

Investigación y detección de metabolitos fúngicos con actividad bactericida, fungicida e insecticida

■ A.B. GIMÉNEZ, F.J. GARCÍA BREJO, J. ROSELLO, Y M.P. SANTAMARINA

INTRODUCCIÓN

La producción actual de alimentos no podría mantenerse sin el uso de los plaguicidas y la posibilidad de alimentar a la población mundial del siglo XXI sería utópica con una agricultura desprovista de medios para luchar contra los insectos, las malas hierbas, los ácaros, las bacterias y hongos fitopatógenos, etc. (PRIMO YUFERA, 1991). Sin embargo, la mayoría de los plaguicidas actuales tienen grandes inconvenientes, por su toxicidad o por los daños ecológicos que producen. Así pues, se hacen necesarias medidas para disminuir el riesgo y desarrollar nuevas tecnologías.

Una solución sería el descubrimiento de nuevos productos que sean selectivos para especies determinadas de insectos, o para un grupo de especies afines, y que no lo sean para insectos beneficiosos ni para el medio ambiente ni tóxicos para otras especies de vida. Actualmente, productos obtenidos a partir de microorganismos están siendo empleados como plaguicidas (fungicidas, bactericidas, insecticidas y herbicidas) en la protección de los cultivos (CROMBIE, 1999; MARRONE, 1999; YAMAGUCHI, 1992).

Los metabolitos secundarios de procedencia fúngica que presentan actividades biológicas están siendo considerados como potentes plaguicidas. Además, muchos de ellos tienen la ventaja sobre los convencionales de que son efectivos a concentraciones muy bajas, no son persistentes y no causan daño en el medio ambiente. Actualmente hay ya muchas especies fúngicas que están siendo utilizadas en la lucha biológica contra insectos, son los hongos entomopatógenos. Así tenemos como *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutiella thomsonii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Penicillium chrisogenum*, *P. aurantiogriseum*, y *Zoophthora radicans* ya se emplean en muchas partes del mundo para combatir plagas de insectos. Son sobre todo los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* los que aparecen como mayores productores de sustancias de este tipo (CANTIN, 1998; CASTILLO, 1999; CROMBIE, 1999)

En este trabajo se ha realizado un estudio general de diferentes cepas fúngicas que se han aislado y purificado a partir de materiales contaminados con objeto de determinar si algunas de ellas eran productoras de metabolitos con actividad biológica. Para ello se han seguido los pasos siguientes: 1. Aislamiento, purificación e identificación de las cepas fúngicas; 2. Detección mediante tests de antibiosis de las cepas que presentaban actividad antibiótica; 3. Selección de aquellas cepas de mayor actividad para la realización de sus respectivos extractos; y 4. Estudio de las actividades bactericida, fungicida e insecticida de las cepas seleccionadas. Se han conseguido aislar cepas de *Penicillium* que presentaban actividades bactericidas, fungicidas e insecticidas interesantes.

Material y métodos

Organismos empleados.

Los microorganismos que se emplearon en los diferentes bioensayos para la determinación de las actividades bactericida y fungicida procedían en su mayoría de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), aunque también había algunos procedentes de la E.T.S.I.A. de Lleida (Cultivos Reus, RE y Microbiología Tecnología Alimentos Lleida, MTLA).

Se ensayaron 66 cepas fúngicas para detectar su posible producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica: 52 procedían de mohos aislados de cereales (trigo y maíz), 3 de contaminación ambiental, y el resto procedían de la CECT con pocos datos sobre los mismos. La distribución de aislamientos por géneros fue: 23 de *Aspergillus*, 28 de *Penicillium*, 3 de *Fusarium* y 1 de *Alternaria*.

Para la determinación de la actividad insecticida se utilizaron insectos de la especie *Oncopeltus fasciatus* procedentes de una colonia mantenida en el laboratorio a 29°C de temperatura y una humedad relativa del 65-70%. Estos insectos se alimentaron con pipas de girasol descascaradas y el agua se administró en pequeños tubos tapados con algodón.

Las cepas bacterianas se mantuvieron en agar nutritivo (AN) y caldo nutritivo (CN) mientras que las fúngicas en agar patata glucosada (PDA).

Aislamiento, purificación e identificación de mohos.

El aislamiento de los cultivos se realizó a partir de frutos o semillas que presentaban una contaminación fúngica. Estas muestras se esterilizaron primero por inmersión en una solución al 5,75 % de hipoclorito sódico durante 1 min. A continuación, se secaron con papel estéril. La muestra o una porción de la misma se coló, siempre en condiciones asepticas, en una placa Petri con medio de cultivo adecuado. Las placas se mantuvieron a 24°C durante 5 días, a cabo de los cuales se examinaron para comprobar el crecimiento fúngico y proceder, posteriormente, a su aislamiento e identificación.

Para el aislamiento y la identificación de los mohos se emplearon las tradicionales técnicas del cultivo de extremos de hifas, cultivos de esporas, o cultivos de dilución, dependiendo en cada caso del tipo y aspecto del moho a purificar.

La identificación de los mohos se realizó en base a sus características morfológicas y culturales. Se realizó hasta el taxón género y los métodos empleados fueron de tipo microscópico (examen de cultivos *in vivo* y examen de cultivos en portaobjetos) y macroscópico (estudio de los caracteres morfológicos y culturales al crecerlos sobre medios específicos como Agar Czapek o Agar Extracto de Malta).

Ensayos preliminares.

Para detectar la posible presencia de metabolitos secundarios fúngicos con actividades antibióticas se realizaron unos ensayos preliminares mediante el Test de Antibiosis o de Wickerham, según el procedimiento clásico. Para ello, se sembró por estría una suspensión de esporas del hongo a ensayar en un lado de la placa (a modo de cuerda de circunferencia) y se incubó a 28 °C durante 4-5 días, a fin de permitir el crecimiento del hongo y la producción de antibiótico. Después se sembraron por estría cruzada los organismos prueba (bacterias), y se incubaron a su temperatura óptima (30-35°C) durante 24h para permitir su desarrollo. Finalmente, se observó si se había producido inhibición del crecimiento de los organismos prueba. Se consideró que se había producido inhibición cuando la distancia entre hongo y bacteria era de 2 cm o más.

Las bacterias ensayadas en este bioensayo fueron *Agrobacterium tumefaciens* (CECT 472), *Pseudomonas solanacearum* (CECT 125), *Xanthomonas campestris* (CECT 97), *Bacillus subtilis* (CECT 356), *Escherichia coli* (CECT 434), *Escherichia coli* (CECT 943), *Serratia marcescens* (CECT 977), *Staphylococcus aureus* (CECT 239), y *Streptomyces albus* (CECT 3077).

Obtención de extractos fúngicos.

Las cepas fúngicas aisladas se sembraron en tubos de agar inclinado de PDA, y se incubaron a 28 °C durante 1 o 2 semanas. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos se agitaron con 5 ml de agua destilada más Tween 80 (0,05%) estéril hasta obtener suspensiones de conidios de aproximadamente 1×10^8 conidios/ml contados en cámara de Thoma.

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo cada uno de ellos. Los medios de cultivo empleados fueron el Antibiotic Test Broth y caldo Patata Glucosada. Cada matraz se inoculó con 1 ml de la suspensión de conidios y se incubó durante 7-14 días a 28°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió en cada matraz a la separación del micelio y del caldo metabólico mediante filtración a través de papel Whatman nº 4. Cada caldo se llevó a un embudo de decantación y se le practicaron 3 lavados con 50 ml de diclorometano, recogiendo la fase inferior en un matraz de 250 ml. Estos extractos de diclorometano se concentraron en rotavapor y se secaron bajo fuente de nitrógeno. Posterior-

TABLA 1

Resultados obtenidos con el test de Wickerham en los cultivos de mohos que presentaron una mayor actividad antibiótica. Tres fueron las cepas de *Aspergillus* más activas, las denominadas A.02T, A.03T y A.22T (T: aisladas de trigo); 5 de *Penicillium*: P.09M, P.10M, P.22M, P.24M y P.26C (M: aisladas de maíz y C: contaminación ambiental); y las dos cepas CECT 2275 y 2278 de *P. expansum* (la cepa 2278 está reseñada como productora de micotoxinas, no así la 2275). El signo - indica que el moho no ha inhibido el crecimiento bacteriano; los números indican un grado de inhibición entre 0 y 4, siendo el 4 una inhibición completa.; ND, no determinado.

	E. coli 434	E. coli 943	S. aureus 239	S. marcescens 977	B. subtilis 356	A. tumefaciens 472	P. solanacearum 125	X. campestris 97	S. albus 3077	
Aspergillus	A.02T	-	-	-	-	3,5	3,5	3,5	3,5	
	A.03T	-	-	-	-	0,5	2,5	2,0	3,0	
	A.22T	1,5	-	-	-	2,5	3,0	2,5	4,0	
Penicillium	P.09M	2,0	1,8	1,0	1,0	3,0	3,0	4,0	3,0	
	P.10M	-	-	-	-	0,5	1,0	2,0	1,0	2,5
	P.22M	3,0	2,5	2,0	3,0	ND	ND	ND	3,5	ND
	P.24M	-	2,0	2,5	2,5	ND	ND	ND	3,0	ND
	P.26C	3,5	3,5	3,0	2,0	4,0	4,0	4,0	ND	3,5
Penicillium expansum	cepas 2275	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	
	cepas 2278	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	

TABLA 2

Extractos fúngicos realizados a partir de las cepas que presentaron mayor actividad en los ensayos preliminares. En todos los casos se empleó el caldo del cultivo y el disolvente de extracción fue diclorometano.

Número de Extracto	Cepa fúngica	Medio de Cultivo
1	P.09M	PDA
2	P.09M	Wickerham
3	P.10M	PDA
4	P.10M	Wickerham
5	P.24M	PDA
6	P.24M	Wickerham
7	P.26M	PDA
8	P.26M	Wickerham

mente se redisolviéron en ciclohexano, acetona o en mezcla de ambos según la solubilidad del extracto en cuestión.

Determinación de la actividad bactericida de los extractos fúngicos.

El método consiste en medir la inhibición del crecimiento bacteriano, impregnando alícuotas de los diferentes extractos en discos de papel. El medio empleado para los ensayos fue el Agar Mueller-Hinton. Las bacterias ensayadas (*Agro-*

bacterium tumefaciens CECT 472, *Escherichia coli* CECT 943, *Pseudomonas solanacearum* CECT 125, *Serratia marcescens* CECT 977 y *Xanthomonas campestris* CECT 97) se hicieron crecer en caldo nutritivo durante 24 h a la temperatura adecuada para cada una de ellas. Tras la incubación se procedió a la inoculación por vertido de 0,5 ml de suspensión bacteriana junto con 25 ml de Agar Mueller-Hinton en placas Petri. Tras la solidificación del medio se colocaron sobre su superficie discos previamente impregnados

TABLA 3

Actividad bactericida de los diferentes extractos fúngicos seleccionados frente a 5 bacterias testigo. Los discos contenían dos concentraciones distintas de extracto (50 mg y 100 mg). Como se observa a la concentración de 50 mg por disco no hay inhibición del crecimiento bacteriano (halos de 5 mm), pero a la concentración de 100 mg por disco se detecta cierta actividad antibacteriana en algunos extractos, especialmente los nº 1, 2 y 6. Los resultados se expresan en mm de inhibición alrededor del disco.

Nº Extracto	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		<i>Bacteriomas congestus</i>		<i>Pseudomonas solanaceorum</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Serratia marcescens</i>	
	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d
1	5	9	5	11	5	10	5	11	5	9
2	5	9	5	5	5	5	5	5	5	9
3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	11
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	5	5	5	11	5	5	5	8	5	9
7	5	5	5	5	5	5	5	10	5	9
8	5	5	5	5	5	5	5	9	5	9

TABLA 4

Actividad fungicida de los diferentes extractos fúngicos seleccionados frente a 5 hongos testigo. Los discos contenían dos concentraciones distintas de extracto (50 mg y 100 mg). Se aprecia una considerable actividad de los extractos 1, 2, 3 y 7 frente al hongo *Curvularia trifolii* a concentraciones de 100 mg por disco que sigue siendo importante a la de 50 mg/d para los extractos 3 y 7. Los extractos 1 y 2 han mostrado también actividad frente al hongo *Aspergillus versicolor*. Así como el extracto 3 que logró crear un halo de inhibición de 17 mm en el crecimiento del hongo *Aspergillus candidus* a una concentración de 50 mg/d. Los resultados se expresan en mm de inhibición alrededor del disco.

Nº Extracto	<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Penicillium griseofulvum</i>		<i>Aspergillus candidus</i>		<i>Curvularia trifolii</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	
	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d	50 µg/d	100 µg/d
1	17	19	5	5	5	10	11	27	5	5
2	12	17	5	5	5	10	11	20	5	5
3	5	5	5	5	17	19	22	26	5	5
4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
7	5	5	5	5	5	5	22	27	5	5
8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

con los diferentes extractos fúngicos. Para cada extracto se emplearon dos concentraciones de 50 y 100 mg, respectivamente. Los extractos procedentes de cultivos fúngicos en medio Wickerham y en medio Patata Glucosada se ensayaron por separado. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y con sus blancos correspondientes.

Las placas se incubaron a la temperatura óptima para el crecimiento de cada bacteria y la lectura se realizó después de 24 h, midiendo el halo de inhibición producido.

Determinación de la actividad fungicida de los extractos fúngicos.

El método, similar al anterior, consiste en medir la inhibición del crecimiento fúngico. Los ensayos se realizaron con hongos testigo (*Botrytis cinerea* CECT 2100, *Curvularia trifolii* CECT 2863, *Aspergillus*

candidus CR 100, *Aspergillus versicolor* CECT 2890 y *Penicillium griseofulvum* MTAL 3.88) y el medio empleado fue el PDA. Los hongos ensayados se hicieron crecer en PDA durante 6 días a 25°C, y a partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones de esporas; inoculándose por vertido 5 ml de estas suspensiones en placas Petri con 20 ml de PDA. Solidificado el agar se colocaron en la superficie del mismo los discos, previamente impregnados con los extractos fúngicos. Para cada extracto se emplearon dos concentraciones de 50 y 100 mg, respectivamente. Los extractos procedentes de cultivos fúngicos en medio Wickerham y en medio Patata Glucosada se ensayaron por separado. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y con sus blancos correspondientes.

Las placas se incubaron a 28 °C y la lectura se realizó a los 5 días, midiendo el halo de inhibición producido.

Determinación de la actividad insecticida de los extractos fúngicos.

Los extractos fúngicos secos de redisolviéron en disolventes adecuados (ciclohexano, acetona o en mezcla de ambos, en las proporciones que precisara cada extracto) consiguiendo una concentración de 250 mg/ml. Se colocaron 130 ml de estas disoluciones en placas Petri y se redisolviéron con 2 ml del disolvente previamente empleado. Se dejó evaporar el disolvente en cada placa quedando un depósito residual de extracto de aproximadamente 500 mg/cm².

Seguidamente se colocaron en cada placa 15 ninfas de tercer estadio de *Oncopeltus fasciatus*, junto con pipas de girasol descascaradas y un tubo de agua tapado con algodón. Las placas se cerraron y se incubaron a 60-70 % de humedad relativa y 29 °C de temperatura y en fotoperiodo continuo. Los insectos se mantuvieron en esas condiciones 3 días, pasados los cuales se estudió la toxicidad del extracto contando los individuos que habían muerto y calculando el porcentaje de mortalidad. Paralelamente se hicieron blancos con placas que contenían sólo el disolvente empleado para ver la posible toxicidad del mismo.

Los supervivientes a los 3 días de contacto con el extracto en la placa se transfirieron a unos frascos sin tratar donde se estudió su evolución tras observar cuáles alcanzaban el estado adulto y los adultos precoces.

Toxicidad retardada.

A los 3 días de haber sido introducidos en los frascos sin tratar, se volvían a contar el número de individuos muertos. Este nuevo porcentaje de mortalidad nos indicaba la toxicidad tardía del extracto.

Resultados y discusión

Detección de la actividad antibiótica de las distintas cepas fúngicas aisladas (Test de Wickerham).

Se aislaron y ensayaron 66 cepas fúngicas para detectar su posible producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica. Entre las cepas aisladas se encontraron 23 de *Aspergillus*, 28 de *Penicillium*, 3 de *Fusarium* y 1 de *Alternaria*.

Tras los ensayos de antibiosis de estas cepas aisladas se detectaron 12 cepas de *Aspergillus* con actividad (el 57%), 22 de *Penicillium* (el 73%), y ninguna de los otros géneros.

En la Tabla 1 se resumen las cepas más activas encontradas. Fueron las denominadas A.02T, A.03T y A.22T del género *Aspergillus*. La P.09M, P.10M, P.22M, P.24M y P.28C del género *Penicillium*. De las cepas procedentes de la CECT, se seleccionaron *Penicillium expansum* CECT 2275 y CECT 2278. Las dos cepas de *P. expansum* ensayadas inhibieron por completo el crecimiento de la totalidad de las bacterias contra las que se probaron, lo que indica que producen metabolitos fuertemente activos. *P. expansum* CECT 2278 está reseñado en el catálogo de la Colección Española de Cultivos Tipo como productor de las micotoxinas patulina y citrinina. En cambio, la cepa CECT 2275 no aparece como productora de ningún tipo de micotoxina, de modo que los metabolitos causantes de la inhibición son, en principio, interesantes.

Los extractos fúngicos para determinar las actividades bactericidas, fungicidas e insecticidas se realizaron a partir de los aislamientos que, en conjunto, mayor actividad mostraron en el test de Wickerham. Fueron los denominados P.09M, P.10M, P.24M y P.26C. Cada uno de ellos se sembró en PDA y en Wickerham para, posteriormente, extraer sus caldos metabólicos y realizar los biosensayos. En la Tabla 2 se observa la relación de extractos obtenidos a partir de estos aislamientos.

Estudio de la actividad bactericida de los extractos fúngicos.

Los extractos fúngicos seleccionados se ensayaron frente a 5 bacterias: *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Como se observa, a concentraciones de 50 mg por disco no presentan actividad, pero a 100 mg por disco algunos de los extractos presentan actividades interesantes.

Estudio de la actividad fungicida de los extractos fúngicos.

Para estudiar la capacidad fungicida de los distintos extractos fúngicos se ensayaron éstos frente a diversos hongos, algunos de ellos productores de micotoxinas y otros importantes patógenos vegetales. Los hongos empleados fueron: *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus candidus*, *Penicillium griseofulvum*, *Curvularia trifolii* y *Botrytis cinerea*.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4. Se aprecia una considera-

TABLA 5

Actividad insecticida frente a *Oncopeltus fasciatus*. 15 ninfas de tercer estadio se pusieron en contacto con cada extracto a una concentración de 500 mg/cm². La cepa P.24M (extracto número 6) es la que mayor actividad ofreció como insecticida. Los extractos 1 y 2 han sido los que mayor toxicidad retardada presentaron, llegando el número 2 a acabar con la totalidad de individuos. Los insectos tratados con el extracto nº 1 resultaron, aparentemente, resistentes al mismo al finalizar el periodo de tratamiento. Sin embargo, tras permanecer 3 días en observación en frascos sin tratar, se vio que 9 de los 15 murieron. TD: toxicidad directa; TR: toxicidad retardada.

Nº de extracto	Nº inicial de individuos	Tercer día (TD)		Tercer día en frascos sin tratar (TR)	
		Nº de muertes	Mortalidad (%)	Nº de muertes	Mortalidad (%)
1	15	0	0	9	60
2	15	10	66,6	15	100
5	15	2	13,3	2	13,3
6	15	12	80	12	80
Blanco	15	0	0	0	0

ble actividad de los extractos 1, 2, 3 y 7 frente al hongo *Curvularia trifolii* a concentraciones de 100 mg por disco que sigue siendo importante a la de 50 mg/d para los extractos 3 y 7. Los extractos 1 y 2 han mostrado también actividad frente al hongo *Aspergillus versicolor*. Así como el extracto 3 que logró crear un halo de inhibición de 17 mm en el crecimiento del hongo *Aspergillus candidus* a una concentración de 50 mg/d.

Estudio de la actividad insecticida de los extractos fúngicos.

Cuatro de los extractos fúngicos, los nº 1, 2, 5 y 6, fueron probados frente al insecto *Oncopeltus fasciatus* a una concentración de 500 mg/cm². Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. Las mayores actividades se dieron en las cepas que fueron cultivadas sobre medio de Wickerham. La cepa P.24M (extracto número 6) es la que mayor actividad ofrece como insecticida. Los extractos 1 y 2 han sido los que mayor toxicidad retardada presentaron, llegando el número 2 a acabar con la totalidad de individuos. Los insectos tratados con el extracto nº 1 resultaron, aparentemente, resistentes al mismo al finalizar el periodo de tratamiento. Sin embargo, tras permanecer 3 días en observación en frascos sin tratar, se vio que 9 de los 15 murieron.

BIBLIOGRAFÍA

CANTIN, A., MOYA, P., MIRANDA, M.A., PRIMO, J. y PRIMO-YÚFERA, E. 1998. *Isolation of N-(2-methyl-3-oxodecanoyl)pyrrole and N-(2-methyl-3-oxodec-8-enoyl)pyrrole, two new natural products from Penicillium brevicompactum, and synthesis of analogues with insecticidal and fungicidal activity*. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 46 (11): 4748-4753.

CANTIN, A., MOYA, P., MIRANDA, M.A., PRIMO, J. y PRIMO-YÚFERA, E. 1999. *Insecticidal, anti-juvenile hormone, and fungicidal activities of organic extracts from different Penicillium species and their isolated active components*. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 47 (5): 2120-2124.

CROMBIE, L. 1999. *Natural product chemistry and its part in the defence against insects and fungi in agriculture*. Pesticide Science, 55(8): 761-774.

MARRONE, P.G. 1999. *Microbial pesticides and natural products as alternatives*. Outlook on Agriculture, 23(3): 149-154.

PRIMO YÚFERA, E. 1991. *Ecología química. Nuevos métodos en la lucha contra insectos*. Ediciones Mundi-Prensa/Banco de Crédito y Ahorro. Madrid. ISBN: 84-7114-341-0.

YAMAGUCHI, I. 1992. *Natural products as agrochemical and leads*. Extended Summary SCI Pesticide Group Symposium. Novel approaches in agrochemical research III. Pestic Sci. 35: 391-392.

Departamento de Biología Vegetal. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola de la Universidad Politécnica de Valencia.

Fe de errores.

En la página 134, en la leyenda de la tabla 3.

Donde dice: (50 y 100 mg)	debe decir: (50 y 100 µg)
Donde dice: la concentración de 50 mg	debe decir: la concentración de 50 µg
Donde dice: la concentración de 100 mg	debe decir: la concentración de 100 µg

En la página 134, en la leyenda de la tabla 4.

Donde dice: (50 y 100 mg)	debe decir: (50 y 100 µg)
Donde dice: a concentraciones de 100 mg	debe decir: a concentraciones de 100 µg
Donde dice: 50 mg/d	debe decir: 50 µg/d
Donde dice: a una concentración de 50 mg	debe decir: a una concentración de 50 µg

En la página 134, en el texto. Primera columna, línea 3.

Donde dice: 50 y 100 mg	debe decir: 50 y 100 µg
-------------------------	-------------------------

En la página 134, en el texto. Segunda columna, línea 14.

Donde dice: 50 y 100 mg	debe decir: 50 y 100 µg
-------------------------	-------------------------

En la página 134, en el texto. Tercera columna, línea 10.

Donde dice: 130 ml	debe decir: 130 µl
--------------------	--------------------

En la página 134, en el texto. Tercera columna, línea 15.

Donde dice: 500 mg/cm ²	debe decir: 500 µg/cm ²
------------------------------------	------------------------------------

En la página 135, en la leyenda de la tabla 5.

Donde dice: 500 mg/cm ²	debe decir: 500 µg/cm ²
------------------------------------	------------------------------------

En la página 135, en el texto. Primera columna, tercer párrafo, líneas 8 y 9.

Donde dice: 50 mg	debe decir: 50 µg
Donde dice: 100 mg	debe decir: 100 µg

En la página 135, en el texto. Segunda columna, primer párrafo, líneas 4 y 11.

Donde dice: 50 mg/d	debe decir: 50 µg/d
Donde dice: 50 mg/ml	debe decir: 50 µg/ml

En la página 135, en el texto. Segunda columna, segundo párrafo, línea 4.

Donde dice: 500 mg/cm ²	debe decir: 500 µg/cm ²
------------------------------------	------------------------------------