

Alcaloides del *claviceps* spp en sorgo del estado de Morelos, México

Raquel Valdez Álvarez *
René Rosiles Martínez *

Abstract

This article describes the natural cycle of *Claviceps purpurea* in sorghum and other grains. It also describes the first finding of the *Claviceps* spp alkaloid, which is an ergonovine derivative identified by thin layer chromatography under the long wave ultraviolet light, but unreactive to the van Urk reagent in sorghum from the state of Morelos, Mexico. The macroscopic characterization of Esclerotia, the honey-like fluid produced by *Claviceps* spp during the infection of the sorghum ovary as well as the clinical signs of animals suffering of *Claviceps* alkaloids toxicity are described. The number of esclerotias needed to induce toxicity in animals is also mentioned.

Key words: MEXICAN SORGHUM, *CLAVICEPS*, ALKALOIDS.

Resumen

La información del presente escrito es con el fin de dar a conocer la identificación de alcaloides del hongo *Claviceps* spp en sorgo proveniente del estado de Morelos, México. Se describe el ciclo de vida de *Claviceps purpurea* (ergot o cornezuelo), sus características macroscópicas, toxicidad, número de esclerocios necesarias para inducir la intoxicación, efectos farmacológicos de los alcaloides (ergonovina y ergotamina), signos clínicos y hallazgos de necropsia de la intoxicación por alcaloides del *Claviceps purpurea*. Y finalmente se describe la identificación de tres compuestos (alcaloides) por cromatografía de capa fina en el sorgo del estado de Morelos; con comportamiento igual al de derivados del maleato de ergonovina, pero sin reaccionar al colorante de van Urk.

Palabras clave: SORGO MEXICANO, ALKALOIDES, *CLAVICEPS* spp.

El término "ergot" significa espolón en francés y en español (cornezuelo), se aplica como nombre común a la lesión por el crecimiento de especies de hongos del género *Claviceps* en los granos. También se usa más precisamente para referirse al esclerosio formado por *C. purpurea* cuando infecta al Rye grass u otros granos. El uso de los alcaloides de *Claviceps purpurea* como

constrictores de los capilares sanguíneos del útero; en el parto para el control de las hemorragias, hace algunos años se usaba como terapia, pero debido a los efectos secundarios actualmente se reduce cada día más. El envenenamiento de los humanos por los alcaloides del *Claviceps* en los últimos años se ha reducido, pero en los animales ocasionalmente aún aparece con cierta seve-

Recibido el 15 de enero de 1998 y aceptado el 12 de agosto de 1998.

* Laboratorio de Toxicología, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

ridad. Las especies del género *Claviceps* son hongos Ascomycetos de vida y ciclo complejos que parasitan las gramíneas cultivadas y silvestres. Los cultivos parasitados son: sorgo, ballico, trigo, cebada y un gran número de gramíneas silvestres. *Claviceps paspali*, *C. cinerea*, se sabe que inducen la producción de alcaloides y son responsables de la enfermedad, así como reducción importante de la cosecha. Las pérdidas en la ganadería resultan por la ingestión de zacates frescos o henificados con alcaloides en los granos infectados. En la agricultura la reducción del número de toneladas por hectárea de cultivo es de importancia económica. Algunas especies de gramíneas silvestres se han demostrado altamente susceptibles a la infección y, por lo tanto, peligrosas como fuente de alcaloides; entre éstas, las especies de los géneros *Agropyron* (zacate del trigo), *Agrostis* (zacate punta roja), *Bromus* (zacate liso), *Calamagrostis* (zacate de nódulo articular azul). Otro hongo que afecta a las gramíneas silvestres es el *Acremonium coenophialum*, el cual produce alcaloides pirrolizidínicos y que se

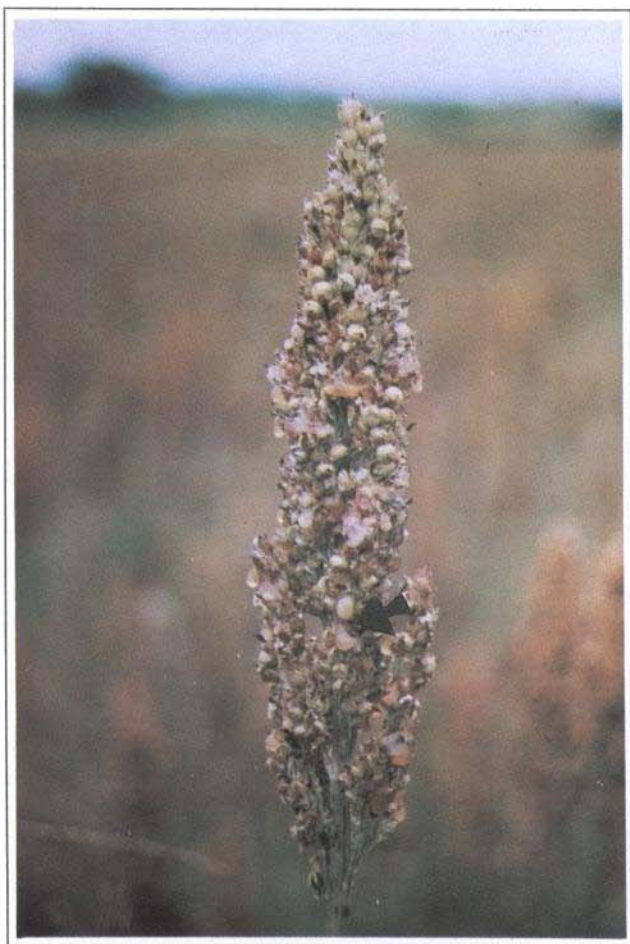


Figura 1. Panoja de sorgo con gotas de un líquido amarillento y consistencia gomosa y el número de granos reducido hasta un 95%.

manifiesta en los animales con un cuadro similar al que se presenta en el consumo de alcaloides de *Claviceps*.^{1,2}

Las especies del género *Claviceps* infectan el ovario de zacates en desarrollo. La infección aparece en el tiempo en que el pistilo de la flor se abre; es decir, durante la polinización. Al principio los filamentos del hongo se ramifican a través de todo el tejido del ovario para obtener sus nutrimentos y prevenir el desarrollo de la semilla. Las esporas asexuales en forma de cadenas afiladas en las puntas de los filamentos alcanzan la superficie del ovario y son excretados en gotas de un exudado pegajoso (rocío de miel) formado por el hospedero (Figura 1). La infección de otras espigas aparece por el transporte de las esporas por los insectos. Hasta este punto no hay sustancias tóxicas en el grano, pero sí una importante pérdida en la cosecha. Simultáneamente con la producción de la espora, la malla filamentosa del hongo continúa desarrollándose en el ovario del hospedero hasta llegar a formar una estructura compacta y endurecida, que eventualmente se transforma en una estructura dura púrpura o rosácea que gradualmente reemplaza al grano, conocida como esclerosio. Esta masa de forma esférica del grano varía en tamaño hasta tres veces más grande que el original, dependiendo de la especie. Su superficie está irregularmente fisurada y su masa homogénea y blanca al corte. Esto es designado como "esclerosio" y constituye el estado venenoso del ciclo de la vida del hongo en el grano. Durante el invierno produce una segunda espora sexual llamada "ascospora", que son crecimientos pequeños en forma de champiñón y aparecen sobre la superficie terrestre en primavera. La ascospora efectúa una infección inicial sobre el grano del zacate en la siguiente estación. Los esclerosios son fácilmente observables cuando están presentes en cereales o granos cultivados. En algunas ocasiones estas semillas de zacates silvestres pueden ser tan pequeñas que no son visibles a simple vista.^{1,2}

En este caso, la cosecha del sorgo se redujo hasta 25%, por reducción de la cantidad y calidad del grano, como se observa en la panoja de sorgo de la Figura 1. Las estaciones de crecimiento muy húmedas promueven infecciones más densas.

El grano infectado por el *Claviceps* contiene un gran número de aminas o alcaloides y otros compuestos nitrogenados activos o inactivos. Los alcaloides activos son ergocriptina, ergocornina, ergocristina, ergotamina, ergosina y ergonovina. De éstos la ergonovina y ergotamina son los de mayor actividad constrictora. El término de ergotoxina que se encuentra en la literatura se refiere a un complejo alcaloídico, que está compuesto de los tres primeros alcaloides de este grupo. La ergometrina y ergobasina son sinónimos de ergonovina. Los alcaloides del *Claviceps* contienen ácido lisérgico en combinación con varias estructuras amiloides. La ergonovina es la más simple y sólo tiene una amina unida a la estructura del ácido lisérgico. Alcaloides como la ergotamina son polipéptidos unidos al ácido lisérgico y dos grupos de aminoácidos.^{1,2}

Toxicidad, signos y lesiones

En intoxicación por alcaloides del *Claviceps*, la mayoría de los signos y lesiones resultan de su habilidad para contraer el músculo liso vascular. Médicamente algunos de estos alcaloides en particular se usan para inducir contracciones de la musculatura arteriolar y del músculo liso del tracto gastrointestinal. Esta fisiotoxicología es importante en la producción de signos y lesiones. La ingestión de pequeñas cantidades de esclerosios diariamente durante un periodo de varias semanas a varios meses, resulta en un envenenamiento crónico caracterizado por necrosis del tejido de las extremidades. La gangrena seca en las extremidades es lo clásico de la intoxicación en las poblaciones humanas. Epidemias de intoxicación alcanzaron proporciones de significancia histórica en ciertos países europeos antes del siglo XVII. Ocasionalmente todavía ocurren brotes aislados en países donde el control de la pureza del grano no es efectiva.¹

En bovinos, que es el animal más comúnmente afectado, aparecen dos síndromes: el gangrenoso y el convulsivo. Cantidades relativamente importantes de granos o heno con esclerosios del grano, consumidas diariamente, pueden inducir el síndrome gangrenoso. Han habido grandes brotes casi al punto de provocar el fracaso de la industria entera de la ganadería, cuando aquéllos se confundieron con fiebre aftosa.^{3,4,5,6}

Cien gramos de granos infectados por día durante 11 días produjeron el síndrome gangrenoso en una vaca (0.02% del peso vivo del animal por día). En otro incidente, el ganado mostró nerviosismo y caída de las pezuñas después de pastorear durante una semana en praderas en donde abundaba el claviceps. Los alcaloides del *Claviceps* en dosis diarias causan vasoconstricción y predisposición a la trombosis con oclusión de la circulación en las extremidades. La mayoría de los casos involucran a una o ambas pezuñas posteriores. La claudicación se sigue de enfriamiento e insensibilidad en las áreas afectadas (extremos de los apéndices corporales). Una porción grande de las extremidades, la punta de la cola, la punta de las orejas, y a menudo la lengua, puede llegar a gangrenarse en casos severos. En casos típicos se distinguen unas bandas circulares entre las áreas sanas y las afectadas, se forma una grieta entre la constricción de los tejidos gangrenosos y el tejido sano que separa una área limpia y cicatricial del área enferma. Una cierta cantidad de hinchazón y enrojecimiento puede asociarse con este proceso. Ocasionalmente en el lugar de la gangrena seca, algo de suero escurre y ocurre infección secundaria. El desprendimiento o caída de una de las falanges de los dedos a nivel articular causa pérdida de uno o ambos dedos de la pezuña. En casos extremos, la necrosis puede ocurrir en cualquier punto distal del tercer metatarso o metacarpo, en estos casos los huesos desnudos se exponen por la caída del tejido necrosado. Las lesiones que involucran a la musculatura lisa del sistema digestivo, generalmente preceden o acompañan a los signos

internos, éstos incluyen: náusea, vómito, evidencias de dolor abdominal y constipación o diarrea. En algunos casos las membranas de la mucosa oral se hinchan o muestran erosiones superficiales de ¼ de pulgada a una pulgada de diámetro. Los animales gestantes pueden abortar.^{5,6}

La intoxicación convulsiva en ganado vacuno aparece como resultado de la ingestión de grandes cantidades de granos infectados por día. Además de los signos de dolor gastrointestinal, como en el síndrome gangrenoso, también se observan signos nerviosos.

El síndrome convulsivo se ha presentado en bovinos después de la ingestión de granos infectados con *Claviceps purpurea*. Esto ocurre ocasionalmente también en animales alimentados, sobre todo con granos infectados con *Claviceps cinerea*. Los signos aparecen en un lapso de 48 horas a una semana después de que los animales tienen acceso a los granos infectados.

El primer signo del síndrome convulsivo es la excitación extrema, los animales desconfían de las personas que se acercan. Esto puede estar acompañado por beligerancia y seguido de un estado que evidencia temblor e incoordinación. Hay una exagerada flexión de los miembros delanteros que se puede observar cuando los animales corren. Un repentino estímulo, como aplaudir, provoca que el animal después de estar quieto se caiga.^{3,6} Los animales excitados se caen cuando tratan de escapar. Algunas veces los animales envenenados mueren ahogados mientras intentan beber agua. La frecuencia cardíaca y el pulso se aceleran considerablemente cuando los animales están excitados. Existe buen apetito cuando los animales mantienen suficiente coordinación para pastar. En envenenamientos severos, los periodos de pataleo son inesperados y aparecen conjuntamente con periodos de rigidez tetánica y opistótonos. Al retirar de la fuente a animales enfermos, se recuperan en pocos días. La muerte se presenta en un mes a causa de sed o inanición en casos de severidad media; la muerte puede ocurrir en tres días, en animales severamente afectados. La sedación en los animales excitados, generalmente tiene efecto benéfico por el control del estímulo, al evitar los traumas. El cuidado para eliminar la excitación excesiva se logra al separar a los animales de la vegetación infectada.

Los caballos y los borregos, así como los bovinos desarrollan un síndrome convulsivo típico.

En la necropsia del cuadro convulsivo, las lesiones de gangrena son escasas y no características. Los cambios degenerativos en el sistema nervioso central de los borregos han sido descritos histológicamente como resultado del incremento de la presión de fluido cerebroespinal, así como la asociación con una hipovitaminosis A.^{1,2}

El envenenamiento por alcaloides del *Claviceps* en animales no rumiantes es raro. Las aves se envenenan por consumo de granos contaminados, la cresta y el pico son las partes que más comúnmente llegan a gangrenarse.^{7,8} Las aves, en contraste, pueden tolerar mayores

concentraciones de alcaloides. Recientes estudios proponen límites de 0.3% y 0.8% de granos afectados en los alimentos para ave como la gallina y pollo Leghorn. Los resultados experimentales demostraron que hay una disminución progresiva en el desarrollo de aves de las líneas Leghorn Blanca que recibieron un alimento con granos contaminados al compararse con aves, a las cuales se les dio una dieta comercial que no contenía estos granos, después de 3 y 4 semanas de exposición. Las aves que consumieron 1% de esclerosios en la dieta tuvieron aproximadamente 10% menos de ganancia de peso que un grupo testigo. Y en aquellas que fueron expuestas a 8% de esclerosios en la dieta, tuvieron menor ganancia de peso en un 80%. La mortalidad fue baja en dietas que contenían 3% de esclerosios, pero con el incremento del número de éstas, hubo un dramático y progresivo incremento en las muertes.^{7,8} De la poca información que se tiene, parece que el efecto de los alcaloides del *Claviceps* puede variar considerablemente con el tipo de animal. Se ha notificado pérdida de peso en lechones con dietas a base de granos moderadamente infectados. Mediante hallazgos experimentales y brotes naturales, se estableció que en cerdas aún con pequeñas cantidades de granos esclerosados durante la gestación, no hubo adecuado desarrollo mamario y no tuvieron leche al parto. Este efecto puede ser reversible si el grano contaminado se elimina de la dieta pocas semanas antes del parto. Pequeñas cantidades de granos contaminados en la dieta en cualquier etapa de gestación contribuyen al desarrollo de neonatos débiles o muertos. La reducción de la producción de leche ha sido notificada en bovinos, como causa de la ingestión de los alcaloides del *Claviceps*.¹

En casos de envenenamiento de los animales en pastoreo, las semillas esclerosadas pueden obtenerse de los pastos o de las heces; asimismo, se obtiene de animales cuando éstos son alimentados con granos o con detritos contaminados. Aunque la toxicidad está bien identificada y los casos de gran magnitud son prácticamente inexistentes, la mayoría de los casos de gangrena han resultado por el consumo de pasturas silvestres o heno, especialmente en las praderas. Se puede esperar que ocurran casos más frecuentemente después de veranos húmedos, cuando los hongos producen su mayor infestación y crecimiento. Los caballos son los menos afectados por envenenamiento debido a sus hábitos selectivos de alimentación. *Claviceps paspali* en el pasto "Dallis" ha sido notificado como incapaz de producir el síndrome gangrenoso. El envenenamiento convulsivo por *C. paspali* representa un serio problema en el sur de los Estados Unidos de América; esta situación resulta como consecuencia del pastoreo de animales en praderas con pasto "Dallis" y ocurre al final de verano y principios de otoño. El heno de dicho pasto es potencialmente tóxico y ha producido casos de envenenamiento en caballos durante el invierno, pero la mayoría de los granos esclerosados son eliminados del heno mediante un adecuado manejo. El ganado, en cambio, no los rechaza cuando pastorea en praderas

donde abunda el pasto "Dallis", no sólo consume las hojas, sino que además ingiere una gran cantidad de semillas infectadas. El control de este tipo de envenenamiento puede ser efectuado por medio de prácticas en las que se utilice el forraje antes de la florescencia, o bien por corte al momento de la floración. Se han hecho intentos por formar variedades de centeno resistente a la infección por el *Claviceps*, los cuales no han sido exitosos. Es importante enfatizar que el sobrepastoreo es dañino, ya que da tiempo a que los pastos desarrollen los esclerosios y se conviertan en un peligro.^{4,5,6}

La significancia de los alcaloides del *Claviceps* en medicina y farmacia se destaca en el gran número de publicaciones analíticas concernientes al tema. En el año de 1969, Stahl⁹ separó los alcaloides principales: ergocristina, ergotamina y ergometrina en placas de sílica gel G, empleando cloroformo-etanol (95 + 5) como fase móvil. También los alcaloides se han separado en una placa de celulosa en polvo, impregnada con formalina. Sin embargo, en la mayoría de los casos los alcaloides han sido separados en placas de alumina y sílica gel G. La fluorescencia con rayos ultravioleta en onda larga ha servido como una regla para su visualización. La detección con el reactivo de Van Urk es recomendable, una vez separados en la cromatoplaque.¹⁰

Se han realizado numerosos métodos para la determinación cuantitativa de cada alcaloide. También se ha desarrollado un procedimiento que combina el método anterior con la espectrometría de luz ultravioleta. Stahl⁹ menciona una evaluación fotométrica de las bandas después de la coloración con el reactivo modificado de Van Urk. La amplificación de la banda fue usada para dar una resolución aguda.

Con motivo de la separación de los isómeros de chanoclavia de *Claviceps purpurea* se ha empleado una placa de sílica gel y cloroformo-butanol (66 + 33), como fase móvil, en una cámara saturada con amoníaco. Las condiciones generales de crecimiento del centeno han sido utilizadas también en la investigación de los hongos colectados de mazorca de maíz. Los alcaloides chanoclavia, dihidroelimoclavia, elimoclavina, festuclavina, piraclavina y agroclavina, también se han encontrado en granos contaminados con *Claviceps* en forma natural. De la misma manera ha sido posible establecer la composición de los alcaloides del hongo en *Pennisetum ipomoea*, *Claviceps paspali*, *Rivera corymbosa*, L. y *Penicillium chermenisium*. También se ha tenido éxito en la detección de los alcaloides: ácido amídico d-isolisérgico, chanoclavia y lisergol en semilla de la planta "ololiuqui" o "droga milagrosa" *Rivera corimbosa* L., después de la extracción bajo condiciones templadas, en sílica gel G al usar cloroformo-metanol (70 + 30) como fase móvil y en placas de óxido de aluminio con cloroformo-metanol (95 + 5) como fase móvil. La cromatografía de capa fina ha sido aplicada en estudios de reacciones químicas de alcaloides del *Claviceps*, así como con la configuración del ácido lisérgico, biogénesis y preparaciones farmacéuticas.^{9,10}

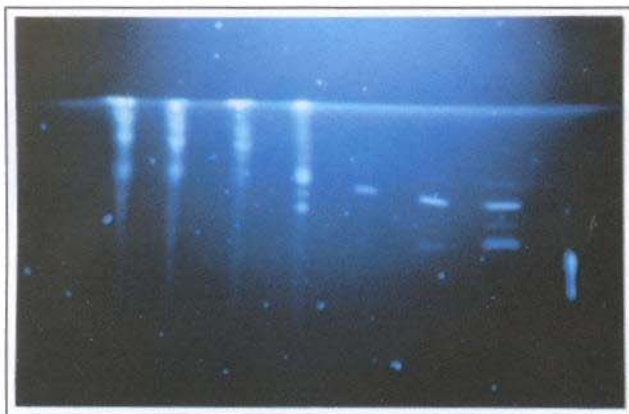


Figura 2. Cromatopla de capa fina con ocho aplicaciones de izquierda a derecha. De la 1 a la 3, extractos de alcaloides de muestras de sorgo y la 4 de solución de maleato de ergonovina. De la 5 a la 8, soluciones comerciales de maleato de ergonovina.

Se ha intentado, sin éxito, la separación por cromatografía de capa fina de los pigmentos presentes en fármacos con extractos de alcaloides. La posibilidad de llevar a cabo pruebas de estabilidad cuantitativa en preparaciones acuosas de alcaloides del *Claviceps*, al usar cromatografía de capa fina, también se ha logrado. En la lista de los metabolitos producidos por el *Claviceps* se encuentran los siguientes: ácido lisérgico, ácido isolisérgico, ergosina, ergometrina, ergocristina, ergocornina, ergocriptina, ergotamina, ergosinina, ergocristinina, ergocriptinina, ácido dihidrolisérgico. Los metabolitos de importancia farmacológica son: ergometrina, ergotamina, ergosina y ergonovina.^{9,10}

La presencia de esclerosios en los alimentos puede afectar sustancialmente al desarrollo del ganado. Como regla general, un límite permitido de granos afectados es de 0.1% en el alimento para la mayoría de las especies animales como: bovinos, ovinos, cerdos y caballos.

Young y Marquardt⁷ demostraron que la ergotamina no se acumula en los tejidos del cuerpo. Señalan que la concentración total y la proporción de los alcaloides individuales incluso en los granos de la misma espiga, campo y región, pueden ser altamente variables, esto último puede resultar en diferencias de la toxicidad del *Claviceps* entre estudios.

Para la identificación de los derivados de la ergonovina en sorgo procedente de Tlautepec, Morelos, México, se colectaron muestras de espiga de sorgo que presentaban un líquido denso amarillento con aspecto de miel, sin desarrollo del grano y muestras de espigas con granos reventados de color blanquecino y de un tamaño de 2 a 3 veces del original, similar al propio del grano. Las muestras de sorgo enmielado, y con la estructura blanquecina (esclerosio), y un producto comercial

inyectable hecho a base de maleato de ergonovina, se sujetaron al análisis de alcaloides. Éste consiste en una extracción acuosa inicial en medio ácido pH 2, a temperatura de 70° C durante 15 minutos y un desengrasado con éter etílico. La separación final se realiza con cloroformo una vez llevado el extracto a un pH 12. El análisis de cromatografía por capa fina se desarrolló en una placa de sílica gel G de 20 cm de superficie y de 0.2 mm de espesor como fase estacionaria y una mezcla de cloroformo y metanol como fase móvil.^{9,10} Los resultados por cromatografía de capa fina revelaron que el maleato de ergonovina se observó a un Rf de 10 cm y de un color azul a la inspección por luz ultravioleta de onda larga (Figura 2). El maleato de ergonovina que se sometió a la extracción de alcaloides se desdobló en 3 compuestos de color amarillo con Rf de 12, 14 y 16 cm. En el extracto para alcaloides que se le practicó al sorgo que contenía las estructuras parecidas a un esclerosio, se encontraron 3 compuestos con Rf de 12, 14 y 16 cm que coinciden con los derivados de la ergonovina una vez que ésta se sujetó a la extracción de alcaloides. En el sorgo analizado para alcaloides que no contenía las estructuras parecidas a los esclerosios, no se observó ningún compuesto fluorescente en el trayecto del cromatograma.

Estos hallazgos indican que el compuesto básico de los alcaloides del *Claviceps* sí existen en el sorgo, pero no se comportan como la sal comercial de ergonovina (maleato de ergonovina).

Referencias

1. Buffening JP. Ergotism. J Am Vet Med Assoc 1973;163:1288-1290.
2. Kingsbury JM. Poisonous plants of the United States and Canada. Englewood Cliffs (NJ): Prentice-Hall, 1964.
3. Cysewski SJ. Paspalum staggers and tremorgen intoxication in animals. J Am Vet Med Assoc 1973;163:1291-1292.
4. Rotter RG, Crow GH. A comparison of increasing dietary concentrations of wheat ergot on the performance of Leghorn and broiler chicks. Can J Anim Sci 1985;65:963-974.
5. Paterson J, Forcherio C, Larson B, Samford M, Kerley M. The effects of fescue toxicosis on beef cattle productivity. J Anim Sci 1995;73:889-898.
6. Porter JK. Analysis of endophyte toxins fescue and other grasses toxic to livestock. J Anim Sci 1995;73:871-880.
7. Young JC, Marquardt RR. Effects of ergotamine tartrate on growing chicken. Can J Anim Sci 1985;65:1181-1191.
8. Westendorf ML, Mitchell GE, Tucker RE, Bush LP, Petroski RJ, Powell RG. In vitro and in vivo ruminal and physiological responses to endophyte-infected tall fescue. J Dairy Sci 1993;76:555-563.
9. Stahl E. Thin-layer chromatography, a laboratory handbook. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1969.
10. Stahr MK. Analytical toxicology methods manual. Ames (IA): Iowa State University Press, 1975.