

Efecto antimicótico del extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*)

María Carrillo, Brenda Alvarado, Diana Zavala, Abigail Reyes y Alejandro Hernández

M. Carrillo, B. Alvarado, D. Zavala, A. Reyes y A. Hernández
Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo No. 501. Fracc. Rafael Curiel, Cd.
Valles, S.L.P. C.P. 79060
maluisa@uaslp.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) Ciencias Agropecuarias, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago,
Guanajuato, 2014.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of *Larrea tridentata*, on *Aspergillus flavus*, *A. niger* and *A. parvius*, from the percent inhibition and determining their growth parameters. Extracts were obtained by Soxhlet using as solvent 80% ethanol and distilled water. The extracts were tested at concentrations of 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm. The media were inoculated with 2 μ l of fungal spore suspensions of study. As a positive control potassium sorbate at 0.3% and the negative control medium without preservative were used. The systems were incubated for 10 days at $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and the radial growth of the colony was measured every 24 hours. With data growth inhibition percentage and was calculated using the program DMFit growth parameters of each fungus at different growth conditions were obtained. The ethanol extract of *Larrea* controlled the growth of the three fungi while the aqueous extract did not inhibit growth. The ethanol extract showed an inhibitory effect of 43 to 63% by *Aspergillus* species.

12 Introducción

En México existe una gran diversidad de especies botánicas, que se usan comúnmente para el control de enfermedades en humanos, mientras que su uso en el control de fitopatógenos es menos empleado. Por otro lado, la industria alimentaria busca nuevas formas para controlar el crecimiento de los hongos que descomponen a los alimentos y que constituyen un riesgo para la salud pública. Actualmente, los productos naturales como las plantas, han sido estudiados como una alternativa para el control del crecimiento de hongos. Uno de los géneros de hongos importantes para la agricultura y la industria alimentaria se encuentra *Aspergillus*. Las especies de este género producen aflatoxinas, las cuales son causantes de pérdidas económicas en la producción de cereales. Entre las plantas que se han estudiado como antifúngicas está la gobernadora (Garza-Ramos et al., 2008). Tequida-Meneses et al. (2002) reportaron que el extracto de gobernadora tiene efecto inhibitorio sobre especies de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, mientras que Lira-Saldivar et al. (2006) investigaron la actividad antifúngica del extracto hidrosoluble de gobernadora y soluciones de quitosán, contra *Botrytis cinerea*.

Aunque se ha reportado que el extracto de gobernadora tiene actividad antifúngica sobre hongos del género *Aspergillus*, resulta interesante saber si su actividad varía entre las especies de un mismo género. Por lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto de gobernadora sobre el crecimiento de tres especies de hongos del género *Aspergillus* mediante la medición del porcentaje de inhibición y del análisis de los parámetros de crecimiento de estos hongos.

12.1 Materiales y métodos

Obtención del extracto

Se utilizaron hojas secas de gobernadora (*L. tridentata*), recolectadas en la zona media del estado de San Luis Potosí. Éstas fueron molidas en una licuadora hasta obtener un tamaño mínimo de la planta. 20 g de hojas secas y molidas, se colocaron en un cartucho de extracción y se sometieron a reflujo en el equipo Soxhlet durante dos horas, utilizando como disolvente 200 ml de etanol al 80%.

Después del tiempo de reflujo se utilizó un rotavapor (Büchi) para recuperar el solvente y obtener el extracto húmedo. Éste se colocó en la estufa de convección a 60 °C durante 48 horas para obtener el extracto seco.

Preparación del extracto

El extracto seco se pesó y se aforó a 100 mL con agua destilada. La solución se esterilizó utilizando filtros de membrana con poros de 0.45 µm y se almacenó a 10 °C hasta su uso. A partir de esta solución madre se prepararon soluciones a las concentraciones propuestas en el diseño experimental.

Preparación del inóculo

Se utilizaron cepas de los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* del cepario del Laboratorio de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, las cuales se hicieron crecer en agar papa – dextrosa (Marca Merck) por 7 días a 25 ± 2 °C. A partir de los cultivos de siete días de cada una de las cepas, se hicieron suspensiones de esporas de cada hongo. Las esporas se removieron lavando la superficie de las cuñas de agar con 10 ml de tween al 0.01 % estéril. Las suspensiones de esporas se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Preparación de los medios de cultivo

El medio que se usó para cultivar las cepas fue el medio agar papa – dextrosa (marca Merck) y se le agregó la cantidad de extracto necesario hasta obtener las concentraciones finales en los medios de 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm de manera similar a como se realizó en la metodología de Khalil y Dababnch (2007); Como control positivo se usó sorbato de potasio al 0.3 % (BaduiDergal, 2006) y como control negativo se usó un medio de cultivo sin extracto y sin conservador. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Inoculación de medios de cultivo

Cada uno de los medios de cultivo se inoculó con 2 µl de la suspensión de esporas (aproximadamente 10^3 esporas) de cada hongo en el centro del medio de cultivo. Esto se realizó por triplicado. Los sistemas inoculados se guardaron en recipientes herméticos de plástico con la finalidad de prevenir el cambio de humedad, y se incubaron a 30 ± 2 °C durante diez días.

Medición del crecimiento

Las cajas inoculadas se observaron diariamente durante diez días. Una vez iniciado el crecimiento del hongo, el diámetro de las colonias se midió cada 24 horas haciendo uso de un vernier (*AbsoluteDigimatic*); que aunque no es una forma que representa verdaderamente la naturaleza del crecimiento fúngico; es la más sencilla y directa para cuantificar el crecimiento (Gibbson y Hocking 1997). Con los diámetros registrados de cada condición se obtuvieron los porcentajes tanto de crecimiento como de inhibición.

Los diámetros de las colonias, se graficaron contra el tiempo para obtener las curvas de crecimiento de cada hongo en cada condición. Éstas se ajustaron empleando el programa DMFit, que usa el modelo de Baranyi y Roberts (1994) ecuación 1; para obtener los parámetros de crecimiento; velocidad de crecimiento (μ (mm h⁻¹)), tiempo de latencia (λ (h)) y crecimiento máximo ($Y_{\text{máx}}$), así como el coeficiente de correlación R^2 de los hongos estudiados.

$$y(t) = y_0 + \mu_{\text{max}} t + \frac{1}{\mu_{\text{max}}} \ln \left(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0} \right) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{\text{max}} t + \frac{1}{\mu_{\text{max}}} \ln \left(e^{-\nu t} + e^{-h_0} - e^{-\nu t - h_0} \right)} - 1}{e^{m(y_{\text{max}} - y_0)}} \right) \quad (12)$$

Análisis estadístico

Los porcentajes de crecimiento y de inhibición de cada hongo, así como los parámetros de crecimiento de cada hongo en cada condición se compararon entre sí, y se estableció la CMI para cada hongo como la que logró inhibirlo completamente.

Para determinar el efecto de la concentración de extracto sobre los parámetros de crecimiento de los hongos, se realizó un análisis de regresión múltiple (Statistica). La Concentración Mínima Inhibidora (CMI) del extracto se consideró como aquella donde se inhibió el crecimiento del hongo.

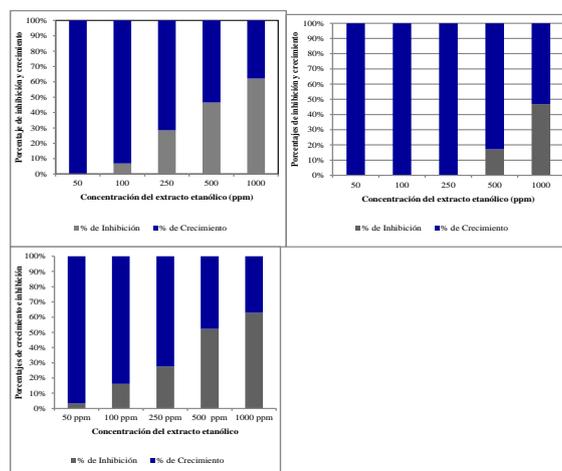
12.2 Resultados y discusión

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos de la evaluación del extracto etanólico de gobernadora, sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A.flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus*.

El crecimiento de los hongos es inversamente proporcional a la concentración y la inhibición es directamente proporcional a la concentración del extracto presente en el medio.

La inhibición total del crecimiento del hongo no fue posible, ya que se requiere de una concentración mayor a 1000 ppm del extracto para lograr tal inhibición.

Grafico 12 Porcentajes de crecimiento e inhibición de *A. flavus* (A), *A. niger*(B) y *A. parasiticus* (C) al usar el extracto etanólico de *L. tridentata*

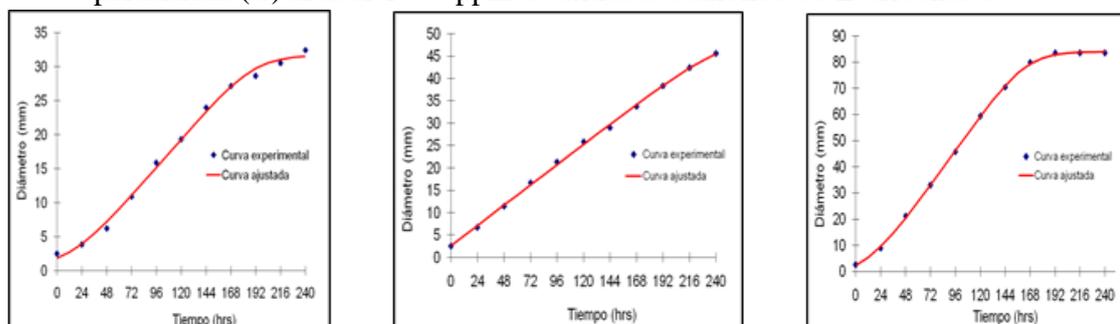


El extracto etanólico inhibió el crecimiento de los hongos conforme aumentó la concentración del extracto en el medio (Figura 1), lo que se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto, los cuales tienen actividad antimicótica. Estos resultados confirman lo reportado por otros autores, respecto a la acción antifúngica de *L. tridentata*. Tequida-Meneses et al. (2002) demostraron la efectividad del extracto alcohólico de *L. tridentata* usando 5000 ppm contra *A. flavus*, *A. niger*, *Penicilliumchrysogenum*, *P. expansum*, *Fusarium moniliforme* y *F. poae*.

López-Benítez et al. (2004) reportaron que extractos al 5 y 10% de concentración de *Alliumsativum*, *Larrea tridentata*, *Nicotiana glauca* y *Caryophyllusaromaticus* inhibieron el crecimiento micelial de *Rhizoctoniasolani* in vitro, y sobre plantas de frijol susceptibles al patógeno. Lira-Saldivaret al. (2006) probaron la actividad antifúngica del extracto de *Larrea tridentata* y soluciones de quitosán (CH), sólo y combinados contra el *Botrytis cinérea*, *Colletotrichumcoccodesy* *Fusarium oxysporum*, enontrando que son eficaces en el control de estos hongos sólo cuando el extracto se usa en concentraciones mayores a 1000 ppm.

En la Figura 2 se presentan las curvas de crecimiento de las tres especies de hongos al usar 1000 ppm de extracto etanólico de *L. tridentata*.

Figura12 Curvas de crecimiento de *A. flavus*(A), *A. niger* (B) y *A. parasiticus* (C) al usar 1000 ppm de extracto etanólico de *L. tridentata*



Las Tablas 12 a 12.2 muestran los parámetros de crecimiento -velocidad de crecimiento, tiempo de latencia y crecimiento máximo- de los hongos estudiados, calculados con el programa DMFit.

Tabla 12 Parámetros de crecimiento del *A. flavus* al usar diferentes concentraciones de extracto de *L. tridentata*

	Concentración	Parámetros de crecimiento			R ²
		Velocidad de crecimiento (mm/h)	Tiempo de latencia (h)	Crecimiento máximo (mm)	
Control negativo	0 ppm	0.62	16.18	86.26	0.99
Extracto etanólico	50 ppm	0.34	16.07	74.13	0.99
	100 ppm	0.43	16.02	81.16	0.99
	250 ppm	0.41	16.48	81.47	0.99
	500 ppm	0.43	16.89	84.99	0.99
	1000 ppm	0.17	19.97	85.69	0.99
Control positivo (Sorbato de potasio)	0.3%	0.57	21.32	86.38	0.95

Tabla 12.1 Parámetros de crecimiento del *A. niger* en las diferentes concentraciones de extracto etanólico

	Concentración	Parámetros de crecimiento			R ²
		Velocidad de crecimiento (mm/h)	Tiempo de latencia (h)	Crecimiento máximo (mm)	
Control negativo	0 ppm	1.01	24.77	86.07	0.99
Extracto etanólico	50 ppm	0.81	25.21	86.06	0.99
	100 ppm	0.61	20.53	85.16	0.99
	250 ppm	0.48	24.02	85.16	0.99
	500 ppm	0.33	24.91	86.77	0.99
	1000 ppm	0.18	26.45	87.02	0.99
Sorbato de potasio	0.3%	0.39	28.12	85.81	0.99

Tabla 12.2 Parámetros de crecimiento del *A. parasiticus* en las diferentes concentraciones de extracto etanólico

	Concentración	Parámetros de crecimiento			R ²
		Velocidad de crecimiento (mm/h)	Tiempo de latencia (h)	Crecimiento máximo (mm)	
Control negativo	0 ppm	0.59	14.17	85.86	0.99
Extracto etanólico	50 ppm	0.52	16.01	83.21	0.99
	100 ppm	0.36	16.29	73.58	0.99
	250 ppm	0.29	17.65	64.57	0.99
	500 ppm	0.17	18.35	52.66	0.99
	1000 ppm	0.14	19.57	46.00	0.99
Sorbato de potasio	0.3%	0.61	22.21	36.56	0.99

Al usar diferentes concentraciones del extracto de *L. tridentata* se observó que con el la velocidad de crecimiento de *Aspergillus flavus* disminuyó desde la concentración de 50 ppm. Al usar 1000 ppm del extracto se observó un aumento en el tiempo de latencia cercano al del sorbato de potasio. El crecimiento máximo fue similar al alcanzado por el control (Tabla 1).

Para *A. niger* se observó que la velocidad de crecimiento disminuyó a un nivel inferior que el mostrado por el sorbato de potasio desde 500 ppm en el medio; el tiempo de latencia también fue menor en comparación con el control positivo. El crecimiento máximo resultó cercano al del control positivo a partir de 500 ppm. Lo observado indica que el extracto etanólico afecta los parámetros de crecimiento desde las 50 ppm, pero afecta los tres parámetros a partir de las 500 ppm (Tabla 2). Esto pudiera ser útil, en un momento dado, para retardar el inicio de crecimiento; por ejemplo en la industria alimentaria, donde se busca detener el desarrollo de los microorganismos deteriorativos de los alimentos.

Con respecto al hongo *A. parasiticus* (Tabla3), al usar el extracto etanólico, se observó que en relación al control negativo, la velocidad de crecimiento, y el crecimiento máximo disminuyeron, mientras que el tiempo de latencia aumentó; éste último parámetro aumentó al usar extracto de *L. tridentata*, pero no fue mayor que el control positivo.

Aunque en este trabajo la máxima concentración que se usó fue de 1000 ppm (Figura 2), -la cual no fue suficiente para inhibir en su totalidad el crecimiento de las tres especies de *Aspergillus*-, si lo fue para disminuir su velocidad y crecimiento máximo, lo cual es importante si se considera que estos parámetros de crecimiento desempeñan un papel muy importante cuando se quiere establecer la el tiempo de vida de anaquel de los productos que son deteriorados por el crecimiento de hongos.

12.3 Conclusiones

La intensidad del efecto antimicótico del extracto etanólico de *L. tridentata* fue: *A. parasiticus*>*A. flavus*>*A. niger*; siendo el porcentaje de inhibición de 63, 61 y 46 % respectivamente. Esto debido probablemente a la diversidad metabólica intrínseca de cada hongo.

12.4 Referencias

Badui-Dergal, S. (2006). *Química de los Alimentos*. (3ª ed.). México: Editorial Pearson Educación.

Baranyi, J., Roberts, T. A. y McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10, 43-59.

Garza-Ramos, M. A., Oranday-Cardenas, A. y Picasso-González, K. C. (2007). Localización de compuestos con efecto antimicrobiano. Obtenida el 3 de Mayo de 2008 de <http://www.congresobiomedico.org.mx/memorias/htm/434/313.htm> y de http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2007/ee-08-2007/documentos/salud_bucal.htm

Gibson, A. M. y Hocking, A. D. (1997). Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. *Trends of Food Science and Technology* 8, 353-358.

Lira-Saldivar, R. H., Hernandez-Suárez, M. y Hernandez-Castillo, F.D. (2006). Activity of *Larreatridentata* (D.C.) Coville (L) extracts and Chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 12(002), 211-216.

Lopez-Benitez, A., López-Betancourt, S. R. y Mendoza-Elos, M. (2004). Efecto de extractos vegetales en el crecimiento de *Rhizoctoniasolani*Kün in vitro y en plantas de frijol susceptible. *CIGA, ITA*. 33.

Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., López-Sandoval, S. y Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicilliumchrysogenum*, *Penicilliumexpansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19, 84-88.