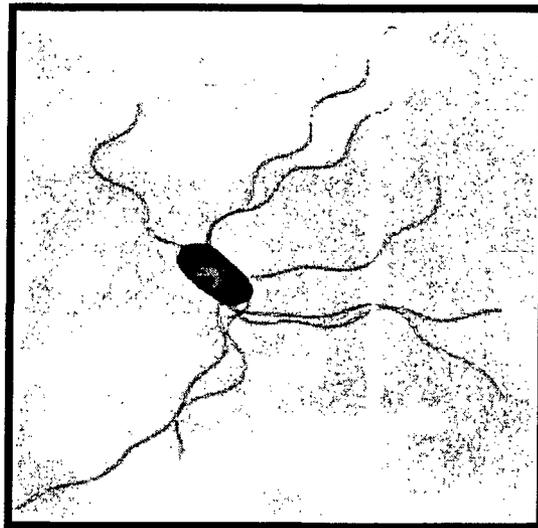


Figura 10. Morfología microscópica ilustrativa de la especie *Proteus vulgaris*

## ***Enterococcus***

Los enterococcus pertenecen a la familia *Enterococcaceae* e incluye las especies *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, siendo la primera la principal implicada en brotes ocasionales de toxiinfecciones alimentarias. Ambas especies son microorganismos pequeños (0.5-1  $\mu\text{m}$   $\text{\O}$ ), esféricos, gram positivos que se presentan comúnmente en parejas o en cadenas cortas. Las dos presentan unas pocas especies móviles y crecen en

un rango amplio de temperaturas (10 a 45°C), aislándose tanto de las heces humanas, como de los animales de sangre caliente (Hayes, 1993).

### *Enterococcus faecalis*

Los enterococos en su conjunto son células esféricas u ovoides, de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5  $\mu\text{m}$  dispuestos en pares o cadenas cortas (Figura 11); algunas cepas son móviles y carecen de cápsula, catalasa negativos y anaerobios facultativos. Han sido descritos como organismos altamente resistentes capaces de sobrevivir en muchos medios en los que otras bacterias morirían. Habitan normalmente en el contenido intestinal del hombre y animales de sangre fría o caliente, pero se encuentran también en el suelo, la vegetación y superficie del agua; debido probablemente a la contaminación por excremento de animales (Fernández, 2000).

Estos microorganismos son capaces de desarrollarse en rangos de temperatura de 10 a 45 °C, a pH 9.6 y en presencia de bilis al 40%, o de NaCl al 6.5%, en ambientes hipotónicos, hipertónicos, ácidos o alcalinos, con reducción de oxígeno o condiciones oxigenadas. Son también importantes por su carácter termotolerante (60°C/30 min.), lo que les distingue de otros cocos gram positivos además de una gran resistencia a antibióticos (Lyon *et al.*, 1995).

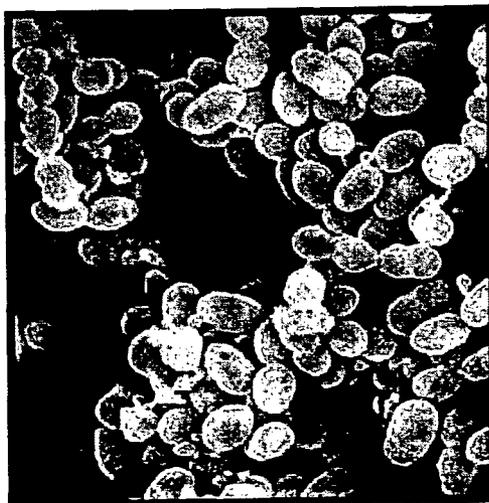


Figura 11. Morfología microscópica ilustrativa de la especie *Enterococcus faecalis*

## **Asociación con alimentos**

Los enterococos se emplean a veces como indicadores de contaminación fecal en el análisis de agua; una de las ventajas sobre *E. coli* es que mueren más lentamente y uno de los inconvenientes es que se encuentran con más frecuencia en ambientes no fecales, y por lo tanto, su aislamiento no indica claramente contaminación fecal. La presencia de los enterococos en los alimentos no guarda relación confiable con su exposición a la materia fecal humana o animal, sin embargo, puede plantearse como un indicador de prácticas no sanitarias en el manejo de los alimentos, especialmente en los productos congelados (Hayes, 1993).

La mayoría de los brotes causados por esta bacteria fueron reportados antes de 1950, cuando no se tenía el amplio conocimiento de los microorganismos actualmente identificados como agentes etiológicos de ETAs (Enfermedades Transmitidas por Alimentos). No se sabe de factores de virulencia que pudieran explicar o al menos asociarse con las infecciones intestinales reportadas. Los resultados con voluntarios humanos suelen ser no concluyentes, aún con dosis de  $10^{10}$  células. Es posible que el enterococo adquiriera papel patógeno sólo en condiciones especiales (Fernández, 2000).

## **Aislamiento e identificación**

El recuento de los enterococos puede realizarse por la técnica de vaciado en placa utilizando el medio de agar *Streptococcus* KF; que además de los nutrientes corrientes, contiene también cloruro de tetrazol, ingrediente que da a las colonias el color rojo o rosado a 37°C/48 horas. También se puede utilizar la técnica NMP en caldo de glucosa azida, incubando a 45°C. Los tubos en los que se aprecia producción de ácido se consideran positivos (Hayes, 1993).

## ***Staphylococcus aureus***

En la actualidad se conocen 27 especies y 7 subespecies del género *Staphylococcus*; la producción de enterotoxinas está relacionada principalmente con la especie *S. aureus*, aunque también ha sido referida en otras especies entre las que se incluyen *Staphylococcus intermedius* y *S. hyicus* (Adams *et al.*, 1997).

### **Características**

*S. aureus* es una bacteria esférica, pequeña (0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  Ø), gram positiva, inmóvil que forma agrupaciones irregulares de células, las que se asemejan a los racimos de uvas (Figura 12). Son anaerobias facultativas, pero crecen mejor en presencia de aire, siendo su temperatura óptima de crecimiento 37°C, pero desarrollándose hasta los 10°C o ligeramente menos. *S. aureus* presenta la característica poco frecuente de tolerar tasas bajas de actividad de agua (0.86 mínimo) y por lo tanto, crece a niveles de sal relativamente altos. Todas las especies de *S. aureus* son coagulasa positivas (es decir, poseen un enzima que coagula el plasma sanguíneo), pero sólo el 50% aproximadamente, producen enterotoxinas asociadas a la toxiinfección alimentaria. Se han identificado seis tipos de enterotoxinas, A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D y E; siendo las A y D las más comúnmente implicadas en toxiinfecciones alimentarias. Se ha demostrado (Payne y Wood, 1974) que dos tercios de las especies productoras de enterotoxinas forman una sola toxina, generalmente la del tipo A y la mayoría de los restantes sólo forman dos; ninguna produce más de tres. Las enterotoxinas son exotoxinas, llamadas así por que se originan en el interior de la célula intacta desde donde se liberan al alimento o medio de cultivo. Las enterotoxinas de *S. aureus* tienen la particularidad, poco frecuente de ser muy termorresistentes. La mayoría resisten la ebullición en el alimento hasta 30 minutos, siendo la toxina B la más termorresistente (Bergdoll, 1970).

La fuente más importante de *S. aureus* la constituye probablemente el organismo humano, donde el principal reservorio es la nariz. Entre el 30 y 40% de las personas sanas albergan inevitablemente la bacteria en sus manos y otras partes del cuerpo. Muchas lesiones, como granos, cortes y excoriaciones infectadas poseen *S. aureus*, mientras que otra fuente abundante de esta bacteria es el pelo. En donde la tasa de portadores es tan alta como la de los nasales (Bryan, 1976).

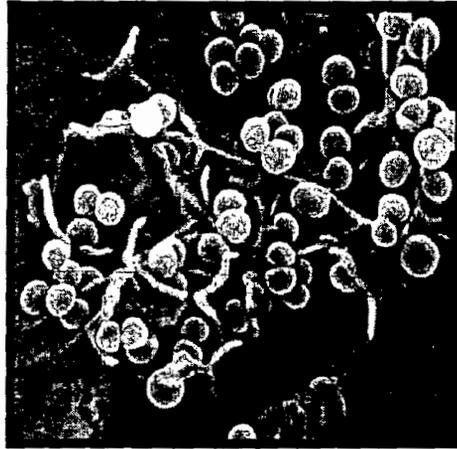


Figura 12. Morfología microscópica de ilustrativa del género *Staphylococcus aureus*.

### **Patogenia y signos clínicos**

La intoxicación alimentaria por *S. aureus* se caracteriza por un período de incubación corto, típicamente de 2-4 horas. Los síntomas predominantes son náusea, vómito, espasmos de estómago, aunque con frecuencia también se presenta diarrea; también puede ocurrir sólo uno de estos síntomas. El período de incubación y la sintomatología, dependen de la cantidad actual de toxina ingerida y de la susceptibilidad del individuo. La recuperación generalmente se alcanza en 24 h, pero en personas debilitadas, niños o ancianos, se pueden requerir varios días. Por regla general no se observan secuelas (Fernández, 2000).

## **Asociación en alimentos**

La causa principal de esta toxiinfección alimentaria son los alimentos cocinados manipulados por portadores de *S. aureus*, especialmente por los que presentan lesiones infecciosas, y que después se han almacenado mucho tiempo estando todavía calientes. Las carnes curadas cocidas, especialmente jamón, con las que se preparan bocadillos y otros tipos de menú para consumir en frío son las más frecuentemente implicadas. Lo mismo que otras carnes frías, incluidas a las de aves. Otros alimentos implicados con menor frecuencia en brotes de esta naturaleza son los ovoproductos, como natillas, productos de pastelería rellenos de crema, artificial, pasteles de crema etc. En el Reino Unido, son raros los brotes de intoxicación estafilocócica por leche cruda o pasteurizada, pero la leche y los productos lácteos crudos, como crema y queso, han causado brotes en muchos otros países. Estos casos *S. aureus* suelen proceder de vacas enfermas de mastitis, sin embargo, esta vía de contaminación es una excepción a la regla. Una fuente de contaminación estafilocócica todavía más rara son los alimentos enlatados (Hayes, 1993).

## **Aislamiento e identificación**

El medio selectivo para siembras en placa más apropiado y el que más se utiliza para *S. aureus* es el agar Baird Parker (B P). Este medio es altamente selectivo y tiene la capacidad para regenerar las células estresadas. Las colonias son de color negro brillante rodeadas de una zona clara y se confirman con las pruebas de la producción de coagulasa y termonucleasa (Adams y Moss, 1997).

## GENERALIDADES DE HONGOS PRODUCTORES DE TOXINAS

A nivel mundial, después de los insectos, los hongos son los principales causantes de la reducción en la calidad de los cereales almacenados. En países desarrollados, donde los insectos y roedores son controlados eficientemente, los hongos causan la mayoría de las pérdidas durante el almacenamiento. El uso de ácido propiónico como inhibidor de hongos en el almacén comenzó en Europa en 1970. Posteriormente se usó en Canadá y en Estados Unidos. La dosis depende del contenido de humedad del grano. El grano tratado con este ácido, no puede comercializarse en Estados Unidos, y solamente debe usarse como alimento para animales y aves de corral; este ácido destruye la vitalidad de los granos y deja un olor característico en los mismos (González, 1995).

La infestación por insectos generalmente afecta la calidad del grano y puede causar considerables pérdidas; sin embargo, la contaminación por hongos puede, además de generar pérdidas económicas, repercutir en la salud humana, por su capacidad de producir toxinas (Lillehoj, 1983). Los géneros de hongos que más frecuentemente contaminan al maíz en forma natural son: *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Penicillium* y las especies más importantes de los géneros mencionados son : *Fusarium moniliforme*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, debido principalmente a su capacidad potencial de producir fumonisinas y aflatoxinas, respectivamente (Domsch *et al.*, 1980).

### *Aspergillus*

El género *Aspergillus* (Figuras 13 y 14) puede aislarse de todo el mundo, especialmente en los meses de invierno y de otoño, en el hemisferio norte. Los mohos también reciben el nombre de hongos filamentosos o miceliales. Sólo algunos de estos hongos tienen capacidad para causar enfermedad en seres humanos y animales, aunque la mayoría de las personas son inmunes y no desarrollan la enfermedad que originan los *Aspergillus*. No obstante, cuando la infección se desarrolla puede tomar formas distintas; causa diferentes clases de enfermedades, las cuales varían desde cuadros de tipo alérgico

a infecciones generalizadas que ponen en peligro la vida del paciente. La enfermedad causada por *Aspergillus* recibe el nombre de aspergilosis. La gravedad de la aspergilosis depende de varios factores, aunque uno de los más determinantes es el estado del sistema inmune de la persona. (<http://www.moldbacteria.com/>).

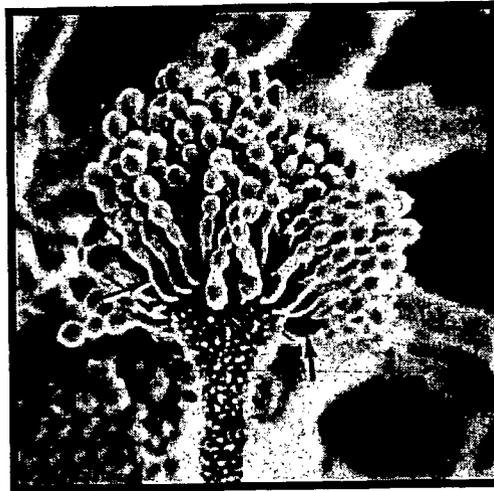


Figura 13. Microfotografía de conidioforo y conidias de *Aspergillus flavus* (1000 X).

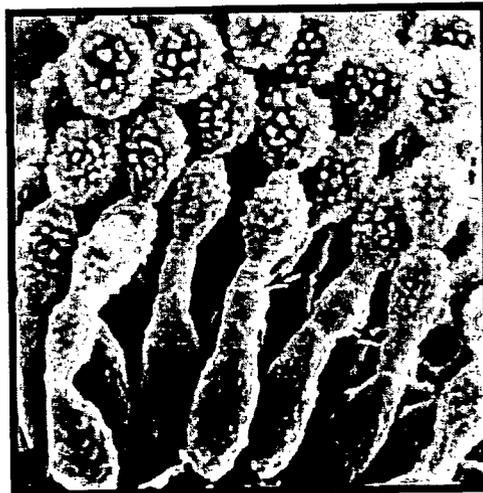


Figura 14. Cadenas de conidias de *Aspergillus parasiticus*. Las que se encuentran en la base de las cadenas (flechas) son más jóvenes y apenas se están desarrollando (3,000 X).

Las aflatoxinas son las sustancias más cancerígenas en la naturaleza (IARC, 1982), y existe una correlación positiva entre casos de cáncer en humanos e ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas. Los estudios de incidencia de la contaminación del maíz por *A. flavus* y por aflatoxinas han ilustrado que puede ser variable en las diferentes regiones del país. En Tamaulipas durante 1985 a 1988, *A. flavus* presentó sólo el 2% de la población fúngica y los niveles de contaminación de aflatoxina fueron bajos. Sin embargo, en 1989 la situación fue diferente y los niveles de contaminación en campo y almacén por aflatoxina fueron altos.

Por el contrario, en Guanajuato, otro estado importante en la producción de maíz, en 1982, 1987, 1999 y 2000, *A. flavus* representó el 0.5% de la población fúngica y los niveles de contaminación con aflatoxina fueron bajos, tanto en campo como en almacén (Guzmán, 1997 y 2001). Estudios realizados sobre la síntesis de aflatoxinas durante el cultivo del maíz indican que la humedad relativa media (50.7%) y lluvias irregulares no son usualmente favorables para la síntesis de aflatoxinas en el Estado de Guanajuato (Bucio *et al.*, 2001).

### **Micotoxinas en los alimentos**

Uno de los efectos más importantes de las pudriciones de postcosecha de frutos, hortalizas y especialmente de semillas, además del deterioro de los alimentos por hongos es la inducción de micotoxicosis, es decir, enfermedades de animales y del hombre ocasionadas por el consumo de forrajes y alimentos invadidos por hongos que producen micotoxinas (Figura 15). Estos compuestos son sustancias químicas, producidas por hongos, pueden causar enfermedad incluso la muerte de humanos y animales si consumen alimentos que las contienen. La enfermedad incluye cánceres, hemorragias, tumores, abortos, defectos de nacimiento, problemas digestivos y diarreas; por lo que representan una amenaza constante para la salud, no sólo cuando existen en concentraciones relativamente altas y ocasionan síntomas de enfermedades agudas; sino quizá aún más, debido a los efectos crónicos que ejercen en la salud y la productividad.

La mayoría de las micotoxicosis se ocasionan por hongos comunes y de amplia distribución como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Stachybotrys*. Los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* producen sus toxinas principalmente en semillas almacenadas (Figuras 16 y 17), heno o alimentos y forrajes procesados con fines comerciales, aunque la infección de las semillas a menudo se efectúa en el campo (Agrios, 2001).

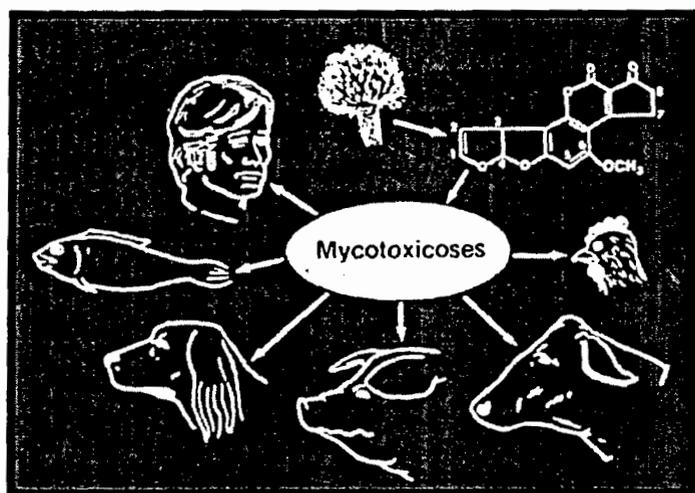


Figura 15. Modo de intoxicación por micotoxinas en humanos y animales

### **Toxinas producidas por el género *Aspergillus***

Las aflatoxinas fueron descubiertas en 1961 en Inglaterra, aunque se sabe que 15 especies de *Aspergillus* y varias de *Penicillium* las producen estas toxinas. Su nombre se debe a que originalmente se supo que eran producidas por *A. flavus*, pero en la actualidad *A. flavus* y *A. parasiticus* han sido confirmados como productores de aflatoxinas.

Las micotoxinas permanecen en los alimentos aun después de que el hongo muere, y son relativamente estables bajo las condiciones usuales de cocimiento y procesamiento de los alimentos. Este tipo de toxinas originan problemas en el mercadeo de los granos, en el proceso y en su consumo; muchos países incluyendo a México y Estados Unidos, han establecido tolerancias para las aflatoxinas en los alimentos (maíz y

sorgo). Su presencia en alimentos ingeridos por los animales, es muy dañino no solamente al animal, sino también porque sus residuos pueden aparecer en la carne, en los huevos y pueden ser excretados en la leche (González, 1995).

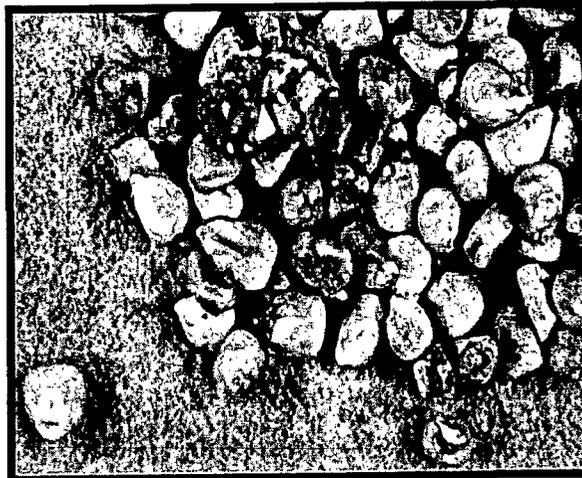


Figura 16. Semillas de maíz contaminadas por *Aspergillus flavus*.



Figura 17. Semillas de cacahuate contaminadas por *Aspergillus flavus*.

El problema de las toxinas se conoce desde hace cientos de años, sin embargo, hasta apenas unas décadas, este problema tomó la importancia que merece cuando en el año de 1960 se reconocieron los potentes efectos de las aflatoxinas producidas por *A. flavus*. La harina de cacahuate contaminada causó la muerte a 100,000 pavos en Inglaterra; desde entonces, este tipo de toxinas ha recibido una gran atención por su probada peligrosidad; por lo tanto, la presencia de micotoxinas en alimentos actualmente se regula en muchos países del mundo([www.aflatoxin.info/food\\_safeti.asp](http://www.aflatoxin.info/food_safeti.asp)).

Las aflatoxinas se dividen en varias clases, de las cuales las más importantes son: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Figura 16), esta designación alfanumérica se deriva del color de la fluorescencia azul [blue (B)] o verde, [green (G)], que se observa bajo luz ultravioleta convencional a 350 nm (Hayes, 1993). Las más comunes en los cereales son las B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> resultantes de la contaminación por *A. flavus*. Los metabolitos G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> son algunas veces encontrados en maíz contaminado con *A. parasiticus*.

La presencia de estos hongos no necesariamente indica que el grano está contaminado con las toxinas, por ejemplo *A. flavus* no produce aflatoxinas cuando crece y compite con otros microorganismos o cuando las condiciones ambientales no son óptimas. El maíz es el cereal más susceptible a ser contaminado con aflatoxinas, esto se debe a que el grano está protegido por las hojas de la mazorca, creando un microambiente ideal para el desarrollo del hongo.

La incidencia de aflatoxinas también se vincula con el desarrollo de insectos, como el gusano elotero (*Heliothis zea*) que perfora las hojas que resguardan al elote para alimentarse de los granos en desarrollo, por lo que su presencia en el maíz ha creado muchos dolores de cabeza en la industria almacenadora. Teóricamente las aflatoxinas están presentes en cualquier materia orgánica sujeta a invasión por hongos. En la práctica están más asociadas a algunos granos y semillas como: cacahuate, nuez, pistaches y algodón (Serna, 1996).

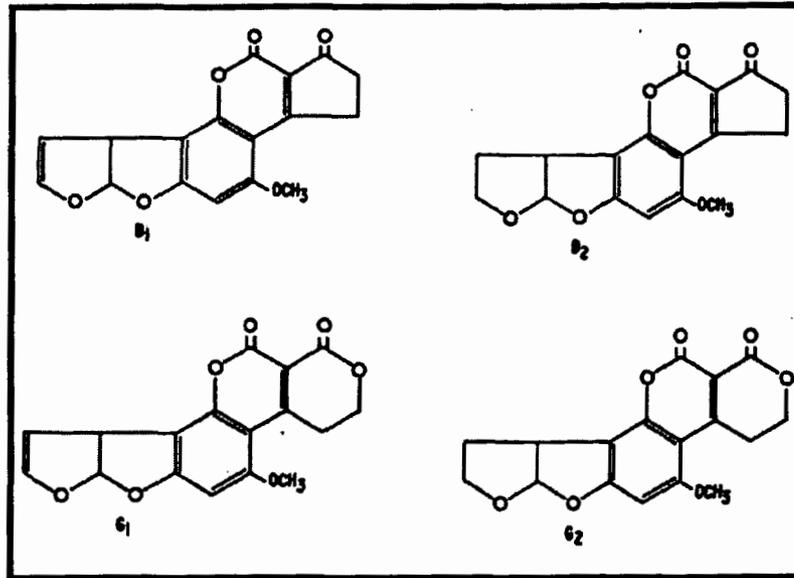


Figura 18. Estructura química de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

### Efecto de las aflatoxinas en la salud humana y animal

De los metabolitos producidos por *A. flavus*, el B-1 es el más abundante, es carcinógeno y mutagénico, para el hombre y animales; 0.4 ppb pueden causar tumores en el hígado de truchas. Las aflatoxinas están presentes en cantidades biológicamente significativa en la dieta humana de las regiones tropicales de África sureste de Asia e India, en comparación con los países del norte de Europa, Estados Unidos y Canadá (González, 1995).

Un problema adicional causado por las micotoxinas, es la reducción de la productividad en animales que han consumido grano contaminado, esto causa pérdidas económicas considerables, que pueden permanecer ignoradas. A menudo los animales son alimentados con granos que han sido separados de la cosecha debido a que su uso no es apropiado para consumo humano, si este grano es mezclado con grano sano en las debidas proporciones, su efecto en los animales será mínimo, sin embargo, si se consume sin mezclarlo, la concentración de micotoxina será alta causando enfermedad y hasta la muerte de los animales ([www.fao.org/jmpho/hilibraryhtm](http://www.fao.org/jmpho/hilibraryhtm)).

La aflatoxicosis en humanos ha sido reportada en muchos países de África y Asia como la India, China, Tailandia, donde las condiciones ambientales favorecen la contaminación por aflatoxinas, y la amenaza a la salud humana por aflatoxinas es muy alta. Estudios realizados (1994-2001) revelaron la incidencia de cáncer en lugares como China y el norte de África por la exposición a aflatoxinas

### **Asociación de las aflatoxinas con los alimentos**

La presencia de micotoxinas en los productos alimenticios, depende de cepas específicas de hongos y éstas cepas de hongos están sujetas a la influencia de factores ambientales como la humedad y la temperatura. Por lo tanto, la contaminación micotóxica de los productos alimenticios puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, métodos de producción, tipos de almacenamiento y también según el tipo de alimento. Algunos productos alimenticios son sustratos más aptos que otros para el crecimiento de los hongos y producción de toxinas (González, 1995).

Los hongos que producen micotoxinas se encuentran en todas partes, aunque no haya presencia visible de hongos, ni cambios de aspecto, olor o sabor en el producto, estos pueden estar contaminados. No todos los hongos producen estas sustancias, ni todos los granos contaminados con hongos son tóxicos.

Las micotoxinas afectan más a los niños que a los adultos, ya que sus cuerpos están creciendo rápidamente y las toxinas dañarán sus células de crecimiento. Los efectos pueden presentarse a largo plazo causándoles problemas serios cuando sean adultos ([http://www.abe.iastate.edu/AE469\\_569/CornMolds/Aspergillus\\_Flavus.htm](http://www.abe.iastate.edu/AE469_569/CornMolds/Aspergillus_Flavus.htm)).

Los alimentos contaminados con aflatoxinas incluyen cereales (maíz, sorgo, mijo, arroz, trigo, etc.); semillas (cacahuete, frijol soya, algodón, etc.), especias (chile, pimienta negra, cilantro, etc.), almendras, pistachos, nuez y leche son la mejor vía mediante la cual el hombre así como los animales son expuestos a las aflatoxinas, sin embargo, también han sido reportadas exposición ocupacional a aflatoxinas de agricultores y ganaderos (Sorenson *et al.*, 1984).

## **Patogenia y signos clínicos**

Diversos estudios nos muestran que la exposición a grandes dosis de aflatoxinas (>6000mg) pueden causar una toxicidad aguda (carcinógeno) con efectos letales, así como exposición a dosis mas pequeñas pero por períodos de tiempo prolongados. La toxicidad es aguda cuando son ingeridas grandes dosis de aflatoxinas, el principal órgano receptor de las aflatoxinas es el hígado. Algunos signos de aflatoxicosis son hinchazón de las extremidades, dolor abdominal y vomito. El caso más severo fue reportado en el norte de la India en 1974, donde el 25% de la población expuesta murió después de ingerir maíz ahogado con niveles de aflatoxinas de 6,250 a 15,600 mg/kg (Groopman *et al.*, 1996).

## HIPÓTESIS

La hipótesis planteada fue que las formulaciones o mezclas de los bioproductos quitosan y resina de *L. tridentata*, solos y combinados tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*; así como de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*; microorganismos todos de importancia por los efectos negativos que ocasionan en la salud humana. Con base a esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos.

### OBJETIVO GENERAL

Analizar la efectividad *in vitro* de dos bioproductos, uno de origen vegetal (extracto de resina de *L. tridentata*) y otro de origen animal (quitosan), así como las mezclas de ambos compuestos, contra siete cepas de bacterias, que incluyen cinco gram negativas y dos gram positivas; así como de tres especies de hongos fitopatógenos, los cuales también son de importancia para la agricultura y la salud humana.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar en condiciones *in vitro* el efecto bactericida contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *S. aureus* y *E. faecalis*, así como la acción antifúngica contra *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*, de los extractos hidrosolubles de gobernadora obtenidos mediante tres solventes: etanol, metanol e hidróxido de sodio.
2. Comparar el efecto bactericida y fungicida de tres concentraciones (20, 30 y 40%) de sólidos totales o ingrediente activo, de los tres extractos de gobernadora antes mencionados, así como el efecto antibacterial y antifúngico de soluciones del biopolímero quitosan.

3. Determinar *in vitro* el posible efecto sinérgico de las formulaciones o mezclas de quitosan y *L. tridentata*, en la inhibición de los microorganismos señalados.
  
4. Generar información preliminar sobre la termoestabilidad de los extractos de *L. tridentata* y de la actividad antimicrobial de los dos bioproductos, con la finalidad de que los datos obtenidos en este trabajo sirvan de base para realizar trabajos posteriores de extracción bajo condiciones de planta piloto y para efectuar estudios agronómicos *in vivo* e *in planta* utilizando estos productos orgánicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) del sistema CONACYT, ubicado en Saltillo, Coahuila.

### **Colecta de follaje y cribado de las hojas secas de *L. tridentata***

Las muestras de hojas y ramas pequeñas de gobernadora fueron colectadas de poblaciones naturales de este arbusto en las cercanías rurales de Saltillo. Las muestras se colectaron tratando de obtener sólo ramas y hojas jóvenes del tercio superior de las ramas de los arbustos. El material colectado se secó al aire libre en un área de trabajo y después se guardó en bolsas de papel para ser llevadas a una estufa con recirculación de aire en donde se mantuvieron a temperatura constante de 65°C por un período de 5 días. El material seco se desfolió y tamizó con una malla metálica del No. 20 con lo que se obtuvo el material vegetativo listo para ser utilizado en el proceso de extracción de la resina con los diferentes solventes.

### **Preparación de los extractos de resina**

Para la determinación de la concentración de la resina o principios bioactivos presentes en el material vegetativo de gobernadora, se utilizaron los solventes orgánicos metanol y etanol en grado analítico, para lo cual se utilizó un equipo de extracción Soxhlet (ASTM, 1993). El material cribado se colocó en contenedores de celulosa poniendo 10 g de las hojas secas y 250 ml de solvente, la extracción se realizó independientemente y por triplicado.

La cuantificación de la resina extraída se hizo mediante la siguiente ecuación:

$$Me = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100$$

Donde Me = Material extraído (%)

$W_1$  = Peso de la muestra antes de la extracción (g)

$W_2$  = Peso de la muestra después de la extracción (g)

## **Determinación de la concentración de NDGA presente en la resina de gobernadora**

Debido a que es muy importante determinar la composición de los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales, así como cuantificar el compuesto en mayor concentración presente en la resina de la gobernadora se decidió realizar un análisis cuantitativo del ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), el cual es considerado por algunos investigadores como el principal ingrediente activo en los extractos de este arbusto.

Con base a lo antes señalado se realizaron análisis mediante la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), equipado con un detector ultravioleta; esta técnica es sencilla y rápida, la cual permite hacer determinaciones de una gran cantidad de biocompuestos a partir de los extractos crudos de plantas (Noguera-Ortí *et al.*, 2000).

Por lo tanto, para determinar la concentración de NDGA, se realizó un HPLC utilizando la técnica de fase inversa, empleando empaques de sílica recubierta con octadecano (columna C<sub>18</sub>) utilizando como fase móvil isocrática una mezcla de solventes metanol:agua en porcentajes de 70:30 v/v, con medio ligeramente ácido promovido por la adición de unas gotas de ácido acético al eluente en uso.

Los estándares del ingrediente activo NDGA utilizados oscilan en concentraciones de 100, 200, 300, 500 y 1,000 ppm, empleando metanol (grado HPLC) como solvente de aforación; la curva de calibración se obtuvo de forma lineal ( $r > 0.9998$ ) con límites de detección altos. Las muestras fueron preparadas por separado disolviendo 100 mg de resina de gobernadora obtenida con cada uno de los solventes, aforando a 100 ml con metanol.

Posteriormente, para contar con extracto suficiente para los bioensayos, el material vegetativo se sumergió durante 12 h en contenedores de 20 L por separado en cada solvente, el licor restante se separó del material vegetativo con una manta, luego se filtró al vacío a través de papel filtro Whatam No. 1 en un embudo de cerámica de 40 cm de diámetro (Lira *et al.*, 2003). Utilizando el reactor Brington modelo X 1000 y un evaporador rotativo marca Büchni, modelo R-215, se evaporó el total del solvente remanente. El proceso de hidrosolubilización de los extractos se realizó empleando una solución acuosa de hidróxido de sodio al 3%, de acuerdo al procedimiento desarrollado y patentado por el CIQA (Villarreal *et al.*, 1998).

### **Microorganismos estudiados**

Se utilizaron siete cepas de bacterias adquiridas principalmente del American Type Culture Collection (ATCC), de las cuales cuatro fueron gram negativas: *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. typhimurium* (ATCC 1334), *P. vulgaris* (ATCC 49132) y *K. oxytoca* (ATCC 49131); dos gram positivas *S. aureus* (ATCC 29213) y *E. faecalis* (ATCC 29212); así como tres hongos: *A. parasiticus* (ATCC 15517), *A. niger* (ATCC 6275) y *A. flavus*, éste último cual fue proporcionado por el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### **Tratamientos preparados con extractos de *L. tridentata* o gobernadora**

Para la preparación de las concentraciones de los extractos de gobernadora se pesaron en una balanza analítica los gramos de cada concentración de los extractos hidrosolubles de *L. tridentata* (L). Lo anterior tomando en cuenta que 1 mg equivale a 1 ppm diluido en 1,000 ml de agua. En el Cuadro 2 se muestran los tratamientos evaluados de los diferentes extractos de *L. tridentata* (metanólico, etanólico y sódico), además, se incluyeron un testigo absoluto (PDA) y un testigo químico (clorothalonil a 2,000 ppm). Cada uno de los tratamientos así como los testigos mencionados se aplicaron con cinco repeticiones en los bioensayos realizados.

## Preparación de los tratamientos de quitosan (Q)

Se utilizó quitosan comercial de la marca Sigma Aldrich; pesando la cantidad suficiente para preparar las diferentes concentraciones en partes por millón (Cuadro 3). Se disolvió en 100 ml de agua destilada, con 2 ml de ácido acético glacial y se calentó durante 24 horas con agitación constante. La solución fue ajustada a un pH de 5.5 con soluciones normales de NaOH, finalmente se le agregó 0.1 ml de Tween 80 (Bautista *et al.*, 2003).

Cuadro 2. Dosis de extractos de *Larrea tridentata* a tres concentraciones de ingrediente activo\* aplicadas en tres bioensayos contra *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*

Extractos empleado	Dosis (ppm)
	31.25
Etanólico	62.5
	125
Metanólico	250
	500
Sódico	1000
	2000
	4000

\*Las concentraciones de ingrediente activo fueron: 20, 30 y 40%.

Cuadro 3. Concentraciones de soluciones de quitosan aplicadas en el bioensayo número cuatro contra *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*

Dosis (ppm)
31.25
62.5
125
250
500
1,000
2,000
4,000
8,000
16,000
32,000

Con base a ensayos preliminares sobre la bioactividad de los diversos extractos utilizados y de la concentración del ingrediente activo (IA) de los mismos, se detectó que el extracto etanólico al 30% de IA fue el que inhibió con mayor contundencia los microorganismos seleccionados, debido a esta razón, dicho extracto y a esa concentración, fue el que se utilizó en los bioensayos posteriores.

#### **Tratamientos con mezclas de quitosan/*Larrea***

En una solución conocida de quitosan previamente preparada se adicionaron los gramos de *L. tridentata* correspondientes a cada concentración, la mezcla así preparada se mantenía en agitación constante para lograr una solución homogénea, la cual posteriormente se empleaba en los bioensayos contra los hongos fitopatógenos

Cuadro 4. Concentraciones de las mezclas quitosan/*Larrea* aplicadas contra los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*

Mezclas	Dosis (ppm)
	500/500
Quitosan	500/1000
+	500/2000
Extracto	1000/500
etanólico	1000/1000
al 30%	1000/2000
IA	2000/500
	2000/1000
	2000/2000

#### Tratamientos aplicados contra las bacterias

Cuadro 5. Concentraciones del extracto de *L. tridentata* aplicadas contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *K. oxytoca*, *S. aureus* y *E. faecalis*

Dosis (ppm)
31.25
62.5
125
250
500
1,000
2,000

Cuadro 6. Concentraciones de quitosan aplicadas en el bioensayo número siete contra *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, *E. faecalis*

Dosis (ppm)
500
1,000
2,000
4,000
8,000
16,000
32,000

Cuadro 7. Concentraciones de los bioproductos quitosan/*Larrea* aplicadas *in vitro* en el bioensayo ocho contra siete cepas bacterianas (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, *E. faecalis*)

*Dosis (ppm)
500/500
500/1000
500/2000
1000/500
1000/1000
1000/2000
2000/500
2000/1000
2000/2000

\*Se utilizó el extracto etanólico de *L. tridentata* al 30% (IA) mezclado con quitosan.

## **Preparación de los medios de cultivo para bacterias y hongos**

Para los experimentos *in vitro* con bacterias se utilizaron los medios Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), Agar Mueller Hinton (MHA); y para los hongos se utilizó Agar Papa Dextrosa (PDA) todos de la marca DIFCO. La preparación fue basada en las recomendaciones del fabricante, por lo tanto, se pesó la cantidad de medio suficiente para cada uno de los bioensayos, se disolvió en agua destilada y se calentó a punto de ebullición durante 1 minuto para su disolución completa, se ajustó el pH óptimo para cada uno de los microorganismos y se midieron los volúmenes requeridos para cada tratamiento (MHA y PDA) en recipientes previamente identificados que contenían cada una de las concentraciones de los productos a evaluar; tomando en cuenta que la proporción de medio de cultivo fue de 20 ml/caja petri y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio envenenado se vació bajo condiciones asépticas en cajas petri estériles y se dejó solidificar. Posteriormente se procedió a la siembra.

### **Siembra de los hongos**

Para determinar el efecto antifúngico de los tratamientos de quitosan, *L. tridentata* y las mezclas de ambos productos, la evaluación se realizó de acuerdo al método del medio envenenado, agregando la concentración de cada tratamiento al medio de cultivo (2/10 p/v) y vaciándolo posteriormente a las cajas Petri. Una vez solidificado el medio de cultivo, se tomó un explante (5 mm Ø) del cultivo puro en PDA de *Aspergillus* con la ayuda de un sacabocados. Dicho explante se depositó al centro de la caja Petri con el medio envenenado y las placas control que contienen únicamente PDA (Bautista *et al.*, 2003), luego se sellaron para evitar contaminación y se incubaron a 25°C hasta que el crecimiento micelial llenó la caja del testigo absoluto (7 días). Se midió el crecimiento radial micelial en mm con la ayuda de un vernier para determinar el efecto antifúngico. Este mismo procedimiento se siguió para cada uno de los bioensayos.

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial radial de *Aspergillus* de las cajas Petri en cada tratamiento aplicado, así como en los testigos se utilizó una ecuación la siguiente ecuación matemática.

$$PI = 100 - [(Cr * 100) / Rp]$$

Donde:

PI = Inhibición del crecimiento del hongo (%)

Cr = Crecimiento micelial radial del hongo (mm)

Rp = Radio de la caja petri (mm)

### **Siembra de las bacterias**

Se tomó un cultivo de cada una de las cepas de bacterias conservadas en cajas con MHA con un asa bacteriológica y se sembraron en tubos que contenían BHI, se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h; se colocaron 10 µl de este cultivo en cajas con el medio envenenado dividida en 5 secciones y se extendió el inóculo mediante la técnica de estriado y se incubaron a 37°C por 24 h. Este procedimiento se siguió para cada una de las siete cepas que se evaluaron y con cada tratamiento. Cada uno de los bioensayos se realizó por duplicado.

Para determinar el efecto bactericida, se inocularon tubos con 5 ml de caldo BHI con cada una de las placas con un asa bacteriológica. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 18 a 24 h, el crecimiento bacterial se indicó por la presencia de una pastilla blanca en el fondo del tubo.

### **Análisis estadístico de los resultados**

Se empleó un diseño estadístico completamente al azar utilizando el paquete estadístico computarizado versión 2.5 de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el cual se realizó una comparación de medias para determinar la diferencia mínima significativa (DMS) entre tratamientos con un nivel de significancia del 1% (0.01).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En relación con el análisis realizado mediante la técnica HPLC para determinar la concentración de ácido nordihidroguaiaretico del ingrediente activo (NDGA) presente en la resina de gobernadora con cuatro solventes orgánicos (cloroformo, etanol, metanol y hexano) de diferente polaridad química, en el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos de la concentración de NDGA en la resina pura de gobernadora. En este cuadro claramente se observa que la mayor cantidad de este ácido orgánico se obtuvo con cloroformo (23.58%), seguido por metanol, etanol y hexano, con los cuales se extrajeron 17.5, 8.3 y 4.6% de NDGA, respectivamente.

Cuadro 8. Determinación de la concentración de ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), extraído con diferentes solventes orgánicos de la resina de *L. tridentata* mediante la técnica de HPLC.

Solvente Utilizado	Concentración de NDGA (%)
Cloroformo	23.58
Metanol	17.5
Etanol	8.3
Hexano	4.6

La posible explicación por la cual se extrajo una mayor o menor cantidad de este metabolito secundario con los cuatro solventes empleados, se debe quizá a la diferente polaridad química, la cual es intrínseca de cada producto. En este caso, el cloroformo siendo un producto clorado mostró que para esta técnica analítica es más selectivo en cuanto a un poder extractivo de NDGA, en comparación con los otros tres solventes utilizados.

## EFFECTO ANTIBACTERIAL DE LOS BIOPRODUCTOS EMPLEADOS

### Efectividad de los extractos de *L. tridentata* contra bacterias gram negativas y gram positivas.

Siete especies de bacterias causantes de contaminación por alimentos fueron utilizadas para evaluar el efecto antibacterial del biopolímero quitosan, y los extractos de *L. tridentata* obtenidos mediante dos solventes orgánicos (etanol y metanol), ambos con una concentración al 30% de ingrediente activo. El extracto etanólico mostró un claro efecto inhibitorio contra *E. coli* a la concentración de 125 ppm y un efecto inhibitorio contundente contra las otras seis bacterias a la concentración máxima evaluada de 1,000 ppm (Cuadro 9). Por lo tanto, esta enterobacteria resultó ser la más vulnerable al efecto del extracto antes mencionado; estos resultados son similares a los publicados por Verástegui *et al.*, (1996), sin embargo, estos autores reportan que la MIC (concentración mínima inhibitoria) obtenida por ellos fue de 10,000 ppm del extracto de *L. tridentata*, mientras que en el presente trabajo la MIC fue diez veces más baja para inhibir a *P. vulgaris*; por otro lado, los autores antes mencionados consignaron que sus extractos acuosos de *Larrea* no inhibieron a *E. coli* y *S. typhimurium*, mientras que nuestros extractos hidrosolubles de *Larrea* inhibieron por completo a estos dos microorganismos a la baja concentración de 1,000 ppm.

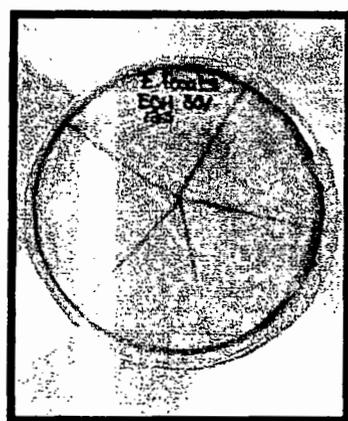
Por su parte, el extracto metanólico mostró su máxima efectividad inhibitoria contra *E. coli*, *P. vulgaris*, *E. faecalis* a 500 ppm, mientras que la inhibición total en *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se logró a 1,000 ppm, excepto para *S. typhimurium*, ya que para inhibir por completo esta bacteria se requirió la concentración de 2,000 ppm (Cuadro 10). Estos resultados son muy satisfactorios, ya que al comparar el efecto de los extractos hidrosolubles de *L. tridentata* contra el antibiótico sintético Ampicilina, los extractos mostraron ser eficaces a concentraciones más bajas, que el antibiótico sintético. En un reciente artículo Peñalver *et al.* (2005) reporta la actividad antibacterial de cinco aceites esenciales de otras tantas especies de orégano contra cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. Estos autores encontraron que la MIC contra *E. coli* y *S.*

*typhimurium* fue de  $\pm 2\%$  (v/v). Los resultados de este trabajo confirmaron la actividad de algunos aceites esenciales en el tratamiento preventivo de enfermedades de aves y cerdos causadas por *Salmonella*.

Cuadro 9. Efecto de diferentes concentraciones (ppm) del extracto etanólico al 30% de IA en el crecimiento *in vitro* de siete cepas bacterianas.

Bacterias	31.25	62.5	125	250	500	1000	TA	TQ
<i>E. coli</i>	5*	5	SC	SC	SC	SC	5	SC
<i>P. vulgaris</i>	5	5	5	5	SC	SC	5	5
<i>K. oxytoca</i>	5	5	5	5	2	SC	5	SC
<i>P. aeruginosa</i>	5	5	5	5	5	SC	5	5
<i>E. faecalis</i>	5	5	SC	SC	SC	SC	5	SC
<i>S. aureus</i>	5	5	5	5	5	SC	5	SC
<i>S. typhimurium</i>	5	5	5	5	5	SC	5	SC

\*Los números dentro del cuadro indican crecimiento bacteriano en igual número de repeticiones; SC: Sin crecimiento; TA: Testigo absoluto (medio de cultivo AMH); TQ: Testigo químico (Ampicilina).



(A)



(B)

Figura 19. Cajas petri en las que se detectó la inhibición total *in vitro* de (A) *E. faecalis* y (B) de *E. coli* a 125 ppm con el extracto etanólico al 30% de IA.

Cuadro 10. Efecto de diferentes concentraciones (ppm) del extracto metanólico al 30% de IA en el crecimiento *in vitro* de siete cepas bacterianas.

Bacterias	31.25	62.5	125	250	500	1,000	2,000	TA	TQ
<i>E. coli</i>	5*	5	5	5	SC	SC	SC	5	SC
<i>P. vulgaris</i>	5	5	5	5	SC	SC	SC	5	5
<i>K. oxytoca</i>	5	5	5	5	5	SC	SC	5	SC
<i>P. aeruginosa</i>	5	5	5	5	5	SC	SC	5	5
<i>E. faecalis</i>	5	5	5	5	SC	SC	SC	5	SC
<i>S. aureus</i>	5	5	5	5	SC	SC	SC	5	SC
<i>S. typhimurium</i>	5	5	5	5	5	5	SC	5	SC

\*Los números dentro del cuadro indican crecimiento bacteriano en igual número de repeticiones; SC: sin crecimiento; TA: testigo absoluto (medio de cultivo MHA); TQ: testigo químico (Ampicilina).

### Efecto antibacteriano de las soluciones de quitosano

En cuanto al efecto obtenido de las diferentes concentraciones evaluadas de quitosano, en la serie de bioensayos realizados, este biopolímero no mostró efecto inhibitorio alguno contra ninguna de las cepas, aún a la máxima concentración evaluada que fue de 32,000 ppm (Cuadro 11). Estos resultados son una clara indicación de que este producto de origen animal no tiene un efecto inhibitorio bajo condiciones *in vitro* contra diferentes cepas de enterobacterias causantes de graves enfermedades en humanos y de contaminación en alimentos. Un trabajo experimental reportado por No *et al.* (2002), en el que se comparó la actividad antibacteriana de soluciones de quitosano con diferentes pesos moleculares, señala que los oligómeros de quitosano de elevado peso molecular sí mostraron tener un marcado efecto antibacteriano, mientras que los de bajo peso molecular no mostraron dicho efecto contra *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. typhimurium*. Es posible que esta sea la razón por la cual en nuestro trabajo tampoco se detectó un claro efecto inhibitorio de las soluciones de quitosano, ya que el biopolímero empleado fue de bajo peso molecular (20,000 cps). De manera similar a lo reportado en este trabajo, Wang (1992), tampoco encontró que soluciones de quitosano al 0.5% resultaran efectivas para inhibir a *S. typhimurium*.

Cuadro 11. Efecto del quitosan a diferentes concentraciones (ppm) en el crecimiento *in vitro* de siete cepas bacterianas.

Bacterias	500	1,000	2,000	4,000	8,000	16,000	32,000	TA	TQ
<i>E. coli</i>	*5	5	5	5	5	5	5	5	SC
<i>P. vulgaris</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>K. oxytoca</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	SC
<i>P. aeruginosa</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>E. faecalis</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	SC
<i>S. aureus</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	SC
<i>S. typhimurium</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	SC

\*Los números dentro del cuadro indican crecimiento bacterial en igual número de repeticiones; TA: testigo absoluto (medio de cultivo MHA); TQ: testigo químico (Ampicilina).

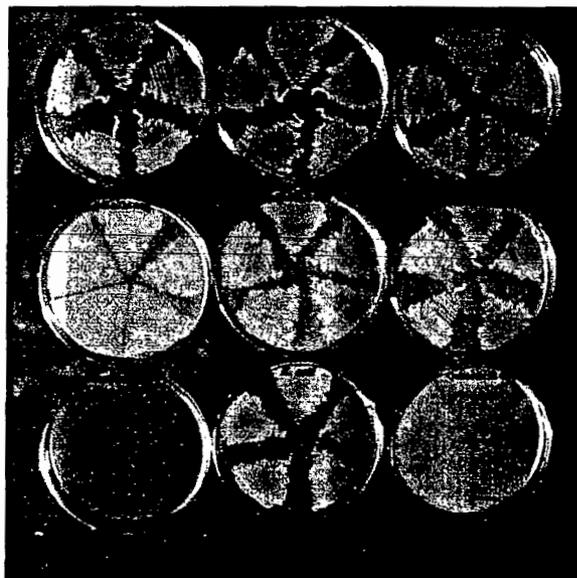


Figura 20. Cajas petri en las que se aprecia el crecimiento de la bacteria *E. coli*, lo cual indica la falta de efectividad antibacterial del quitosan en el rango de concentraciones desde 500 a 32,000 ppm de este biopolímero.

## Efecto antibacterial de las mezclas quitosan/*Larrea*

Cuando los extractos de gobernadora fueron mezclados o formulados, teniendo como finalidad encontrar un posible efecto sinérgico entre ambos bioproductos, los resultados generados en los diversos bioensayos de este trabajo experimental mostraron una baja efectividad inhibitoria como compuestos con actividad antibacterial, en comparación con los efectos reportados por el extracto etanólico solo, al 30% de IA (Cuadro 12). Los resultados obtenidos con estas mezclas indicaron un efecto antagónico, ya que al incrementar la concentración de quitosan de 500 a 2,000 ppm la efectividad inhibitoria se redujo claramente.

Cuadro 12. Efecto de las mezclas quitosan/*Larrea*\* en el crecimiento *in vitro* de siete cepas bacterianas.

Bacterias	500/500	500/1000	500/2000	1000/500	1000/1000	1000/2000	2000/500	2000/1000	2000/2000
<i>E. coli</i>	5*	2	SC	5	5	SC	5	5	SC
<i>P. vulgaris</i>	SC	SC	SC	5	SC	SC	5	SC	SC
<i>K. oxytoca</i>	5	SC	SC	5	SC	SC	5	SC	SC
<i>P. aeruginosa</i>	5	SC	SC	5	SC	SC	5	SC	SC
<i>E. faecalis</i>	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
<i>S. aureus</i>	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC	SC
<i>S. typhimurium</i>	SC	SC	SC	5	SC	SC	5	SC	SC

\*Los números indican crecimiento bacterial en repeticiones; SC: sin crecimiento; TA: testigo absoluto (Medio de cultivo MHA); ♦extracto etanólico al 30% de IA.

## EFFECTO ANTIFÚNGICO DE LOS BIOPRODUCTOS EMPLEADOS

### Inhibición de *A. niger* por los extractos de *L. tridentata*

Los resultados obtenidos con el extracto etanólico a tres concentraciones de ingrediente activo (20, 30 y 40% IA), contra *A. niger* se muestran en la Figura 21. La información muestra que a medida que se incrementaron las dosis aplicadas a partir de 31.25 ppm, la inhibición del hongo se incrementó paulatinamente de manera similar para

las tres concentraciones, encontrándose que a partir de 1,000 ppm prácticamente las tres concentraciones redujeron por completo el crecimiento micelial del mismo. Estos resultados sugieren que la concentración de 20% de IA es igualmente eficaz contra este hongo, en comparación con las otras dos concentraciones más elevadas. Hasta lo mejor de nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta el efecto antifúngico de los extractos de *L. tridentata* en *A. niger*; sin embargo, el trabajo realizado por Vargas-Arispuro *et al.* (1997) sobre la actividad antiaflatoxigénica *in vitro* de diez extractos vegetales, se destaca el efecto de *L. tridentata* obtenido con diclorometano, ya que inhibió en 92 y 86% el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente.

Al comparar el efecto antifúngico de los tres extractos (etanólico, metanólico y sódico) a la misma concentración de IA (30%), se logró observar un marcado efecto inhibitorio diferencial entre ellos (Figura 22), ya que el extracto etanólico mostró la mayor efectividad biológica, debido a que a partir de la dosis de 1,000 ppm se logró una inhibición total (100%), mientras que a esa misma dosis el extracto metanólico inhibió el crecimiento micelial del hongo en 80%; en cambio, la menor efectividad fue mostrada por el extracto sódico, ya que a la dosis de 1,000 ppm sólo inhibió en 20% el crecimiento del hongo. Por lo tanto, estos resultados indican claramente que el extracto etanólico fue superior en su actividad antifúngica en comparación con los otros dos extractos. En un trabajo realizado por Gordillo-Meza (2004), también se encontró que al comparar el efecto antifúngico contra el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* de los extractos sódico, metanólico y etanólico de *L. tridentata*, el extracto sódico resultó ser el menos eficaz para inhibir el crecimiento micelial del hongo antes señalado.

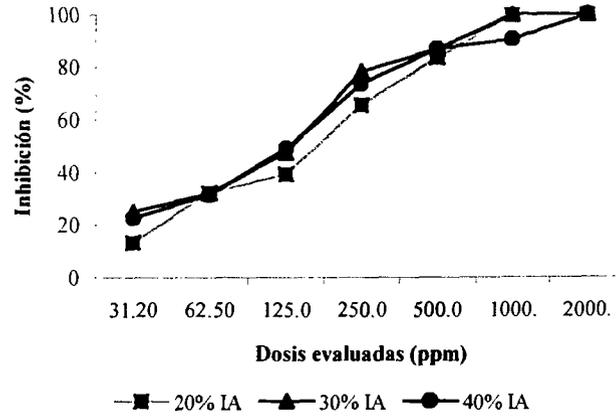


Figura 21. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *L. tridentata* a tres concentraciones de ingrediente activo contra el hongo *A. niger*.

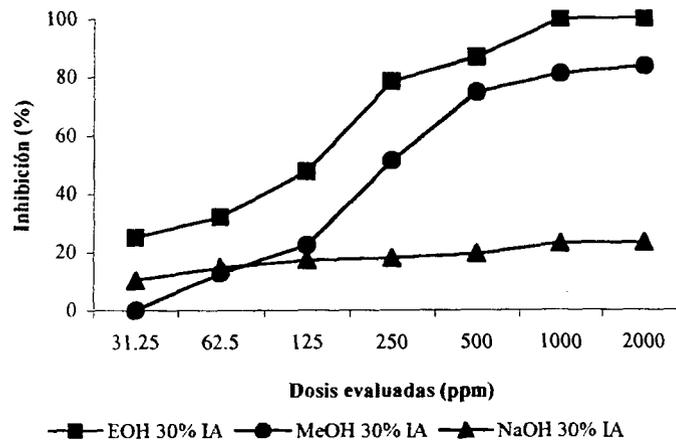


Figura 22. Comparación del efecto inhibitorio de tres extractos (etanólico, metanólico y sódico) de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo contra el hongo *A. niger*.

## Efecto inhibitorio de los extractos de *L. tridentata* contra *A. flavus*

La inhibición de este hongo en función de las dosis evaluadas del extracto etanólico (EOH) y el efecto de las tres concentraciones de IA del mismo extracto se ilustra gráficamente en la Figura 23. Aquí se aprecia claramente que a dosis bajas la concentración de 20% IA produjo la menor inhibición del hongo, sin embargo, la efectividad de las tres concentraciones de IA fue similar a partir de 500 ppm. Esta figura muestra que con ninguna de las tres concentraciones se logró inhibir por completo el crecimiento micelial a 2,000 ppm, ya que la máxima inhibición obtenida fue de 83%. Sin embargo, con 4,000 ppm sí se logró una inhibición del 100%. Por otro lado, es interesante señalar que el hongo *A. niger* resultó ser más susceptible que *A. flavus*; ya que el primero se inhibió por completo a partir de 1,000 ppm. Los extractos de *L. tridentata* obtenidos del norte de Sonora por Vargas-Arispuro *et al.* (1997) también mostraron ser eficaces para inhibir el crecimiento de *A. flavus* ya que con 500 ppm del extracto de diclorometano inhibieron en 96% el crecimiento micelial de este hongo, lo cual resultó ser significativamente superior que la inhibición encontrada con los extractos de plantas de *Baccharis glutinosam*, *Proboscidea paraviflora*, *Euphorbia eriantha* y *Chenopodium ambrosiodes*.

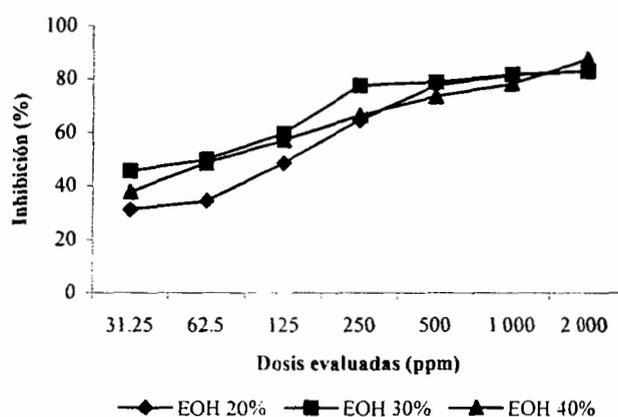


Figura 23. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *L. tridentata* a tres concentraciones de ingrediente activo contra el hongo *A. flavus*.

Al hacer la comparación entre los tres extractos (EOH, MeOH y NaOH) a la misma concentración de IA (30%) se observa una notable diferencia entre ellos, ya que con el extracto NaOH se logró el menor efecto antifúngico (Figura 24), debido a que con 4,000 ppm se logró inhibirlo en aproximadamente 40%, mientras que a esta misma dosis los otros dos extractos lograron inhibir por completo a *A. flavus*.

### Efecto inhibitorio de los extractos de *L. tridentata* contra *A. parasiticus*

En relación con el efecto fungicida del extracto EOH a tres concentraciones (20, 30 y 40%) de IA, la Figura 25 muestra un comportamiento inhibitorio similar de las tres concentraciones; ya que desde 1,000 ppm no se observaron diferencias entre los porcentajes de IA, efecto que se mantuvo igual hasta 4,000 ppm; ya que con esta dosis sí se logró inhibir por completo el crecimiento micelial de *A. parasiticus*.

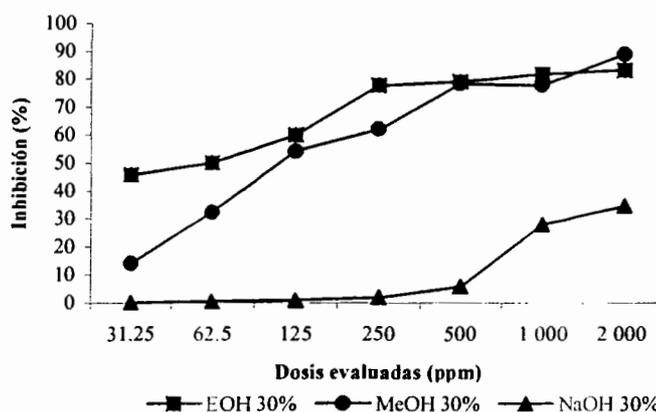


Figura 24. Comparación del efecto inhibitorio de tres extractos (etanólico, metanólico y sódico) de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo contra el hongo *A. flavus*.

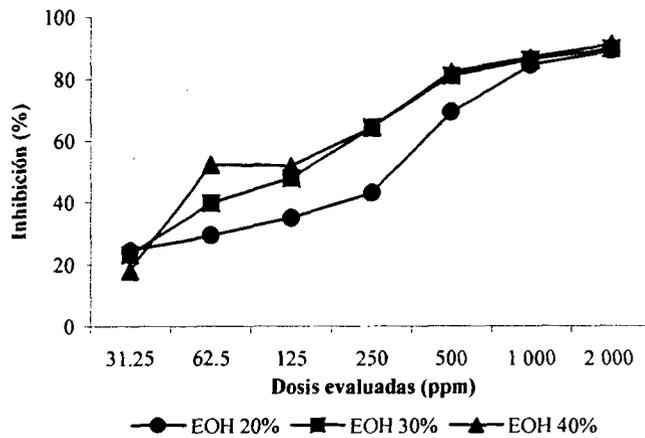


Figura 25. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *L. tridentata* a tres concentraciones de ingrediente activo contra el hongo *A. parasiticus*.

Observando la efectividad de los tres extractos (EOH, MeOH y NaOH) a la misma concentración de 30% (IA) contra el hongo *A. parasiticus*, se aprecia una vez más que el extracto sódico fue el que menor actividad antifúngica mostró, ya que a 4,000 ppm sólo inhibió el 35.12%; mientras que los extractos metanólico y etanólico desde la concentración de 2,000 ppm inhibieron por completo al hongo (Figura 26).

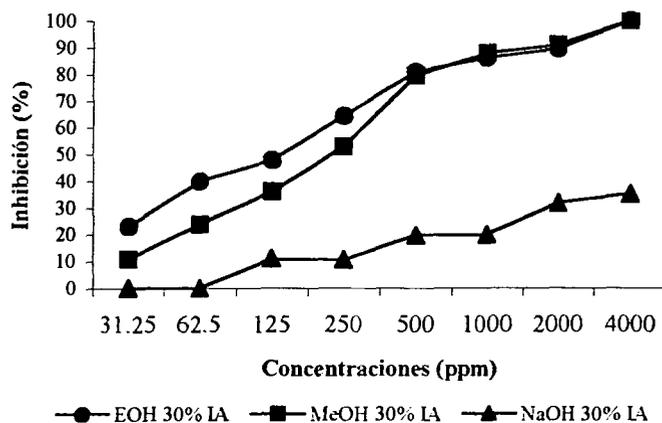


Figura 26. Comparación del efecto inhibitorio de tres extractos (etanólico, metanólico y sódico) de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo contra el hongo *A. parasiticus*.

Con la finalidad de realizar una comparación sobre el efecto inhibitorio del extracto EOH, debido a que este producto mostró ser el mejor por su eficacia invariable, en la Figura 27 se muestra los porcentajes de inhibición logrados contra los tres hongos del género *Aspergillus*. De manera general se aprecia un efecto antifúngico similar, sin embargo, el hongo *A. niger* a partir de la dosis de 250 ppm mostró ser más sensible que los otros dos, ya que desde las 1,000 ppm su crecimiento cesó por completo, mientras que *A. flavus* y *A. parasiticus* concluyeron totalmente su crecimiento hasta la dosis de 4,000 ppm. La información antes mencionada pone de manifiesto claramente el notable efecto antifúngico de los extractos hidrosolubles de la resina de gobernadora; lo cual confirma la información previamente reportada por Lira-Saldívar (2003), ya que este autor señala que alrededor de otros 12 hongos fitopatógenos han sido inhibidos por los extractos hidrosolubles de este arbusto de las zonas áridas.

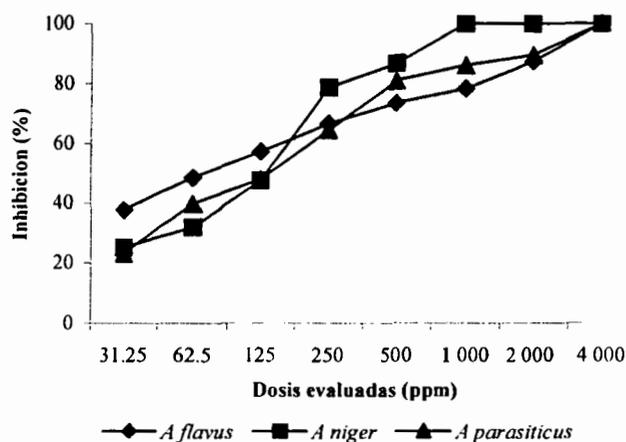


Figura 27. Comparación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo contra tres hongos del género *Aspergillus*.

## Efecto inhibitorio del quitosán sobre los hongos del género *Aspergillus*

En relación con la actividad antifúngica de las soluciones del biopolímero quitosán sobre *A. niger*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, en la Figura 28 se aprecia claramente el limitado efecto en la inhibición del crecimiento micelial de estos tres patógenos, ya que tanto *A. flavus* como *A. parasiticus* sólo resultaron ser ligeramente inhibidos a la alta dosis de 32,000 ppm; mientras que *A. niger* fue más susceptible a este bioproducto debido a que a la dosis antes mencionada su crecimiento fue inhibido en 60%. Por consiguiente y con base en estos resultados, es muy claro que los extractos de *L. tridentata* reflejaron ser notablemente superiores en cuanto a su actividad antifúngica comparado con el quitosán.

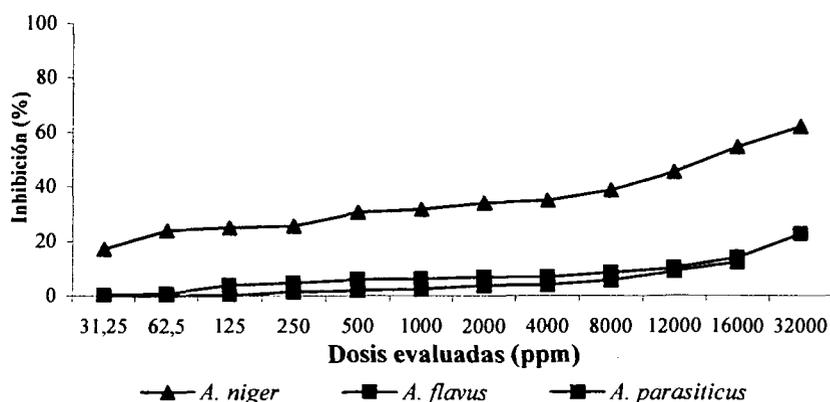


Figura 28. Comparación del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de quitosán contra tres hongos del género *Aspergillus*.

Tratamiento No.	Quitosan/ <i>Larrea</i>	Inhibición (%)
1	500/500	42.07
2	500/1000	64.19
3	500/2000	74.85
4	1000/500	48.44
5	1000/1000	78.73
6	1000/2000	89.71
7	2000/500	70.19
8	2000/1000	81.38
9	2000/2000	84.46

Cuadro 13. Inhibición del crecimiento micelial del hongo *A. parasiticus* con mezclas a diferentes concentraciones (ppm) de los bioproductos, quitosan y extracto etanólico de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo.

#### Actividad inhibitoria de las mezclas quitosan/*Larrea*

Con la finalidad de determinar el posible efecto sinérgico de las mezclas quitosan/*Larrea* en el crecimiento del hongo *A. parasiticus* se realizó un bioensayo en el que se evaluaron 10 tratamientos (9 mezclas y el testigo absoluto), los resultados de este experimento se presentan en el Cuadro 13. Se aprecia que en la medida que se incrementa la concentración de ambos productos se logra una mayor inhibición del hongo; sin embargo, al incrementarse la concentración del quitosan a 2,000 ppm el efecto inhibitorio se ve reducido en comparación con las mezclas en donde este bioproducto se aplicó a solamente 1,000 ppm. Esto se pone de manifiesto en el tratamiento 1000/2000, con el que se obtuvo una inhibición de 89.71%, mientras que con el tratamiento 2000/2000, la inhibición lograda fue de 84.46%, esto sugiere que el quitosan a concentraciones mayores tuvo un posible efecto antagónico con el extracto de gobernadora. Lo antes señalado se puede reforzar con la observación reportada previamente en la Figura 28, en la cual claramente se observó que las soluciones de quitosan tuvieron un efecto ligeramente inhibitorio sobre el hongo antes señalado así como en las otras dos especies de *Aspergillus*.

Resultados sobre mezclas de productos orgánicos similares a los aquí presentados, pero utilizando extractos diferentes de plantas fueron consignados recientemente por Bautista-Baños *et al.* (2003). Estos autores analizaron el efecto de quitosan solo y combinado con extractos acuosos de manzana, así como de hojas y semillas de papaya, los cuales se evaluaron solos y también mezclados con quitosan, en la calidad en frutos de papaya y contra niveles de antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Las soluciones de quitosan a 20,000 y 30,000 ppm tuvieron un efecto antifúngico contra *C. gloeosporioides*, mientras que los extractos solos no mostraron ningún efecto fungicida, en cambio, cuando se mezclaron con quitosan a la elevada concentración de 25,000 ppm, todos los extractos evaluados tuvieron un efecto fungistático sinérgico, pero no se observó un efecto fungicida. Estos resultados sobre sinergismo no se detectaron con la mezcla quitosan/*Larrea* debido probablemente a que el extracto de gobernadora forma una emulsión que causa que se precipite el ingrediente activo de *L. tridentata* y no se mezcle adecuadamente con el biopolímero, lo cual posiblemente afectó su actividad antimicrobial.

#### **Inhibición del extracto etanólico de *L. tridentata* comparado contra el fungicida sintético clorothalonil**

Con la finalidad de realizar una comparación entre el extracto de gobernadora que mostró la mayor efectividad en la serie de bioensayos realizados con los tres hongos del género *Aspergillus*, se estableció un experimento para contrastar la inhibición producida por el fungicida sintético clorothalonil y el extracto etanólico de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo a la misma dosis de 2,000 ppm (Figura 29). En esta figura se aprecia gráficamente que consistentemente el extracto etanólico resultó ser superior que el fungicida sintético, ya que para *A. niger* (A), *A. flavus* (B) y *A. parasiticus* el clorothalonil inhibió en 59, 48 y 42% respectivamente el crecimiento micelial; mientras que el extracto etanólico logró inhibirlos en 100, 82 y 86% respectivamente. Por lo tanto, estos resultados evidenciaron el mayor efecto antifúngico del extracto orgánico en comparación del fungicida tradicional o sintético. El trabajo experimental de Cabrera (2004), también reportó resultados similares a los antes señalados, ya que al comparar la

inhibición de cinco cepas del hongo *C. gloesporioides* con dos fungicidas sintéticos (Mancozeb y Tecto 60) y el extracto etanólico de *L. tridentata*, se encontró que el extracto orgánico fue estadísticamente superior que el Tecto 60 e igual que el Mancozeb.

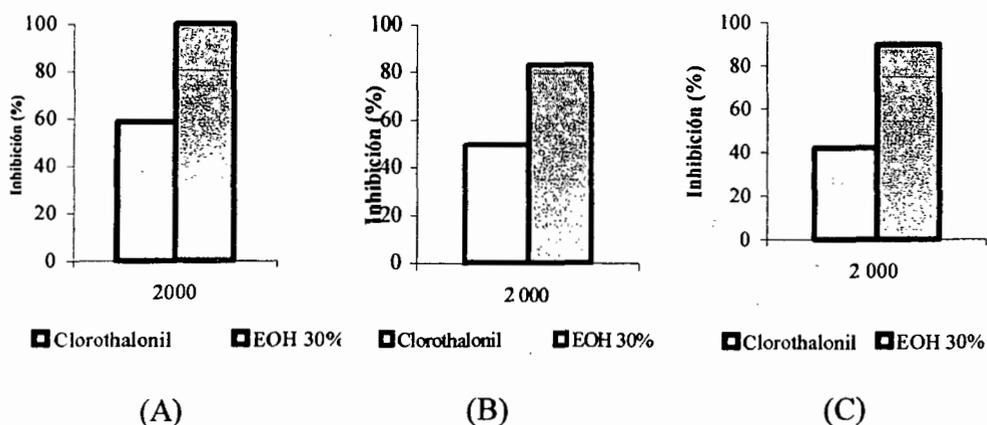


Figura 29. Comparación del efecto inhibitorio entre el fungicida sintético clorothalonil y el extracto etanólico de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo contra los hongos *A. niger* (A), *A. flavus* (B) y *A. parasiticus* (C).

Por último, es importante señalar que en relación con la determinación de la termoestabilidad de los diferentes extractos de *L. tridentata* empleados en este trabajo experimental, los resultados indican que estos productos después de haber sido sometidos a temperaturas de esterilización (121°C durante 15 minutos), para así preparar los medios envenenados que se adicionaron a las cajas Petri y evaluar su efectividad biológica contra hongos y bacterias patogénicas, se constató que los extractos siempre tuvieron una actividad marcadamente biocida aún a la baja concentración de 125 ppm.

Los resultados obtenidos nos permitieron inferir que los compuestos orgánicos bioactivos de los extractos de gobernadora no sufren una modificación física o química que altere sus propiedades biológicas, lo cual tiene importantes implicaciones desde el punto de vista práctico agronómico, ya que esto sugiere que los biopesticidas que se elaboren con estos extractos, pueden soportar altas temperaturas de almacenamiento sin que esto afecte sus propiedades fungicidas o bactericidas.

## CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *L. tridentata* al 30% de ingrediente activo (IA) mostró su eficacia antibacterial contra todas las bacterias estudiadas, tanto gram positivas como gram negativas, esto se hizo muy evidente desde la baja concentración de 125 ppm para *E. coli*, especie que resultó ser la más sensible de las siete que se evaluaron; a la dosis de 1,000 ppm todas las demás cepas mostraron su vulnerabilidad al extracto.
- El extracto metanólico al 30% IA también mostró su gran eficacia contra la mayoría de las bacterias, ya que logró inhibirlas por completo a la dosis de 1,000 ppm; sólo *S. typhimurium* mostró ser mas tolerante a este producto, ya que requirió la dosis de 2,000 ppm para ser inhibido por completo.
- El quitosan no mostró resultados eficaces contra las bacterias evaluadas, por el contrario su combinación con el extracto etanólico de *L. tridentata* indicó un efecto antagónico.
- En relación con el efecto antifúngico de *L. tridentata* contra los hongos del género *Aspergillus*, los resultados obtenidos mostraron la eficacia de los extractos a diferentes concentraciones de ingrediente activo (20, 30 y 40%), indicando una eficacia similar desde las dosis de 500 ppm.
- Al comparar los tres extractos hidrosolubles (etanólico, metanólico y sódico) al 30% IA contra el hongo *A. niger*, se detectó que con el extracto sódico se logró inhibir en 20% el crecimiento del hongo a la dosis de 2,000 ppm; en contraste, con el extracto etanólico y metanólico se logró una inhibición del 100 y 90% respectivamente a la misma dosis. Resultados similares se observaron con el extracto sódico contra los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*, ya que con esa misma dosis sólo se obtuvo un porcentaje de inhibición mayor al 30%.

- El quitosan no mostró efecto inhibitorio alguno contra ninguna de las cepas de *Aspergillus*, aún a la máxima concentración evaluada que fue de 32,000 ppm.
- En relación con la posible actividad antifúngica de la mezcla de quitosan y el extracto etanólico de gobernadora, también se observó un efecto antagónico similar al observado en los bioensayos con las bacterias.
- Los resultados obtenidos en este trabajo con los extractos hidrosolubles de *L. tridentata* son muy satisfactorios, ya que es un producto orgánico vegetal, es biodegradable, no provoca contaminación en los ecosistemas, ni es dañino para los humanos.
- Con base en lo antes señalado, es factible suponer que los extractos de gobernadora, especialmente los etanólicos y metanólicos, pueden ser utilizado con éxito y sin riesgos, en programas de agricultura sustentable o en la producción orgánica de cultivos agrícolas.
- Por otro lado, los países que importan frutas y verduras están demandando frutas, hortalizas, carne, leche, etc., que estén libres de pesticidas sintéticos, ya que se ha demostrado que resultan ser nocivos para la salud. Esta demanda de productos orgánicos es muy marcada en los países de la Comunidad Económica Europea, así como en Japón, Estados Unidos, Canadá y otros países, por lo que la inocuidad alimentaria debe de promoverse utilizando pesticidas orgánicos o control biológico de hongos y plagas en general.

## LITERATURA CITADA

- Adams, M. Y Moss, M: 1997. Microbiología de los Alimentos. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España.
- Agrios, N. 2001. Fitopatología. Ed. Limusa. Segunda edición. México, D. F. pp. 465-66.
- Balvantín, G. F. 2001. Extractos hidrosolubles de *Larrea tridentata* y su efecto inhibitorio en el crecimiento *in vitro* del hongo *Pythium* sp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México. 59 p.
- Baker, P., Benbrook, Ch., Groth, E. y Lutz, K. 2002. Pesticide residues in conventional IPM-grown and organic foods: Insights from three U.S. data sheets. In: Food Additives and Contaminants 19, 427-446.
- Barbour, M. G., Cunnigham, G., Oechel, W. O. and Bamberg, S. A. 1977. Growth and development, form and function, In: T. J. Mabry, J. H. Hunziker, D.R. Jr. DiFeo (eds.). Creosote Bush bush-biology and chemistry of *Larrea* in New World Deserts, US/IBP Synthesis Series 6. pp. 48-91. Dowden, Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA.
- Bautista-Baños, S., y Bravo-Luna, L. 2004. Tecnologías empleadas en el control de enfermedades de postcosecha de los productos hortofrutícolas. Memorias de investigación Centro de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional 111-120. Yautepec, Morelos, México.
- Bautista-Baños, S., y Bravo-Luna, L. 2004. Evaluación del quitosan en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha 6:63-67.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., and Bosquez-Molina, E. 2004a. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología (En prensa).
- Bautista-Baños, S., López-Hernández, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C. L. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection 22:1087-1092.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). British Journal of Phytotherapy 3:10-30.

- Bucio-Villalobos, C. M., Guzmán de Peña, D. and Peña-Cabriales, J.J: 2001. Aflatoxin Synthesis in Corn Fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 18: 83-87.
- Cabrera, S. 2004. Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de quitosan, *Larrea tridentata* (D.C.) Coville y mezclas de ambos bioproductos en cinco cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo Coahuila. México. 48 p.
- Cheah, L., Page, B., and Shepherd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of sclerotinia rot of carrots. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science* 25:89-92.
- Clark, D. 1999. Treating herpes naturally with *Larrea tridentata*. Published by U.S. Botanicals Tempe, Arizona 42 p.
- Cortez-Rocha, M. O., Sánchez-Mariñez, G., Villaescusa-Moreno, M. I. and Cinco-Moroyoqui, F. J. 1993. Plant powders as stored grain protectants against *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). *Southwestern Entomologist* 18:73-75.
- De Anda, V. J. 2003. Biofumigación con solarización y extracto de resina de *Larrea tridentata*: Una alternativa tecnológica para el control de malezas y nematodos en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var: itálica). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo. Coahuila, México 93 p.
- Coyle, J. and Roberts, N. C. 1975. A field guide to the common and interesting plants of Baja California. Natural History Publisher Company. La Joya, California, USA. 43 p.
- Downum, K. R., Dole, J. and Rodríguez, E. 1988. Nordihydroguaiaretic acid: inter-and intrapopulational variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 16:551-555.
- Du, J., Hiroshi, G., and Shuichi, I. 1998. Effects of Chitosan coating on the storability and on the ultrastructural changes of "Jonagold" apple fruit in storage. *Food Preservation Science* 24:23-27.
- Duisberg, P. C. 1952. Development of a feed from the creosote bush and the determination of its nutritive value. *Journal of Animal Science* 11:174-180.
- El Ghaouth, A., Arul. J., Ponnampalam, R., and Boulet, M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science* 56:1618-1620.

- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., and Benhamou, N. 1992c. Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research* 96:769-779.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., and Benhamou, N. 1997. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology* 12:183-194.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J., Brown, E., Wisniewski, M. and Wilson, C. L. 2000. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease* 84 243-248.
- Fernández, S., Hurtado, L. M., and Hernández, F. 1979. Fungicidal components of creosote bush resin. In: *Advances in Pesticide Science* (ed. H. Geissbühler) pp. 351-355. Pergamon Press Oxford and New York.
- Fernández, E. 2000. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gamboa-Alvarado R., Hernández, F. D., Guerrero, E., Sánchez, A., Villarreal, L. A., López, R. G., Jiménez, F., and Lira-Saldivar. R. H. 2003. Antifungal effect of *Larrea tridentata* extracts on *Rhizoctonia solani* Khün and *Phytophthora infestans* Mont (De Bary). *PHYTON-International Journal of Experimental Science*.
- García, E. R., Cordobilla, M. del P., Vega, S. M. L. y Tlalpal, B. B. 1997. Alelopatía y control de enfermedades de la raíz en jitomate con la adición al suelo de gobernadora (*Larrea tridentata*). *Avances de la Investigación*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 72-74.
- Gilardi, G. I. 1985. *Pseudomonas*: 350-372. *Manual of Clinical Microbiology*. Eds. Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J. and Shadomy, H. J. 4th Ed. ASM. Washington, D.C.
- Gisvold, O. and Taker, E. 1974. Lignans from *Larrea divaricata*. *Journal of Pharmacology Science* 63:1905-1907.
- Gnabre, J. N., Brady, J. L. and Clanton D. J. 1995 Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DNA sequence-selective plant lignan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 11239-11246.

- Gonzalez-Coloma, A., Wisdom, Ch. S., and Rundel, P. W. 1988. Ozone impact on the antioxidant nordihydroguaiaretic acid content in the external leaf resin of *Larrea tridentata*. *Biochemical Systematics and Ecology* 16:59-64.
- González, A. 1995. El Maíz y su Conservación. Ed. Trillas. México, DF. pp. 214-244.
- Gordillo, M. 2004. Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de la enfermedad Moho Gris (*Botrytis cinerea*) por tres diferentes extractos Hidrosolubles de gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C.) Coville). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. 34 p.
- Groopman, J.D., and Thomas, W. K. 1999. CRC Critical Reviews in Toxicology. 1999. Chapter 19 113-124.
- Groopman, J. D. and Densler, W. 1996. Temporal patterns of aflatoxin-albumin adducts in hepatitis B surface antigen and antigen-negative residents of Daxin, Qidong Country, Peoples Republic of China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 1996 253-261.
- Guzmán de Peña, D. 1997. El estudio de las aflatoxinas en México. En : J. Ruíz- Herrera, D. Guzmán de Peña y J. J. Peña-Cabriales (eds). *Perspectivas de la Microbiología en México*. Instituto Politécnico Nacional. México. pp. 181-199.
- Guzmán de Peña, D. 2001. Aflatoxinas: lo que debe saber. Folleto informativo. Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. México.
- Hayes, P. 1993. *Microbiología e Higiene de los Alimentos*. Ed ACRIBIA. Zaragoza, España.
- Hirano, S., and Nagao, N. 1989. Effects of Chitosan, Pectic Acid, Lysozyme and Chitinase on the growth of several Phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53:3065-3066.
- Huerta de la P. A. 1986. Acción nematicida de la resina de gobernadora *Larrea tridentata* Coville en el guayule *Parthenium argentatum* Gray bajo cultivo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 53 p.
- Hucke, M. 1998. Multiple drug Resistant Enterococci. The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* 4: 239-249.

- IARC. 1982. Environmental Carcinogens Selected Methods of Analysis. In: H. Egan, L. Stoloff, and I. K. O'Neill (eds). IARC Publications 44. Lyon, France.
- Janzen, D. H., Juster, H. B. and Bell, E. A. 1977. Toxicity of secondary compounds to the seed-eating larvae of the brunched beetle *Callosobruchus maculatus*. *Phytochemistry* 16:223-227.
- Lafontaine. P. J., and Benhamou, N. 1996. Chitosan treatment: An emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol Science and Technology* 6:11-24.
- Lang, G., and Clausen, T. 1989. The use of chitosan in cosmetics. pp. 139-147 In: G. Skjak-Braek, A. Thorleif, and P. Standford (eds.). *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*. Elsevier Applied Science. New York, USA. 835 p.
- Lara, H., García, E., Valdez, A. y Tlalpal, B. B. 1997. Efecto de la gobernadora sobre patógenos radicales. *Avances de la Investigación*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 74-75.
- Lillehoj, E. B. 1983 Effect of environmental and Cultural Factors on Aflatoxin Contamination of Developing Corn Kernels. p. 27-34 In: U. L. Diener (ed). *Aflatoxin and Aspergillus flavus* in corn. Bulletin 279 Southern Cooperative Series. Auburn University, Alabama, USA.
- Lira-Saldivar, R. H., Gamboa-Alvarado, R., Villarreal-Cárdenas, L. A., López-Campos. R. G. and Jiménez-Díaz, F. 2002. Hydrosoluble extracts of *Larrea tridentata* from two desertic zones in the north of Mexico and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*. *PHYTON-International Journal of Experimental Science* 2002:167-172.
- Lira-Saldivar, R. H., Sánchez, M. R., Gamboa R., Jasso, D., and Rodríguez. R. 2003a. Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahuan and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. *Agrochimica* 47:55-60.
- Lira-Saldivar. R. H., Balvantín-García, G. F., Hernández-Castillo. F. D., Jasso-Cantú. D., and Díaz-Jiménez, F. 2003b. Evaluation of resin content and the antifungal effect of *Larrea tridentata* (Seese and Moc. Ex DC.) Coville extracts from two Mexican deserts against *Phytium* sp. Pringsh. *Revista Mexicana de Fitopatología*.

- Lira-Saldivar, R. H., Cruz-Blasi, J., Hernández-Castillo, F. D., Jiménez-Díaz, F., Flores-Olivas, A. and Gallegos-Morales, G. 2003c. Soil solarization and *Larrea tridentata* extract as a biocontrol agent on root damage and epidemiology of pepper plants. *PHYTON-International Journal of Experimental Science*.
- Matsumoto, K. S., Guerrero, I., y Hall, G. M. 1996. La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia* 47:317-328.
- Meinzer, F. C., Wisdom, C. S., González-Coloma, A., Rundel, P. W. and Shultz, L. M. 1990. Effects of leaf resin on stomatal behavior and gas exchange of *Larrea tridentata* (D.C.) Cov. *Functional Ecology* 4:579-584.
- 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, H.E. y Carvajal-Moreno, M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:125-131.
- No H. K., Na Y P., Shin H. L. and S. P. Mayers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of food Microbiology* 74:65-72.
- Noguera-Ortí, J. F., Villanueva-Camañas, R. M., Ramis-Ramos, G. 2000. Determination of Synthetic Antioxidants in Dairy Products and Dietetic Supplements by Micellar Liquid Chromatography with Direct Sample Injection. *Chromatographia* 51 (12) 53-60.
- Peñalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R. y Perea, A. 2005. Antimicrobial activity of five essential Oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. *Ampis* 113: 1-6.
- Qin, C., Du, Y., Xiao, L. y Yu, H. 2002. Moisture retention and antibacterial activity of modified chitosan by hydrogen peroxide. *Journal of Applied Polymer Science* 83 1724-30.
- Rhoades, D.F. 1977. The antiherbivore chemistry of *Larrea*. In: T. J. Mabry, J. H. Hunziker, D.R. Jr. DiFeo (eds.). *Creosote Bush bush-biology and chemistry of Larrea in New World Deserts*. US/IBP Synthesis Series 6 pp. 135-175. Dowden. Hutchinson & Ross Inc., Stroudsburg, PA, USA.

- Rivera-Castañeda, G., Martínez-Téllez, M. A., Vallejo-Cohen, S., Alvarez-Manzanilla, G., Vargas-Arispuro, I., Moya-Sanz, P. and Primo-Yúfera, E. 2001. *In vitro* inhibition of mycelial growth of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:214-217.
- Rodríguez, C. 2000. Substancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. In: Memorias del VI Simposio Nacional Sobre Substancias vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. pp 145-149. Acapulco, Gro. México.
- Roller, S. y Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47 67-77.
- Romanazzi, G., Nigro, F., and Ippolito, A. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology* 29:73-80.
- Rundel, P. W., Sharifi, M. R. and González-Coloma, A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata* In: M. Arianoustsou and R. H. Groves (eds). *Plant-animal interactions in Mediterranean-type ecosystems*. pp. 105-114. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Salazar, H., García, E. R. y Talalpal, B. B. 1990. Efecto de la incorporación de residuos secos de plantas de gobernadora (*Larrea tridentata*) y epazote (*Chenopodium ambrosioides*) en suelos infectados con *Phytium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, en la germinación y crecimiento de plantas de frijol. *Revista Mexicana de Fitopatología* 9:102-104.
- Sandford, P. 1989. Chitosan: Commercial uses and potential applications. pp. 51-69. In: G. Skjak-Braek, T. Anthosen, and P. Standford (eds.). *Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications*. Elsevier Applied Science. New York, USA. 835 p.
- Seigler, D. S., Jakupcak, J., and Mabry, T. J. 1974. Wax esters from *Larrea divaricata*. *Phytochemistry* 13:983-986.
- Serna, S., 2001. Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. AGT editor., México, D.F. pp. 146-151.
- Shahidi, F., Vidana, J. y Jeon, Y. 1999. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology* 10 37-51.

- Terry, L. A., and Joyce, D. C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* 32:1-13.
- Vargas-Arispuro, I., Araujo-Bernal, S., Martínez-Téllez, M. A. y Ortega-Nieblas M. 1997. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 15:91-95.
- Velásquez, V. R. 1981. Evaluación de la actividad fungicida de la resina de gobernadora sobre *Eutypa armeniaca* Hans & Carter. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 48 p.
- Velásquez, M. 1983. Evaluación del poder bactericida o bacteriostático de la fracción etanólica de la resina de Gobernadora contra las bacterias fitopatógenas *Erwinia amylovora*, *E. atroseptica* y *Pseudomonas solanacearum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 57 p.
- Verástegui, M. A., Sánchez, C. A., Heredia, N. L. and García-Alvarado, J. S. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *Journal of Ethnopharmacology* 52:175-177.
- Wedge, D., Curry, K. J., Abril, M., Smith, B. y DeLucca, A. 2003. CCAY-1, a potential natural fungicide for control of small fruit diseases. Abstracts of the Pan-American Plant Disease Conference. Soyth Padre Island, Texas. pp 261-263.
- Wilson, C. L., El Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J., Khan, V., and Arul, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease* 78:837-844.
- Xue, H. Z., Lu, Z. Z., Cono C., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Fong, H. and Hodgson, W. 1988. 3-Beta-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-Erythrodiol and 3-Beta-(4-Hydroxycinnamoyl)-Erythrodiol from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 27:233-235.
- Zamora, J. M. 1988. Cytotoxic, antimicrobial and pytochemical properties of *Larrea tridentata* Cav. Doctoral dissertation. Auburn University. Auburn. Alabama, USA. 82 p.
- Zhao, H. R., Wang, K., Zhao, Y. y Pan L. (2002). Novel sustained-release implant of herb extract using chitosan. *Biomaterials* 23 4459-62.

## **ANEXOS**

## **Equipos y materiales de laboratorio**

- Autoclave automática Yamato, modelo 5M510.
- Balanza analítica Scientech, modelo SA410
- Balanza granataria
- Campana de flujo laminar Precision Scientific, Inc. modelo 815.
- Cámara de extracción
- Incubadora precisión Scientific, modelo 815.
- Microscopio OLYMPUS, modelo BX60
- Parrilla eléctrica CORNING PC-500
- Potenciómetro Thermo Orión 420.
- Refrigerador marca Tor Rey, modelo A-28
- Reactor Brighthon modelo X 1000
- Rotavapor BÜCHNI, modelo R-215

## **Materiales**

- Aguja de disección
- Algodón
- Asa bacteriológica
- Bisturí
- Cajas petri
- Porta y cubreobjetos
- Cubre bocas
- Embudo de filtración
- Espátulas
- Frascos
- Gasas estériles
- Gradillas
- Guantes de asbesto
- Guantes estériles
- Mascarilla
- Matraces Erlenmeyer

- Matracas volumétricos
- Mecheros
- Micropipetas
- Papel filtro
- Papel estroza
- Pissetas
- Pipetas
- Probetas
- Sacabocados
- Termómetros
- Tubos de ensaye
- Vasos de precipitado
- Vernier

### **Reactivos**

- Acetona
- Ácido acético glacial al 99.9 %
- Agua destilada
- Hipoclorito de Sodio
- Etanol
- Extracto de *Larrea*
- Hidróxido de sodio
- Metanol
- Medios de cultivo agar papa dextrosa, agar Mueller Hinton, agar nutritivo y caldo infusión cerebro y corazón marca DIFCO
- Clorothalonil
- Quitosan SIGMA Aldrich
- Tween 80

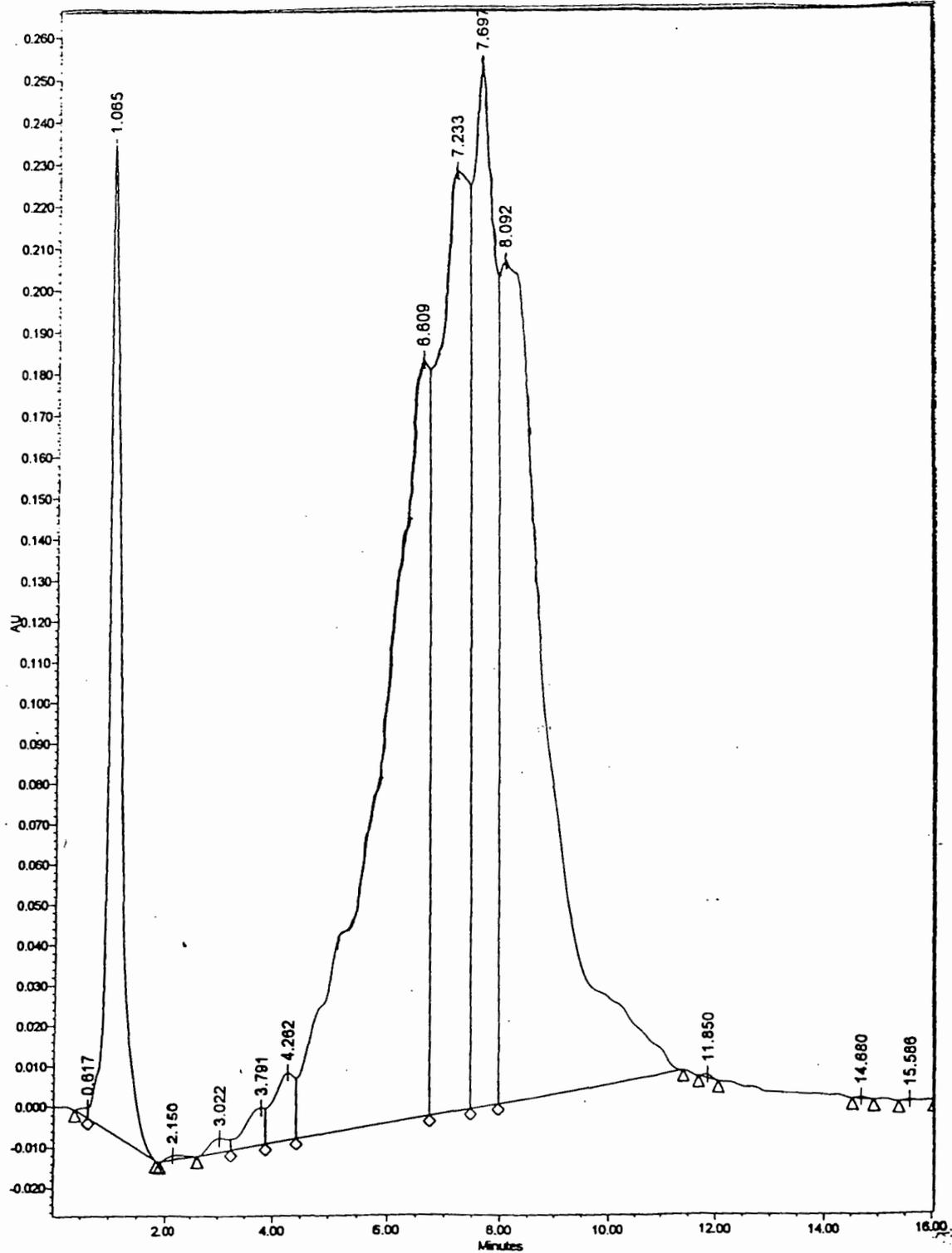


Figura 5. Cromatograma (HPLC) de la resina de *L. tridentata* extraída con hexano, en el cual se muestra la presencia del NDGA en un tiempo de retención de 7.69 minutos.

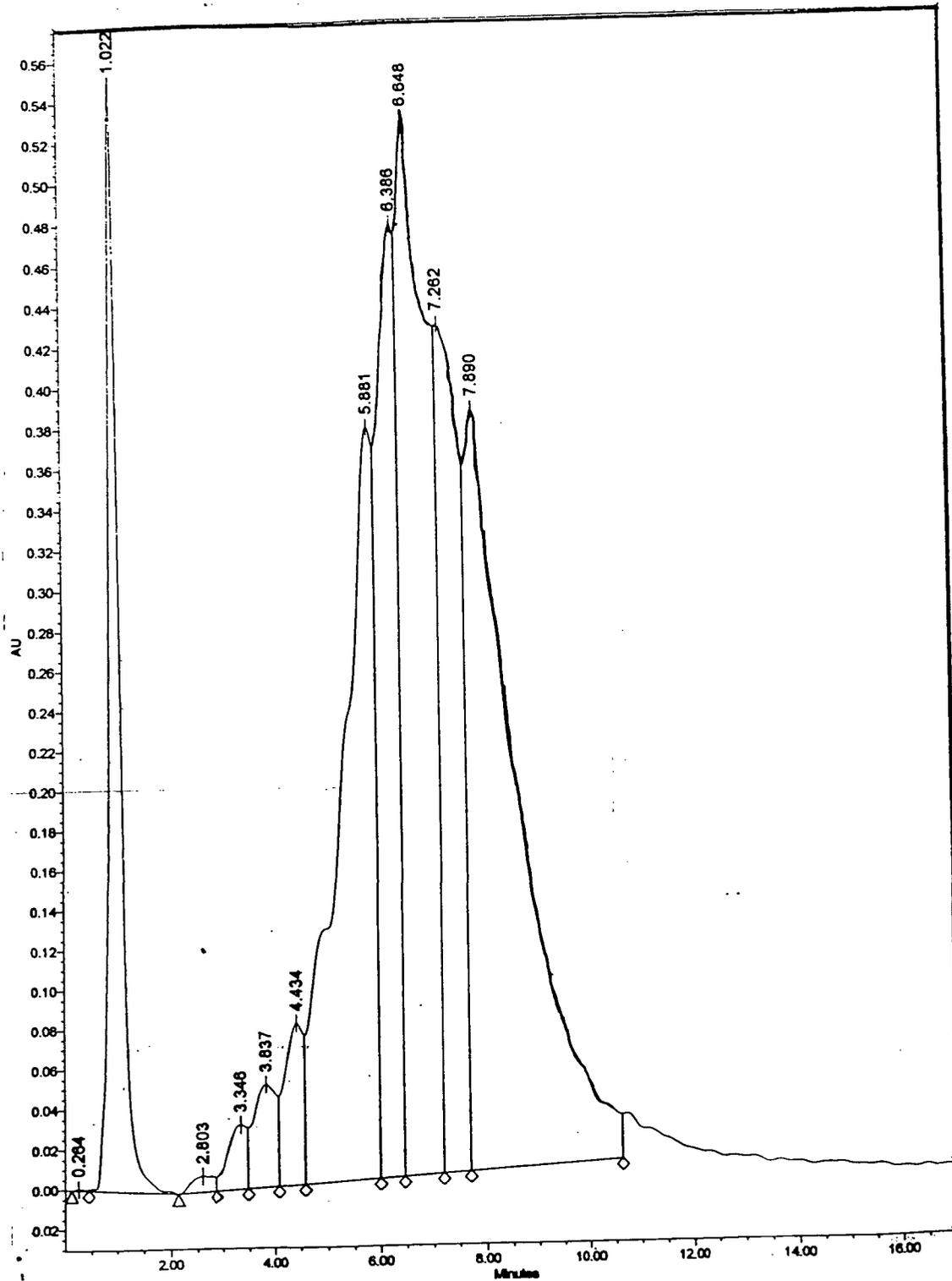


Figura 2. Cromatograma (HPLC) de la resina de *L. tridentata* extraída con cloroformo, en el cual se muestra la presencia del NDGA en un tiempo de retención de 6.64 minutos.

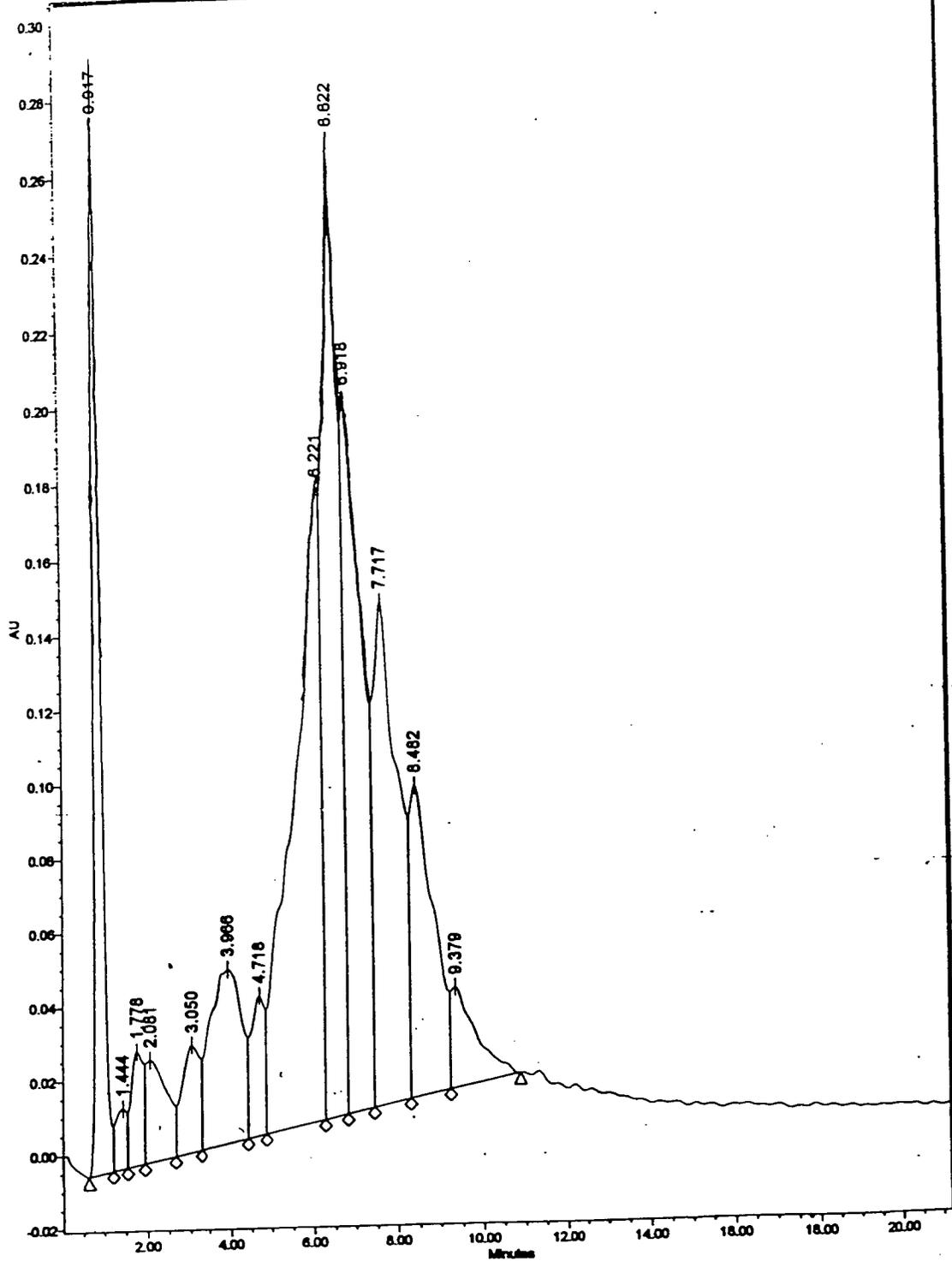


Figura 3. Cromatograma (HPLC) de la resina de *L. tridentata* extraída con metanol, en el cual se muestra la presencia del NDGA en un tiempo de retención de 6.62 minutos.

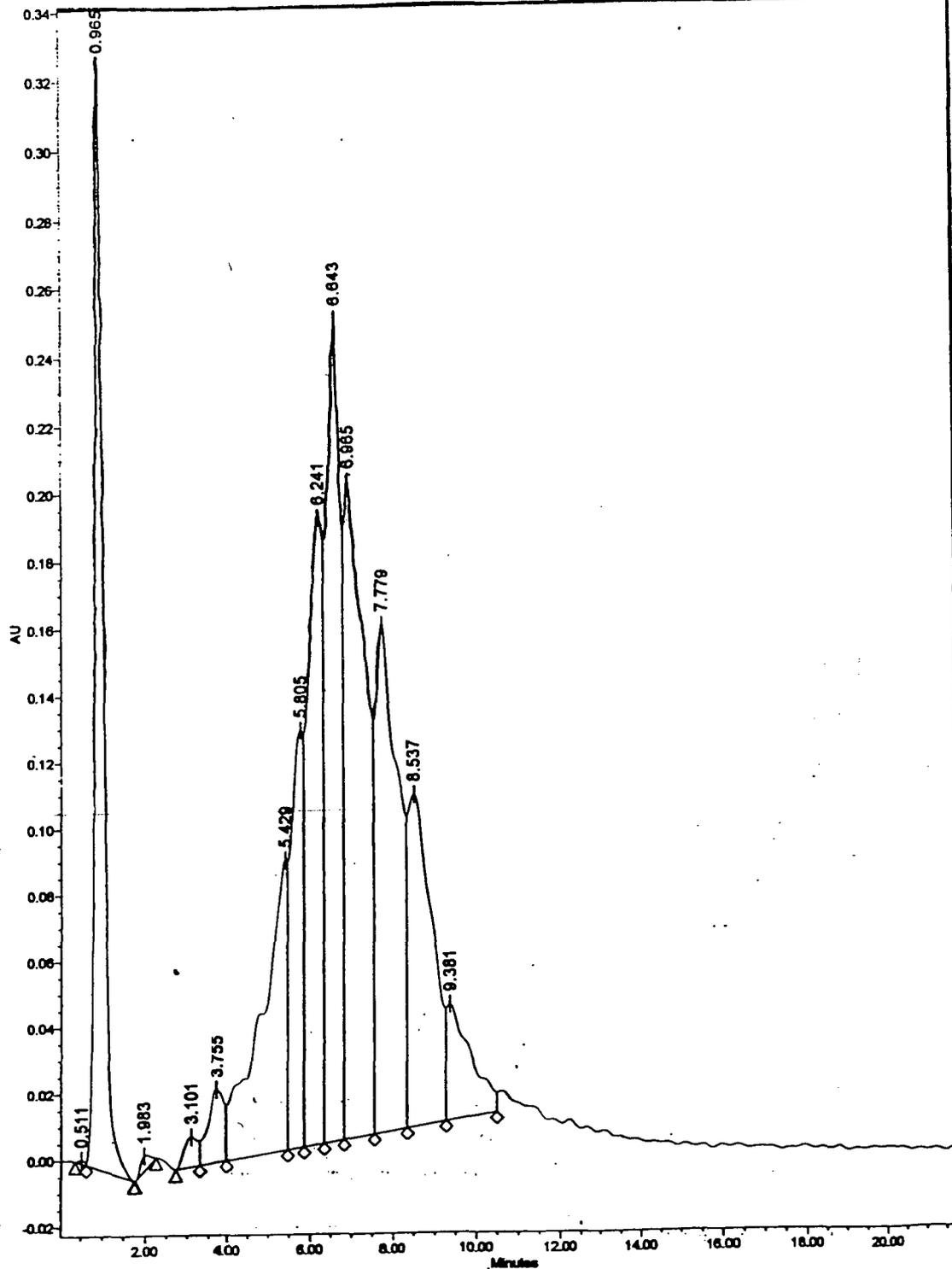


Figura 4. Cromatograma (HPLC) de la resina de *L. tridentata* extraída con etanol, en el cual se muestra la presencia del NDGA en un tiempo de retención de 6.64 minutos.

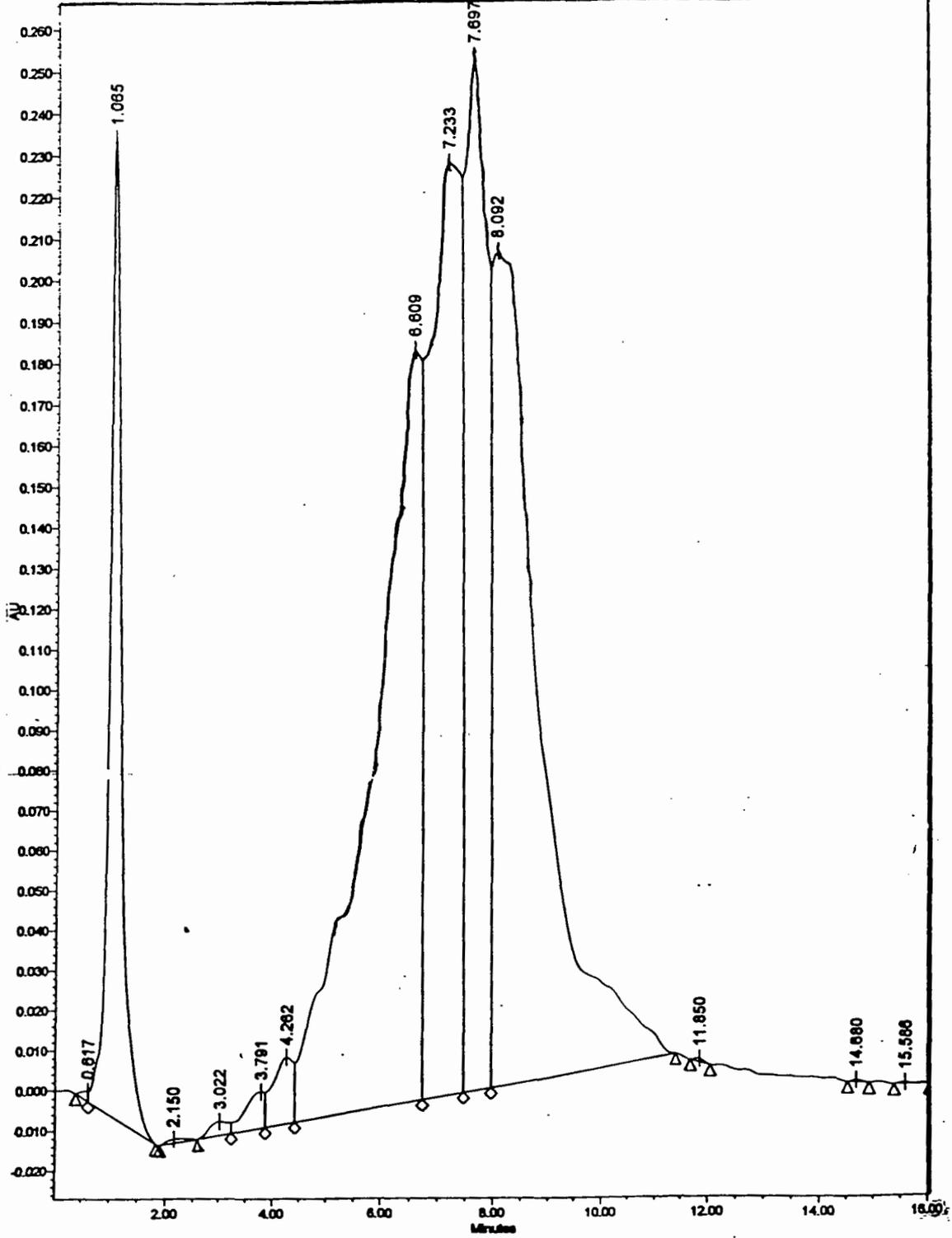


Figura 5. Cromatograma (HPLC) de la resina de *L. tridentata* extraída con hexano, en el cual se muestra la presencia del NDGA en un tiempo de retención de 7.69 minutos.



Vienna Academy  
of Postgraduate  
Medical Education  
and Research  
Conference and  
Association Management

Control/Tracking Number : 2005-A-1311-IBC

Activity : Abstract

Current Date/Time : 1/31/2005 5:49:45 PM

### Native Plants From the Arid Zones of Mexico with Medicinal and Pesticide Potential

H. Lira<sup>1</sup>, M. Hernández<sup>1</sup>, R. Gamboa<sup>1</sup>, L. Angeles<sup>1</sup>, J. Santiago<sup>1</sup>, G. Lopez<sup>1</sup>, L. Villarreal<sup>1</sup>, D. Hernandez<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>CIQA, Saltillo, Mexico, <sup>2</sup>UAAAN, Saltillo, Mexico.

Plant extracts particularly medicinal plants, are becoming increasingly important in pharmacy and have great popularity as alternative therapy. The use of synthetic pesticides creates several problems like pests resistance, resurgence, and detrimental effect on non-target organisms. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of 4 plants extracts (*Larrea tridentata*, *Flourensia cernua*, *Origanum majorana* and *Bouvardia ternifolia*) from the Mexican desert on 12 phytopatogenic fungi. Also, 7 bacteria were tested for antibacterial activity, these include 5 gram-negative and 2 gram-positive bacteria. Fungi cultures were grown in potato dextrose agar (PDA) into Petri plates (Pp). Pp were incubated at 25°C. Mycelia growth was monitored by measuring the plates area covered by the fungi. Antibacterial activity of plants extracts was assayed by mixing them with Muller Hinton agar (MHA). Bacteria cultures were incubated at 36°C into 3-divided Pp. Each test was replicated at least 2 times. The four extracts analyzed showed antimicrobial activity against all organisms studied, but the *L. tridentata* extract was more active against all microorganisms.

**Topic (Complete):** 09-12

**Keyword (Complete):** Plant extracts ; *Larrea tridentata* ; Microbicidal activity

**Presentation Preference (Complete):** Oral presentation

**Young Scientists (Complete):**

**Status:** Complete

Vienna Medical Academy  
Alser Strasse 4, A-1090 Vienna, Austria  
Tel: (+43/1) 405 13 83-22  
Fax (+43/1) 407 82 74

Powered by OASIS, The Online Abstract Submission and Invitation System <sup>SM</sup>  
© 1996 - 2005 Coe-Truman Technologies, Inc. All rights reserved.