

Efecto del uso combinado de extracto de *Larrea tridentata* y sorbato de potasio sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*

Abigail Reyes Munguía, Mayra Aguilar Zárate, María Luisa Carrillo Inungaray
Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Ciudad Valles, S. L. P., México
maluisa@uaslp.mx

Abstract— The effect of extract of *Larrea tridentata* and potassium sorbate (PS), at different pH values on the growth of *Aspergillus flavus* was evaluated. Culture media with extract of *L. tridentata* and (PS) were adjusted to pH 3, 4 and 5. These were inoculated with *A. flavus* and incubated at 30 °C for ten days. The growth curves of the fungus were adjusted to obtain their growth parameters, growth rate, latency and maximum growth. The pH of the medium affected the period of latency of the fungus. The use combined of extract of *L. tridentata* and PS, increased the percentage of inhibition of the fungus.

Keyword— *Aspergillus flavus*, *Larrea tridentata*, potassium sorbate.

Resumen— Se evaluó el efecto del uso combinado de extracto de *Larrea tridentata* y sorbato de potasio (SK), a diferentes valores de pH, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Medios de cultivo con extracto de *L. tridentata* y SK se ajustaron a pH 3, 4 y 5. Éstos se inocularon con *A. flavus* y se incubaron a 30 °C por diez días. Las curvas de crecimiento del hongo se ajustaron para obtener sus parámetros de crecimiento –velocidad de crecimiento, tiempo de latencia y crecimiento máximo-. El pH del medio afectó al tiempo de latencia del hongo y al usar el extracto de *L. tridentata* y SK en forma combinada, aumentó el porcentaje de inhibición del hongo.

Palabras clave— *Aspergillus flavus*, *Larrea tridentata*, sorbato de potasio.

I. INTRODUCCIÓN

Las tendencias actuales de consumo favorecen a los productos alimenticios con tratamientos térmicos menos severos, lo que consecuentemente disminuye la seguridad de los mismos. Por ello se ha incrementado el interés por investigar cómo lograr la inocuidad alimentaria y alargar la vida útil de los nuevos productos alimenticios tratados mínimamente [1]. Para controlar el crecimiento de los hongos en alimentos, la mayoría de los métodos tradicionales se basan en la aplicación de un solo factor para superar un determinado mecanismo homeostático de la célula, pero al aplicar varios factores simultáneamente y en dosis leves, se superan varios mecanismos homeostáticos, ya que los factores actúan aditiva o sinérgicamente.

La investigación en la industria alimentaria actualmente está dirigida hacia la búsqueda de compuestos que contribuyan a la conservación de alimentos a los que se añadan. Esto ha conducido a retomar los conocimientos empíricos relacionados con el uso de extractos de plantas, a las que se les atribuye actividad antimicrobiana [2]. Se estima que en el mundo existen entre 310 000 y 422 000 especies de plantas. Sin embargo la actividad biológica de muchos de sus compuestos activos aún se desconoce [3, 4]. En la última década se han realizado estudios para demostrar la actividad antifúngica de los extractos de plantas [5].

L. tridentata, conocida comúnmente como gobernadora, ha sido estudiada por varios autores con la finalidad de investigar su potencial como antimicrobiano y considerar su uso como conservador en alimentos. Tequida-Meneses et al. [6] encontraron que los extractos metanólico y etanólico de *L. tridentata* inhibieron el crecimiento de seis especies de hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*,

Penicillium chrysogenum, *P. expansum*, *Fusarium poae* y *F. moniforme*) en un rango de 41.5 a 100%; Lira-Saldívar et al. [7] encontraron que los extractos de *Larrea tridentata* pueden ser de uso práctico como compuestos antifúngicos de bajo impacto ambiental y con importantes posibilidades industriales; Lira-Saldívar et al. [8] analizaron el efecto antifúngico del quitosán y de extractos de *L. tridentata* en forma combinada. Los resultados mostraron que ambos biocompuestos inhiben el crecimiento micelial y la esporulación de hongos fitopatógenos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso del extracto de *L. tridentata* y sorbato de potasio –un antifúngico convencional– en forma individual y combinada, a diferentes valores de pH sobre los parámetros de crecimiento de *A. flavus*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos propuestos, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

A. Obtención del extracto

Se utilizaron hojas secas de *L. tridentata* (gobernadora). Éstas se molieron en una licuadora (marca Ozter) hasta obtener un tamaño mínimo de la planta. Para la obtención del extracto se pesaron 20 g de hojas secas y molidas, se colocaron en un cartucho y se sometieron a reflujo en el equipo Soxhlet, durante dos horas, utilizando como disolvente 200 mL de etanol al 80%. Después del reflujo se utilizó un rotavapor (marca Büchi) para recuperar el solvente y obtener el extracto húmedo. Éste se colocó en la estufa de convención a 70 °C durante 48 horas para obtener el extracto seco.

B. Preparación del extracto

El extracto seco se pesó y se aforó a 100 mL con agua destilada. Las soluciones se esterilizaron utilizando filtros de membrana con poros de 0.45 µm. La solución preparada se guardó a 10 °C hasta su uso. A partir de esta solución se tomó el volumen necesario para adicionar al medio de cultivo y tener en el mismo concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm.

C. Preparación del inóculo

Se utilizó una cepa de *Aspergillus flavus*, aislada e identificada de acuerdo a Samsom y Hockstra [9], la cual se sembró en cuñas agar papa dextrosa (marca Merck) y se mantuvo a 30°C por diez días. A partir del cultivo se preparó una suspensión de esporas, lavando la superficie con 10 mL de solución Tween 80 al 0.1 %. A partir de esta suspensión se procedió a contar el número de esporas en la cámara de Neubauer. La suspensión de esporas se almacenó a 10°C hasta su uso.

D. Preparación de los sistemas modelo

Se prepararon placas con Agar Czapek (marca Merck) agregando sacarosa comercial para ajustar la actividad de agua a 0.96. Los medios de cultivo se esterilizaron por 15 minutos a 121°C. El pH de los medios se ajustó a 3, 4 y 5 con ácido cítrico al 10% y se agregó la cantidad necesaria del extracto de *Larrea tridentata* (LT) y de sorbato de potasio para obtener concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm. Ambos compuestos se estudiaron en forma individual y combinada. Cada medio en cada condición se preparó por triplicado.

E. Inoculación del sistema

Una vez preparados los medios de cultivo se inocularon 2 µL de la suspensión de esporas de *A. flavus* en el centro del medio de cultivo. Los sistemas inoculados se incubaron a 30 °C en recipientes herméticos de plástico con la finalidad de prevenir el cambio de humedad

F. Medición del crecimiento

Los cultivos se observaron diariamente durante 10 días. Los diámetros de las colonias se midieron cada 24 hrs. con un vernier y se graficaron contra el tiempo para obtener la curva de crecimiento del hongo y en cada condición. Las curvas de crecimiento se ajustaron empleando el programa DMFit [10] y se obtuvieron los parámetros de crecimiento del hongo en cada una de las condiciones estudiadas.

G. Análisis estadístico

Para determinar el efecto del pH sobre los parámetros de crecimiento de *A. flavus*, cuando se usa extracto de LT y SK en forma individual y combinada, se realizó un análisis de varianza (Smith's Statistical Package).

III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de *A. flavus* al usar extracto de *L. tridentata* y sorbato de potasio en forma individual y combinada, a diferentes valores de pH.

Tabla I. % de inhibición del crecimiento de *A. flavus**.

Concentración del extracto ppm	LT			SK			LT/SK		
	3	4	5	3	4	5	3	4	5
50	9.88	9.21	36.53	0	0	2.39	13.68	7.36	1.19
100	18.52	16.57	32.34	15.43	0	1.19	32.71	26.38	8.98
250	44.5	47.24	61.08	16.56	0	8.38	56.79	39.87	32.93
500	62.97	65.65	64.68	25.92	25.15	9.59	19.75	70.55	70.65
1000	71.91	69.33	70.06	34.38	27.97	10.0	81.48	82.82	81.43

*Los valores reportados son el promedio de los triplicados en cada caso.

LT: *Larrea tridentata*. SK: Sorbato de potasio. LT/SK (50/50, 100/100, 250/250, 500/500 y 1000/1000).

Independientemente del pH, el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo se ocurrió al usar concentraciones de 1000 ppm tanto en forma individual y combinada de LT y SK, lo que indica un efecto sinérgico entre ambos compuestos. Las curvas de crecimiento del hongo en cada condición se ajustaron y se obtuvieron los parámetros de crecimiento-velocidad de crecimiento, tiempo de latencia y crecimiento máximo- de *A. flavus* tanto en los sistemas control (0/0 LT/SK), como en los sistemas en los que se emplearon concentraciones individuales y combinadas de LT y SK (Tabla 2).

Se observó que en relación a los sistemas control, el hongo disminuyó su velocidad de crecimiento y crecimiento máximo, mientras que el tiempo de latencia aumentó. Acerca del efecto del pH sobre los parámetros de crecimiento de *A. flavus* al emplear el extracto de LT y SK tanto en forma individual como en forma combinada, cuando se comparó el valor de $F_{calculada}$ con el valor de F_{Tablas} , se demostró que hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el efecto del pH sobre el tiempo de latencia del hongo. En el caso de la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo, el valor calculado fue menor que el de tablas, lo que indica que no hay diferencia entre las medias, por lo que se infiere que el pH no tiene un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre dichos parámetros.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Tequida-Meneses et al. [6] quienes probaron la actividad fúngica de *L. tridentata* empleando 5000 ppm. Por otro lado López-Benitez et al. [11] demostraron que extractos de *L. tridentata* al 5 y 10% inhiben el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos, mientras que Moreno Limón et al. [12] establecieron una Concentración Mínima Inhibitoria de 7 mg/mL de extracto hidroalcohólico de *L. tridentata* para *A. flavus*.

Tabla II. Parámetros de crecimiento* de *A. flavus*.

Parámetro de crecimiento	LT			SK			LT/SK		
	pH								
	3	4	5	3	4	5	3	4	5
Velocidad de crecimiento (mm/h)	0.09 (±0.03)	0.09 (±0.003)	0.10 (±0.09)	0.31 (±0.05)	0.30 (±0.05)	0.43 (±0.11)	0.07 (±0.01)	0.08 (±0.02)	0.06 (±0.04)
Control	0.35 (±0.13)	0.57 (±0.12)	0.51 (±0.11)	0.35 (±0.09)	0.57 (±0.21)	0.51 (±0.19)	0.35 (±0.18)	0.57 (±0.20)	0.51 (±0.21)
Tiempo de latencia (hrs.)	42.85 (±2.03)	40.10 (±4.07)	41.50 (±1.02)	42.85 (±3.05)	70.08 (±1.09)	83.00 (±2.04)	44.20 (±2.97)	42.20 (±4.34)	45.10 (±1.01)
Control	16.18 (±1.13)	14.25 (±1.76)	16.25 (±2.33)	40.49 (±2.01)	66.59 (±1.24)	77.38 (±3.36)	42.85 (±1.88)	40.10 (±1.09)	36.50 (±2.27)
Crecimiento máximo (mm)	79.85 (±1.18)	84.75 (±2.01)	79.35 (±1.04)	65.50 (±2.09)	72.00 (±2.10)	74.50 (±3.01)	64.50 (±3.00)	70.00 (±2.98)	66.00 (±1.27)
Control	82.84 (±3.24)	85.71 (±2.07)	84.83 (±3.02)	82.80 (±2.06)	80.70 (±2.71)	84.88 (±2.99)	82.84 (±1.35)	87.70 (±2.08)	84.80 (±1.96)

*Los valores reportados son el promedio de los triplicados en cada caso.

L. tridentata (LT 1000/0 ppm), sorbato de potasio (SK 0/1000 ppm) y *L. tridentata* y sorbato de potasio (LT/SK 1000/1000). () Desviación estándar.

IV. CONCLUSIONES

Aunque en este trabajo se usaron concentraciones menores a las reportadas por otros autores, se comprueba que *L. tridentata* puede emplearse en menor cantidad si se aplican métodos combinados, tales como el uso de conservadores convencionales y factores de conservación.

Si se considera que en el caso de los alimentos, éstos no necesariamente deben de ser estériles, sino que se acepta un determinado número de microorganismos, estos resultados cobran importancia cuando se pretende usar nuevas sustancias como conservadores, para prolongar el tiempo de latencia de un microorganismo y mantener al producto dentro de su período de vida útil.

REFERENCIAS

- [1] Fernández-Escartín, F. (2000). Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- [2] Daferera, D., Ziogas, B. and Polissiou, M. (2000). GC-MS análisis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem., 48(6): 2576-2581.
- [3] Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today, 5(7): 294-300.
- [4] Xinsheng, Y., Ke, H., Jianghua, L., Nali, W., Chengbin, C. y Xiangjiu, H. (2006), Current Trends and Future Prospects of Traditional Chinese Medicines in the 21st Century. In Herbs: Challenges in Chemistry and Biology; Wang, M., el al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2006. <http://pubs.acs.org>, (Consultada el 23 de Octubre de 2009).

- [5] Tomczykowa, M., Tomczyk, M., Jakoniuk, P. y Trynieszewska, E. (2008). Antimicrobial and antifungal activities of the extracts and essential oils of *Bidens tripartita*. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 46(3): 389-393
- [6] Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., López-Sandoval, S. y Corrales-Maldonado, C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev. Iberoam. de Micol.*, 19: 84-88.
- [7] Lira-Saldivar, R. H., Sánchez, M. del R., Gamboa, R., Jasso, D. and Rodríguez, R. (2003). Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* extracts from the Chihuahuan and Sonoran Mexican deserts on *Alternaria solani*. *Agrochim*, 47: 54-60.
- [8] Lira-Saldivar, R. H., Hernández Suárez, M. y Hernández Castillo, F. D. (2006). Activity of *Larrea tridentata* (D.C) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Rev. Chapingo. Serie horticultura*, 12(2): 211-216.
- [9] Samsom, A. R. y Hockstra, E. S. (1995). Introduction to food-borne fungi. (4a. ed.). Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn Delft. Netherlands. Pág.. 60-64.
- [10] Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 277-294.
- [11] Lopez-Benitez, A., López-Betancourt, S. R. y Mendoza-Elos, M. (2004). Efecto de extractos vegetales en el crecimiento de *Rhizoctonia solani* Kün in vitro y en plantas de frijol susceptible. CIGA, ITA. 33.
- [12] Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L. y Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 1(3), 193-205.