RESULTADOS

Determinación de los extractos con actividad antifúngica

Se analizaron 33 extractos de las plantas. Se consideró positivos a aquellos que mostraron halos sin crecimiento alrededor del pozo (Fig. 1), o falta de crecimiento sobre la superficie de los discos de papel (Fig. 2). Los resultados de los extractos probados en este trabajo se encuentran reunidos en las Tablas 1 y 2. De los extractos se seleccionaron solo a dos de ellos por su fuerte actividad inhibitoria sobre todas la cepas, estos fueron el extracto macerado de *Y. rigida* y el aceite de *L. tridentata*.

Tabla 1.- Actividad de los extractos de plantas sobre las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Planta / Extracción	*Aspergillus flavus*						*Aspergillus parasiticus*			
	1059		1273		1299		Su-1		148	
	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel
Y. carnerosana										
Macerado	0	- / 0*	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Bidestilación	12	+ / 0	8	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	15	- / 0
Cloroformo	0	+ / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Precipitado Clorofórmico	11	- / 0	13	- / 0	10	- / 0	13	- / 0	10	- / 0
Acido Clorhídrico	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	+ / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0
Y. filifera										
Macerado	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0
Bidestilación	8	+ / 0	8	+ / 0	9	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0
Precipitado Clorofórmico	0	- / 0	10	+ / 0	11	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Acido Clorhídrico	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0

*: +: no crecimiento en la superficie del disco; -: crecimiento en la superficie del disco; Número: halo de inhibición en mm

Tabla 2.- Continuación de los resultados de los extractos de las plantas probadas sobre las cinco cepas de *Aspergillus*.

Planta / Extracción	*Aspergillus flavus*						*Aspergillus parasiticus*			
	1059		1273		1299		Su-1		148	
	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel	Pozo	Papel
Y. rigida										
Macerado	28	+ / 15*	32	- / 12	35	- / 15	29	+ / 13	33	+ / 12
Bidestilación	0	+ / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Precipitado Clorofórmico	0	+/ 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Acido Clorhídrico	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	+ / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Y. stricta										
Macerado	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Bidestilación	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Precipitado Clorofórmico	11	+ / 0	12	+ / 0	12	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Acido Clorhídrico	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Y. thopsoniana										
Macerado	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	+ / 0
Bidestilación	0	- / 0	0	- / 0	11	+ / 0	11	+ / 0	12	+ / 0
Cloroformo	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Precipitado Clorofórmico	13	+ / 0	13	+ / 0	0	- / 0	11	+ / 0	0	- / 0
Acido Clorhídrico	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	+ / 0	0	- / 0
Hidróxido de Sodio	0	- / 0	0	- / 0	0	+ / 0	0	- / 0	0	- / 0
Larrea tridentata										
Aceite	36	+ / 20	39	+ / 18	41	+ / 19	35	+ / 15	38	+ / 15
Agua	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0
Agua:Glicerol	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0	0	- / 0

*: +: no crecimiento en la superficie del disco; -:crecimiento en la superficie del disco; Número: halo de inhibición en mm.

Fig. 1.- Halos de inhibición originados por el extracto en pozos.

Fig 2.- Halos de inhibición originados por el extracto en discos de papel.

Determinación de la CMI

A los extractos activos seleccionados anteriormente, se les determinó la CMI del crecimiento en medio sólido (Czapek con agar; Figs 3 y 4) y en medio líquido (Caldo Czapek; Figs 4 y 5).

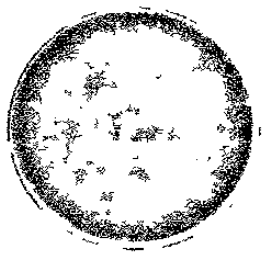


Fig 3.- CMI del crecimiento en medio Czapek con agar para *L. tridentata*

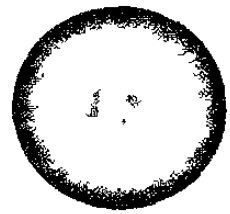


Fig 4.- CMI del crecimiento en medio Czapek con agar para *Y. rigida*

Fig 5.- CMI del crecimiento de *L. tridentata* medio Czapek.

Fig 6.- CMI del crecimiento en de *Y. rigida* en medio Czapek

El promedio de la CMI para todas las cepas de *Aspergillus* en el medio sólido para el extracto de *Larrea* fue de 32 mg/ml y de 32.6 mg/ml para el extracto de *Yucca*. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre de las CMIs de ambos extractos; además tampoco se encontraron diferencias significativas entre la inhibición en las cepas usadas (Tabla 3).

Aún así, se puede apreciar la cepa SRRC 1273 de *A. flavus*, presentó la CMI mas alta con ambos extractos y las CMIs mas bajas fueron presentadas por las cepas SRRC 148 y SRRC Su-1 de *A. parasiticus* para los extractos de *Larrea* y *Yucca* respectivamente.

Tabla 3.- CMI de los extractos con actividad antifúngica en medio Czapek con agar.

Cepas de *Aspergillus*	CMI del Extracto de *Larrea tridentata* (mg/ml)	CMI del Extracto de *Yucca rigida* (mg/ml)
A. flavus 1059	36 ± 1.2*	35 ± 1.5
A. flavus 1273	43 ± 1.0	35 ± 1.5
A. flavus 1299	29 ± 0.8	34 ± 0.7
A. parasiticus Su-1	27 ± 0.9	29 ± 1.0
A. parasiticus 148	25 ± 1.1	30 ± 1.0

*: Desviación Típica de la Media.

Por otro lado, en el medio líquido se encontró que el promedio de las CMI del extracto de *Larrea* era de 7.8 mg/ml y el de *Yucca* 28.6 mg/ml.

Como podemos apreciar en la tabla 4 para el extracto de *Larrea* la cepas con la CMI mas baja fueron la SRRC 1059 y la SRRC 1273 de *A. flavus*; además de la SRRC 148 de *A. parasiticus* en el extracto de *Yucca*.

La CMI mas alta encontrada fue en la cepa SRRC 1299 de *A. flavus* seguida de ambas cepas de *A. parasiticus* y posteriormente las cepas restantes de *A. flavus*.

Tabla 4.- CMI de los extractos con actividad antifúngica en Caldo Czapek.

Cepas de *Aspergillus*	CMI del Extracto de *Larrea tridentata* (mg/ml)	CMI del Extracto de *Yucca rigida* (mg/ml)
A. flavus 1059	8 ± 0.5*	31 ± 1.0
A. flavus 1273	8 ± 0.5	26 ± 1.0
A. flavus 1299	10 ± 1.1	26 ± 0.8
A. parasiticus Su-1	7 ± 1.2	30 ± 1.1
A parasiticus 148	6 ± 0.8	30 ± 1.2

*: Desviación Típica de la Media.

En este caso se encontró que no existen diferencias significativas (P= 0.05) en las CMIs entre las cepas probadas. Sin embargo se encontraron diferencias significativas (P= 0.05) entre ambos medios pero solo en el caso del extracto de gobernadora con una (P= 0.05).

Efecto de mezclas de los extractos

Se realizaron mezclas de los extractos crudos de ambas plantas, sin embargo, no se encontraron reducciones en las CMI al compararlas con los extractos por separado en el medio Czapek. De forma contraria, la mayoría de las mezclas mostraron CMI ligeramente mayores a las obtenidas anteriormente (Tabla 5). Aunque el análisis estadístico realizado no mostró diferencia significativa (P= 0.05) al compararse con las CMI obtenidas anteriormente por los extractos por separado.

Tabla 5.- CMI de las mezclas de los extractos probadas contra las diferentes cepas de *Aspergillus*.

Y. rigida / *L. tridentata*	*A. flavus* 1059	*A. flavus* 1273	*A. flavus* 1299	*A. parasiticus* Su-1	*A. parasiticus* 148
	mg/ml				
1:1	9 ± 0.5*	11 ± 0.4	11 ± 1.0	8 ± 1.1	7 ± 0.9
1:2	10 ± 1.0	14 ± 0.4	12 ± 1.1	7 ± 1.0	8 ± 0.4
1:3	12 ± 0.8	15 ± 1.0	14 ± 0.9	12 ± 0.8	9 ± 0.5
1:4	11 ± 0.7	12 ± 0.4	11 ± 0.5	10 ± 1.2	9 ± 0.7
1:5	9 ± 1.3	11 ± 0.7	13 ± 0.4	12 ± 1.4	8 ± 0.9
1:6	9 ± 1.1	10 ± 0.9	11 ± 0.6	9 ± 1.0	10 ± 1.0
1:7	10 ± 1.0	17 ± 1.1	10 ± 1.0	11 ± 0.9	11 ± 0.5
1:8	10 ± 0.7	11 ± 1.0	11 ± 1.1	10 ± 0.7	9 ± 0.7
1:9	13 ± 0.6	9 ± 0.7	14 ± 1.0	12 ± 1.0	8 ± 0.9
L. tridentata / *Y. rigida*					
1:1	14 ± 0.9	11 ± 0.6	10 ± 1.0	10 ± 1.2	7 ± 0.7
1:2	11 ± 0.5	10 ± 1.0	12 ± 0.8	10 ± 1.4	9 ± 0.9
1:3	9 ± 0.5	11 ± 1.1	11 ± 0.7	11 ± 1.0	10 ± 1.0
1:4	10 ± 1.0	14 ± 1.0	11 ± 0.6	11 ± 0.9	8 ± 1.1
1:5	12 ± 0.8	11 ± 0.4	10 ± 1.0	14 ± 0.4	7 ± 1.0
1:6	11 ± 0.7	14 ± 0.4	11 ± 1.1	9 ± 0.5	9 ± 0.8
1:7	9 ± 1.3	15 ± 1.0	14 ± 1.0	7 ± 0.7	9 ± 0.8
1:8	17 ± 1.1	12 ± 0.4	10 ± 0.7	13 ± 1.4	10 ± 1.2
1:9	11 ± 1.0	11 ± 0.7	12 ± 1.0	9 ± 1.0	8 ± 1.4

*: Desviación Típica de la Media.

Efecto en el crecimiento del hongo

En este caso se utilizaron el 25, 50 y 75% de la CMI del crecimiento en medio sólido, se midió el diámetro y se observó la morfología de colonia a nivel microscópico.

El extracto de *Larrea* afectó de forma apreciable el diámetro de colonia pero solo en las concentraciones del 50 y 75 % de la CMI. La concentración mas baja no mostró un efecto inhibitorio del crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6.- Efecto del extracto de *Larrea* sobre el diámetro de colonia de cepas de *Aspergillus*.

Extracto de *L. tridentata*	Diámetro de colonia (mm)				
	A. flavus 1059	*A. flavus* 1273	*A. flavus* 1299	*A. parasiticus* Su-1	*A. parasiticus* 148
Control	120 ± 8*	112 ± 10	115 ± 9	115 ± 5	115 ± 7
25 % de la CMI	114 ± 5	106 ± 9	110 ± 3	103 ± 9	111 ± 3
50 % de la CMI	99 ± 6	80 ± 3	87 ± 5	92 ± 7	88 ± 3
75 % de la CMI	30 ± 7	22 ± 8	27 ± 6	37 ± 5	34 ± 4

*: Desviación típica de la media

Este extracto, en las concentraciones de 50 y 75 % indujo un cambio en la morfología macroscópica colonial, ya que se perdía la forma característica de la colonia con el micelio de color blanquecino y sin la aparición de conidias (Figs 7, 8, 9 y 10).

Fig. 7 Control de crecimiento de *Aspergillus*.

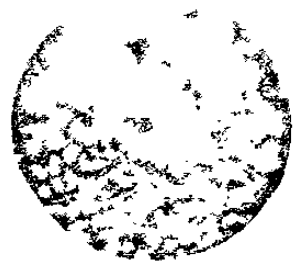


Fig. 8.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

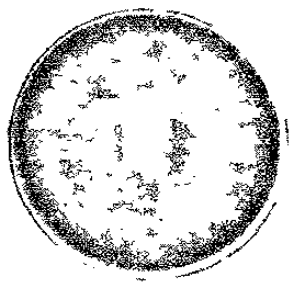


Fig. 9 Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus.*

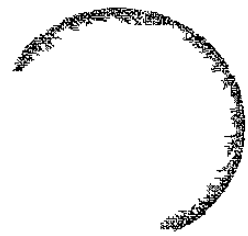


Fig. 10.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *Aspergillus.*

Las observaciones en microscopía de luz, el extracto de *Larrea* generó alteraciones en la estructura morfológica con malformaciones de las hifas, así como también reducción en el número de conidias, además de que las cabezas conidiales se observaron con un número menor de cadenas y esporas (Figs. 11, 12, 13 y 14). Estos efectos pudieron ser apreciados en menor o mayor grado en todas las cepas de *Aspergillus* probadas. Sin embargo, se observó que las cepas de *A. flavus* presentaron mayor proporción de estos defectos que las de *A. parasiticus.*

Fig. 11.- Crecimiento control de *A. flavus* a 40 X.

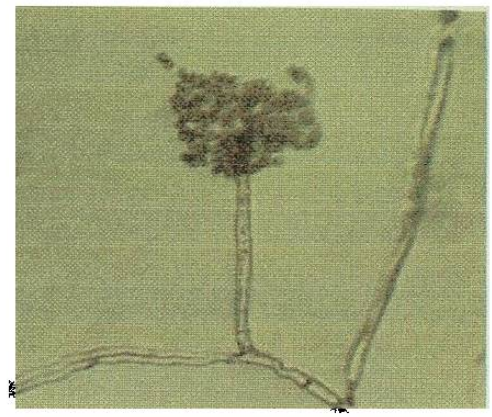


Fig. 12.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

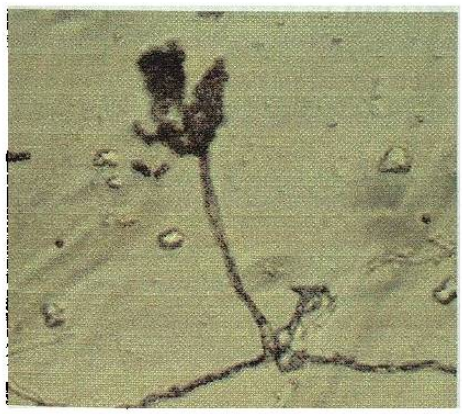


Fig. 13.- Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X

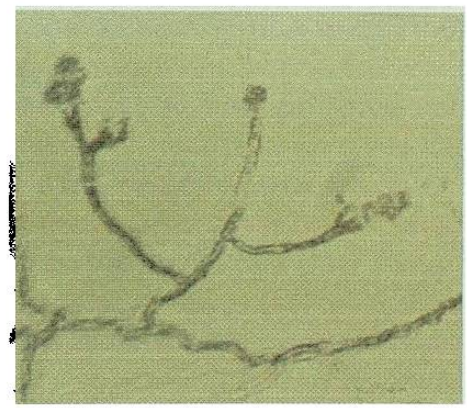


Fig. 14.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

En el microscopio electrónico se apreciaron las alteraciones morfológicas y efectos como reducción en el número y longitud de las cadenas en las cabezas aspergiláres (Figs. 15, 16, 17 y 18).

Fig. 15.- Fotografía al microscopio electrónico del crecimiento control de *A. flavus* a 4000 X.

Fig. 16.- Fotografía al microscopio electrónico del efecto del 25 % de la CMI sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

Fig. 17.- Fotografía al microscopio electrónico del efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

Fig. 18.- Fotografía al microscopio electrónico del efecto del 50 % de la CMI del extracto de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

De manera similar, el extracto de *Yucca* redujo el diámetro de la colonia en las concentraciones mas altas probadas (50 y 75 % de la CMI). Sin embargo, estos cambios no fueron tan notorios como los presentados con el extracto de *Larrea*. Los resultados completos de este experimento se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7.- Efecto del extracto de *Yucca* sobre el diámetro de colonia de cepas de *Aspergillus*.

	Diámetro de colonia (mm)				
Cepas Usadas	Control	25 % de la CMI	50 % de la CMI	75 % de la CMI	100 % de la CMI
A. flavus 1059	120 ± 8*	117 ± 3	110 ± 2	35 ± 5	0
A. flavus 1273	112 ± 10	106 ± 3	94 ± 6	33 ± 7	0
A. flavus 1299	115 ± 9	110 ± 3	89 ± 5	36 ± 3	0
A. parasiticus Su-1	115 ± 5	108 ± 2	95 ± 4	36 ± 5	0
A. parasiticus 148	115 ± 7	110 ± 3	90 ± 5	30 ± 3	0

*: Desviación típica de la media.

A simple vista, la morfología colonial de las cepas no fue afectada por ninguna de las concentraciones probadas de manera clara, como se observa en las figuras 19, 20, 21 y 22.

Fig. 19.- Control de crecimiento de *Aspergillus*.

Fig. 20.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *Aspergillus*.

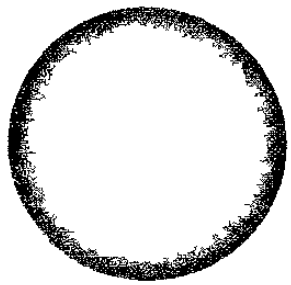


Fig. 21 Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *Aspergillus.*

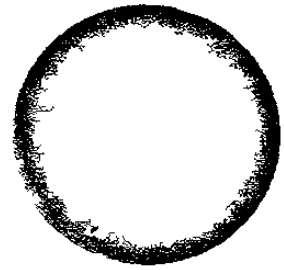


Fig. 22.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *Aspergillus.*

La observación en el microscopio de luz, mostró alteraciones en la estructura morfológica con malformaciones de las hifas, así como también reducción en el número de conidias, además de que las cabezas conidiales se observaron con un número menor de cadenas y esporas. Tal como se aprecia en las figuras 23, 24, 25 y 26.

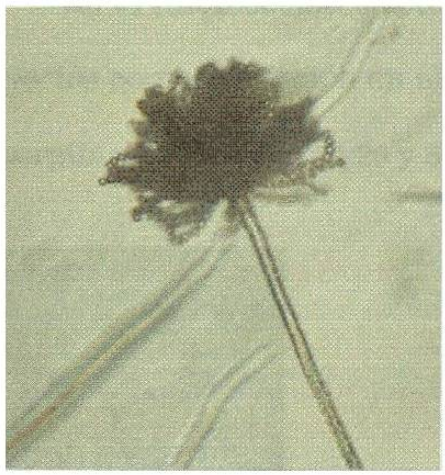


Fig. 23.- Crecimiento control de *A. flavus* a 40 X.

Fig. 24.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

Fig. 25.- Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

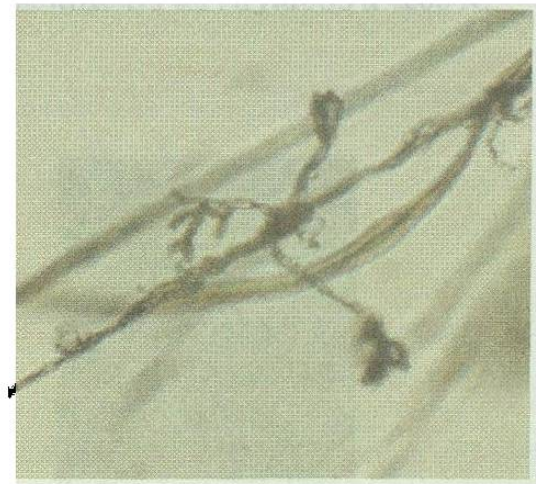


Fig. 26.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 40 X.

En el microscopio electrónico se apreciaron las alteraciones morfológicas y efectos como reducción en el número y longitud de las cadenas en las cabezas aspergiláres (Figs. 27, 28, 29 y 30).

Fig. 27.- Crecimiento control de *A. flavus* a 4000 X.

Fig. 28.- Efecto del 25 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

Fig. 29.- Efecto del 50 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

Fig. 30.- Efecto del 75 % de la CMI del extracto de *Y. rigida* sobre el crecimiento de *A. flavus* a 4000 X.

Efecto sobre la producción de toxinas

El crecimiento del hongo no fue afectado de manera significativa por el extracto de *L. tridentata* en medio líquido en las concentraciones del 25, 50 y 75 % de la CMI. Solo se observaron reducciones de un 25 - 35 % del crecimiento en las concentraciones mas altas probadas en todas las cepas (Tabla 8). El análisis de varianza mostró que era similar el efecto del extracto sobre las cepas probadas y entre las especies.

Tabla 8.- Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Larrea* sobre el crecimiento del hongo en caldo Czapek.

	Peso Seco del Hongo mg / 25 ml				
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059	349 ± 6*	293 ± 5	287 ± 6	261 ± 6	0
A. flavus 1273	299 ± 8	285 ± 7	275 ± 5	244 ± 5	0
A. flavus 1299	288 ± 3	279 ± 2	250 ± 3	233 ± 4	0
A. parasiticus Su-1	282 ± 8	273 ± 4	245 ± 4	230 ± 7	0
A. parasiticus 148	280 ± 2	272 ± 3	238 ± 6	222 ± 2	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Por otra parte, el crecimiento tampoco fue inhibido de forma importante por el extracto de *Y. rigida*, solo se observó una inhibición de un 25- 30 % en comparación con el control en las concentraciones de 50 y 75 % (Tabla 9). Igual al extracto de *L. tridentata*, no se observaron diferencias significativas (P=0.05) entre las reducciones de crecimiento en las cepas en las concentraciones usadas.

Tabla 9.- Efecto de concentraciones subletales del extracto de *Yucca rigida* sobre el crecimiento del hongo en caldo Czapek.

	Peso Seco del Hongo mg / 25 ml				
		Porcentaje de la CMI			
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059	349 ± 6*	290 ± 5	277 ± 6	258 ± 6	0
A. flavus 1273	299 ± 8	279 ± 7	266 ± 5	242 ± 5	0
A. flavus 1299	288 ± 3	282 ± 2	244 ± 3	230 ± 4	0
A. parasiticus Su-1	282 ± 8	270 ± 4	239 ± 4	220 ± 7	0
A. parasiticus 148	280 ± 2	268 ± 3	235 ± 6	218 ± 2	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El análisis estadístico de ambos extractos por grupos, no reveló diferencias de efectividad en los porcentajes de la CMI.

Producción de Aflatoxinas

En el caso del extracto de *L. tridentata* se observó una fuerte inhibición de la producción de aflatoxinas. Aún en la concentración mas baja (25% de la CMI) la inhibición fue de hasta un 79 % y en las concentraciones de 50 y 75 % de la CMI de hasta un 98% (Tabla 10).

Se observaron diferencias significativas entre la efectividad de las concentraciones usadas en especial entre el control y la concentración del 100 % de la CMI en todos los casos con una P = 0.05. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el efecto de las diferentes concentraciones y las diferentes especies.

Tabla 10.- Efecto del extracto de *L. tridentata* sobre la producción de aflatoxinas en caldo Czapek.

	Concentración de aflatoxina ng /ml				
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059					
Aflatoxina B_1	4.1 ± 0.3*	0.9 ± 0.08	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0
Aflatoxina B_2	2.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.1 ± 0.008	0
A. flavus 1273					
Aflatoxina B_1	3.9 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0
Aflatoxina B_2	2.5 ± 0.1	0.6 ± 0.04	0.2 ± 0.02	0.01 ± 0.008	0
A. flavus 1299					
Aflatoxina B_1	3.7 ± 0.2	1.5 ± 0.04	0.4 ± 0.08	0.3 ± 0.008	0
Aflatoxina B_2	2.5 ± 0.08	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.04	0
A. parasiticus Su-1					
Aflatoxina B_1	4.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	0.1 ± 0.08	0.4 ± 0.04	0
Aflatoxina B_2	2.8 ± 0.1	2.1 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0
Aflatoxina G_1	4.1 ± 0.2	2.7 ± 0.04	2.7 ± 0.2	0.5 ± 0.04	0
Aflatoxina G_2	2.91 ± 0.04	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0
A. parasiticus 148					
Aflatoxina B_1	4.9 ± 0.3	3.3 ± 0.2	0.9 ± 0.04	0.3 ± 0.004	0
Aflatoxina B_2	3.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0
Aflatoxina G_1	5.7 ± 0.04	1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.004	0.4 ± 0.1	0
Aflatoxina G_2	5.3 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.5 ± 0.08	0.3 ± 0.2	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El extracto de *Y. rigida* presentó un efecto inhibitorio mas fuerte que el de *L. tridentata*. En este caso, la concentración del 25 % de la CMI redujo la cantidad de aflatoxinas en un 90 %. De forma similar las demás concentraciones redujeron la producción de aflatoxinas hasta en un 98 % (Tabla 11). En este caso, no se observaron diferencias significativas entre las cepas con una P = 0.05, pero si en la efectividad entre las concentraciones usadas al ser comparadas con el control y la concentración del 100 % de la CMI.

Tabla 11.- Efecto del extracto de *Y. rigida* sobre la producción de aflatoxinas en caldo Czapek.

	Concentración de aflatoxina ng / 25 ml				
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059					
Aflatoxina B_1	4.1 ± 0.3*	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0
Aflatoxina B_2	2.3 ± 0.1	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.008	0
A. flavus 1273					
Aflatoxina B_1	3.9 ± 0.3	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0
Aflatoxina B_2	2.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.008	0.05 ± 0.02	0
A. flavus 1299					
Aflatoxina B_1	3.7 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.04	0
Aflatoxina B_2	2.5 ± 0.08	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.08 ± 0.004	0
A.parasiticus Su-1					
Aflatoxina B_1	4.0 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0
Aflatoxina B_2	2.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0
Aflatoxina G_1	4.1 ± 0.2	2.2 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0
Aflatoxina G_2	2.9 ± 0.04	1.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0
A.parasiticus 148					
Aflatoxina B_1	4.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0
Aflatoxina B_2	3.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.004	0
Aflatoxina G_1	4.5 ± 0.1	1.3 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.004	0
Aflatoxina G_2	5.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.06 ± 0.001	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El análisis estadístico de ambos extractos por grupos, no reveló ninguna diferencia entre ellos con la misma probabilidad anterior.

Producción de Acido Ciclopiazónico

Se realizaron ensayos preliminares para determinar cual de las cepas era capaz de producir esta toxina y se observó que solo la cepa de *A. flavus* SRRC 1299 producía esta toxina en cantidades detectables, como se observa en la tabla 12, donde ese comparan las cepas y la producción de sus toxinas.

Tabla 12.- Evaluación de la producción de ácido ciclopiazónico de cepas de *Aspergillus*.

Cepas Usadas	Producción de Acido Ciclopiazónico
A. flavus 1059	ND*
A. flavus 1273	ND
A. flavus 1299	+
A. parasiticus Su-1	ND
A. parasiticus 148	ND

*.- + Presencia de la toxina.
ND No Detectada.

Una vez determinado que la cepa SRRC 1299 de *A. flavus* era capaz de producir esta toxina se procedió a la determinación del efecto de los extractos en la producción de CPA.

Para el caso del extracto de *L. tridentata* se observaron reducciones significativas en la producción de esta micotoxina que van desde el 69 % en la concentración mas baja del extracto hasta el 92.8 % en la mas alta, de forma similar a lo que sucedió con las aflatoxinas, el crecimiento no se vio afectado de manera significativa. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas y el control.

El extracto de *Y. rigida* no fue tan potente como el de *L. tridentata* sin embargo también en este se encontraron reducciones significativas que van desde un 40 % hasta un 79 % dependiendo de la concentración de extracto analizada, cabe mencionar que el crecimiento no fue afectado por el extracto. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas con el control.

De igual manera al anterior el análisis estadístico no reveló diferencias significativas (P=0.05) entre los extractos probados.

Producción de Acido Kójico

Se realizaron pruebas preliminares para determinar cual de las cepas era capaz de producir el ácido kójico. Estas pruebas dieron como resultado que la única cepa capaz de producir cantidades detectables de AK era la SRRC 1299 de *A. flavus* (Tabla 13).

Tabla 13.- Evaluación de la producción de AK de cepas de *Aspergillus*.

Cepas Usadas	Producción de Acido Kójico
A. flavus 1059	ND*
A. flavus 1273	ND
A. flavus 1299	+
A. parasiticus Su-1	ND
A. parasiticus 148	ND

*.- + Presencia de la toxina.
ND No detectada.

Después se procedió a realizar los experimentos para determinar el efecto de los extractos en la producción de AK. El extracto de *L. tridentata*, inhibió fuertemente la producción de esta toxina. Se observó que el 25 % de la CMI inhibía en un 35 % la producción de AK y que las concentraciones superiores lo hacían hasta en un 91 %, en comparación con el control. El análisis estadístico mostró claras diferencias (P=0.05) entre la efectividad de las concentraciones de extracto usadas.

Por otro lado el extracto de *Y. rigida* presentó una inhibición mas fuerte en la producción de esta toxina que el extracto de *L. tridentata* siendo de 56 % en la concentración mas baja y de hasta 95 % en la mas alta. El análisis estadístico reveló que existían diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas y el control; mientras que no había diferencias entre los extractos probados (P=0.05).

Determinación de la Concentración Mínima Esporicida (CME)

De los muestreos realizados se observó que en el extracto de gobernadora presentaba una actividad esporicida que aumentaba a razón de tiempo, es decir entre mas tiempo se dejaba en contacto la solución de conidias con este extracto se veía un aumento en la actividad inhibitoria; este se refleja en la tabla 14.

El estudio estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre las cepas probadas de una u otra especie.

Tabla 14.- Concentración del extracto de *L. tridentata* que inactiva conidias de *Aspergillus* a diferentes tiempos.

	Días						
Cepas Usadas	1	2	3	4	5	6	7
Aspergillus flavus 1059	45 ± 4*	39 ± 5	33 ± 4	25 ± 2	22 ± 1	20 ± 4	20 ± 3
Aspergillus flavus 1273	48 ± 3	38 ± 5	26 ± 2	20 ± 5	18 ± 4	15 ± 3	15 ± 4
Aspergillus flavus 1299	44 ± 5	34 ± 1	25 ± 5	21 ± 4	16 ± 3	16 ± 5	16 ± 2
Aspergillus parasiticus Su-1	45 ± 2	36 ± 4	24 ± 4	19 ± 3	19 ± 5	19 ± 4	19 ± 4
Aspergillus parasiticus 148	43 ± 5	30 ± 2	26 ± 3	20 ± 1	20 ± 2	20 ± 1	20 ± 5

*: mg/ml. Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El extracto de *Y. rigida*, por su parte, mostró mas estabilidad en la CME, es decir, se observó que la CME inicial fue muy similar a la CME al final del experimento (Tabla 15); además, también se observó que inactivó las esporas en menos tiempo que el extracto *L. tridentata*. Se observó que las esporas de las cepas de *A. flavus* fueron mas susceptibles al extracto que las de *A. parasiticus*.

Las pruebas estadísticas mostraron diferencias significativas (P=0.05) entre las CMEs de los microorganismos probados. En cuanto a los extractos no se observaron diferencias significativas entre ellos bajo las condiciones probadas con una P=0.05.

Tabla 15.- Concentración del extracto de *Y. rigida* que inactiva conidias de *Aspergillus* a diferentes tiempos.

	Días						
Cepas Usadas	1	2	3	4	5	6	7
Aspergillus flavus 1059	42 ± 4*	40 ± 5	35 ± 4	35 ± 3	35 ± 1	35 ± 2	35 ± 4
Aspergillus flavus 1273	36 ± 3	34 ± 5	30 ± 3	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 5	30 ± 2
Aspergillus flavus 1299	35 ± 5	32 ± 1	28 ± 5	28 ± 2	28 ± 3	28 ± 4	28 ± 5
Aspergillus parasiticus Su-1	30 ± 2	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 5	30 ± 3	30 ± 4
Aspergillus parasiticus 148	35 ± 5	35 ± 2	35 ± 1	35 ± 5	35 ± 2	35 ± 1	35 ± 3

*: mg/ml. Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Actividad sobre la germinación de las esporas

Se determinó que los extractos de ambas plantas presentaban inhibición de la germinación de esporas de *Aspergillus*.

Para algunas concentraciones de los extractos de *L. tridentata* se observó que se requerían hasta 48 h para observar una disminución significativa. A las 24 h se observó que los porcentajes de germinación eran mas altos que los del control en las concentraciones mas bajas (25% de la CME). Sin embargo, a las 48 h estos valores se reducían en comparación con el control. Podemos apreciar que las concentraciones de 50 y 75 % de la CME inhibían la germinación al compararlas con el control, tal como se aprecia claramente en la tabla 16.

Estadísticamente existieron diferencias significativas (P=0.05) entre la efectividad de las concentraciones probadas. De forma similar se han encontrado diferencias significativas (P=0.05) entre los días de muestreo en cada cepa estudiada.

Tabla 16.- Porcentaje de germinación de cepas de *Aspergillus* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *L. tridentata*.

	24 h de Incubación				48 h de Incubación			
	Porcentaje de la CME				Porcentaje de la CME			
Cepas Usadas	0 %	25 %	50 %	75 %	0 %	25 %	50 %	75 %
A. flavus 1059	81 ± 1*	92 ± 2	81 ± 3	22 ± 1	100	100	80 ± 1	33 ± 3
A. flavus 1273	86 ± 3	90 ± 2	80 ± 1	14 ± 2	100	94 ± 2	77 ± 3	20 ± 2
A. flavus 1299	74 ± 4	87 ± 1	74 ± 2	18 ± 3	100	87 ± 3	76 ± 2	17 ± 2
A. parasiticus Su-1	65 ± 2	91 ± 2	61 ± 2	26 ± 1	100	94 ± 2	64 ± 3	31 ± 3
A. parasiticus 148	90 ± 1	94 ± 3	81 ± 1	17 ± 2	100	97 ± 2	80 ± 2	19 ± 1

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Por su parte los extractos de *Y. rigida* presentaron una inhibición importante de la germinación desde un principio y la mantuvieron durante las 48 h del experimento. En las concentraciones mayores este extracto logró reducir casi totalmente la aparición de tubos germinativos de las esporas durante el período de análisis (Tabla 17).

El análisis estadístico realizado mostró que existían diferencias significativas (P=0.05) entre la efectividad de las concentraciones probadas con respecto a el control, pero no entre los días de prueba.

Tabla 17.- Porcentaje de germinación de cepas de *Aspergillus* tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *Y. rigida*.

	24 h de Incubación				48 h de Incubación			
	Porcentaje de la CME				Porcentaje de la CME			
Cepas Usadas	0 %	25 %	50 %	75 %	0 %	25 %	50 %	75 %
A. flavus 1059	97 ± 2*	25 ± 4	16 ± 4	12 ± 1	100	51 ± 1	15 ± 1	15 ± 3
A. flavus 1273	95 ± 1	50 ± 2	14 ± 1	1 ± 0.2	100	51 ± 4	14 ± 4	3 ± 1
A. flavus 1299	95 ± 3	50 ± 1	15 ± 2	1 ± 0.3	100	56 ± 2	15 ± 1	2 ± 1
A. parasiticus Su-1	93 ± 1	54 ± 4	51 ± 4	23 ± 1	100	68 ± 2	51 ± 3	27 ± 4
A. parasiticus 148	92 ± 2	60 ± 2	62 ± 1	37 ± 4	100	61 ± 4	62 ± 2	36 ± 2

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

En forma general, el análisis estadístico realizado mostró que existían diferencias significativas (P=0.05) entre los dos extractos en cualquiera de los días de prueba del experimento con una probabilidad de 0.05%

Efecto sobre tubo germinativo:

El extracto de gobernadora presentó una inhibición del crecimiento del tubo germinativo que era fácilmente observada, esta se presentaba desde el 25 % de la CMI con reducciones de hasta un 25 % en el crecimiento en comparación con el control, además, la concentración del 75 % mostró una reducción de hasta 75 % del crecimiento de este proceso; el 100 % de la CMI no permitió el crecimiento del tubo germinativo al estar en contacto con las cepas probadas; estos resultados se muestran en la tabla 18.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones de extracto al ser comparados con el control, sin embargo este análisis no reveló ninguna diferencia (P=0.05) entre las cepas, ni las especies del hongo probadas.

Tabla 18.- Porcentaje de reducción del crecimiento de tubo germinativo de *Aspergillus* por extractos de *L. tridentata*.

	Porcentaje de Reducción del Crecimiento del Tubo Germinativo				
		Porciento de la CMI			
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059	0	12 ± 2*	36 ± 1	72 ± 1	100
A. flavus 1273	0	12 ± 1	60 ± 2	65 ± 1	100
A. flavus 1299	0	25 ± 2	42 ± 1	67 ± 2	100
A. parasiticus Su-1	0	13 ± 1	56 ± 1	75 ± 1	100
A. parasiticus 148	0	17 ± 1	50 ± 2	65 ± 1	100

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

De forma similar el extracto de *Y. rigida* presentó una inhibición sobre este proceso. Esta inhibición fue desde un 37 % en la concentración del 25% de la CMI hasta un 77 % en la concentración de 75 % de la CMI (Tabla 19).

Los resultados demostraron diferencias significativas (P>0.05 %) entre las concentraciones probadas del extracto y el control , sin embargo, no se encontraron diferencias (P=0.05) entre las cepas de *Aspergillus* en ninguna de las concentraciones de extracto.

Tabla 19.- Porcentaje de reducción del crecimiento de tubo germinativo de *Aspergillus* por extractos de *Y. rigida.*

	Porcentaje de Reducción del Crecimiento del Tubo Germinativo				
		Porciento de la CMI			
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059	0	18 ± 1*	36 ± 2	73 ± 1	100
A. flavus 1273	0	18 ± 1	41 ± 2	47 ± 2	100
A. flavus 1299	0	17 ± 2	25 ± 2	75 ± 2	100
A. parasiticus Su-1	0	38 ± 2	50 ± 1	81 ± 1	100
A. parasiticus 148	0	34 ± 1	44 ± 2	78 ± 1	100

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

El análisis estadístico final entre los dos extractos no mostró diferencias significativas (P=0.05) entre ellos bajo las condiciones usadas para este experimento.

CMI de los extractos activos contra *Aspergillus* cultivado en maíz en condiciones de almacén

Se tomaron como base las CMIs encontradas para medio sólido, se observó que la CMI para maíz era similar a la encontrada en medio sólido. Cabe mencionar que las cepas de *A. flavus* presentaron una CMI mayor que las cepas de *A. parasiticus*, como ya se había visto en el medio Czapek sólido (Tabla 24). De forma similar a la CMI en medio sólido, no se encontraron diferencias significativas (P=0.05) entre los extractos, ni tampoco, entre las cepas estudiadas, aun cuando estas fueron agrupadas por especies.

Tabla 20.- CMI de los extractos de *L. tridentata* y *Y. rigida* sobre *Aspergillus* cultivado en maíz.

Cepas Usadas	*L. tridentata* (mg/ml)	*Y. rigida* (mg/ml)
Aspergillus flavus 1059	36 ± 1.1*	35 ± 1.3
Aspergillus flavus 1273	43 ± 0.9	35 ± 1.3
Aspergillus flavus 1299	29 ± 1.0	34 ± 1.0
Aspergillus parasiticus Su-1	27 ± 1.2	29 ± 0.9
Aspergillus parasiticus 148	25 ± 1.1	30 ± 1.0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.

Efectos de extractos de plantas en el crecimiento del hongo en maíz en condiciones de almacén

En este caso se observó que los extractos de ambas plantas no presentaron una reducción significativa (P=0.05) del crecimiento en las cepas probadas en las condiciones antes mencionadas (Figs 31 - 35).

Se observó que la cepa mas resistente a ambos extractos fue la SRRC Su-1 de *A. parasiticus* mientras que la mas sensible fue la SRRC 1059 de *A. flavus*. Sin embargo, el análisis estadístico de todas las cepas no mostró ninguna diferencia significativa de crecimiento al agruparlas por especies, además tampoco se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones subinhibitorias de cada extracto usado.

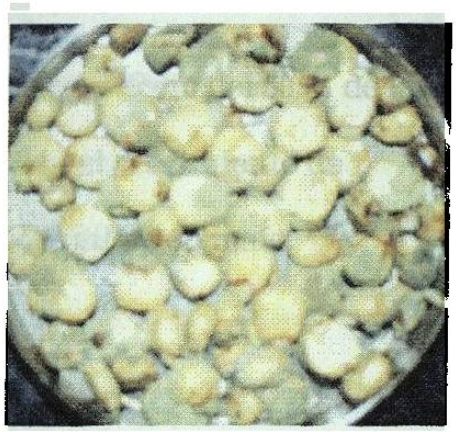


Fig 31.- Cultivo control de maíz contaminado con *Aspergillus*

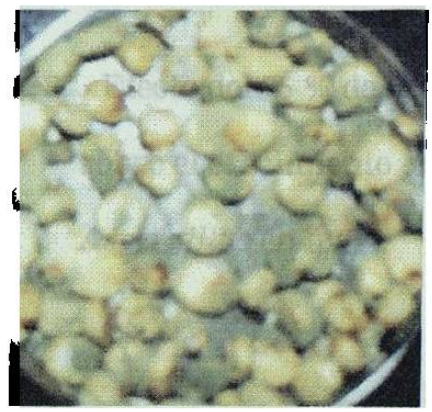


Fig 32.- Efecto del 25 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz.

Fig 33.- Efecto del 50 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz

Fig 34.- Efecto del 75 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz.

Fig 35.- Efecto del 100 % de la CMI sobre el crecimiento de *Aspergillus* en maíz

Efecto de dosis subinhibitorias del crecimiento en la producción de toxinas en maíz en condiciones de almacén

Efecto sobre la producción Aflatoxinas

En el caso del extracto de *L. tridentata* se observó una fuerte inhibición de la producción de aflatoxinas, aun en la concentración mas baja (25% de la CMI). La inhibición fue de hasta un 84 %. En las concentraciones de 75 % la disminución fue de hasta un 97% (Tabla 21). No se observaron diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones en cuanto a la producción de aflatoxinas pero si con el control y el 100 % de la CMI. Este comportamiento fue similar para todas las cepas. Aunque, las cepas de *A. parasiticus* presentaron niveles mas bajos de la producción de aflatoxinas en los tratamientos.

La producción de aflatoxinas B fue mas fuertemente inhibida al compararla con las aflatoxinas G.

Tabla 21.- Efecto del extracto de *L. tridentata* sobre la producción de aflatoxinas en maíz bajo condiciones de almacén.

		Porcentaje de la CMI			
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059					
Aflatoxina B_1	20.2 ± 0.08*[1]	6.6 ± 0.06	5.9 ± 0.1	3.9 ± 0.08	0
Aflatoxina B_2	11.4 ± 0.06	2.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0
A. flavus 1273					
Aflatoxina B_1	27.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.0 ± 0.08	1.1 ± 0.08	0
Aflatoxina B_2	15.0 ± 0.06	4.5 ± 0.02	3.2 ± 0.1	1.1 ± 0.01	0
A. flavus 1299					
Aflatoxina B_1	35.6 ± 0.1	7.7 ± 0.02	4.4 ± 0.04	1.9 ± 0.04	0
Aflatoxina B_2	13.4 ± 0.04	5.1 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.0 ± 0.02	0
A. parasiticus Su-1					
Aflatoxina B_1	32.3 ± 0.1	7.4 ± 0.08	1.8 ± 0.04	1.0 ± 0.08	0
Aflatoxina B_2	5.7 ± 0.06	3.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0
Aflatoxina G_1	28.6 ± 0.01	4.0 ± 0.02	1.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0
Aflatoxina G_2	3.4 ± 0.02	2.1 ± 0.06	1.4 ± 0.08	0.4 ± 0.1	0
A. parasiticus 148					
Aflatoxina B_1	31.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	3.5 ± 0.02	1.0 ± 0.02	0
Aflatoxina B_2	4.8 ± 0.06	2.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.6 ± 0.06	0
Aflatoxina G_1	27.3 ± 0.02	3.5 ± 0.1	1.8 ± 0.02	0.3 ± 0.08	0
Aflatoxina G_2	2.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0.1	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.
1: ng/g maíz

El extracto de *Y. rigida* presentó un efecto ligeramente mas fuerte que el de *L. tridentata*. En este caso, la concentración del 25 % de la CMI redujo la concentración de las aflatoxinas hasta en 85 %. De forma similar las demás concentraciones redujeron la producción de aflatoxinas hasta en un 96 % (Tabla 22).

En este caso, no se observaron diferencias significativas (P=0.05) entre las cepas. De forma similar al anterior, la producción de aflatoxinas B fue mas inhibida que las aflatoxinas G (Tabla 22).

Tabla 22.- Efecto del extracto de *Y. rigida* sobre la producción de aflatoxinas en maíz bajo condiciones de almacén.

		Porcentaje de la CMI			
Cepas Usadas	Control	25 %	50 %	75 %	100 %
A. flavus 1059					
Aflatoxina B_1	26.6 ± 0.1*[1]	8.6 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0
Aflatoxina B_2	7.1 ± 0.08	6.8 ± 0.02	3.9 ± 0.001	1.3 ± 0.004	0
A. flavus 1273					
Aflatoxina B_1	31.9 ± 0.1	8.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1	1.3 ± 0.08	0
Aflatoxina B_2	9.2 ± 0.06	6.2 ± 0.08	2.8 ± 0.04	1.3 ± 0.001	0
A. flavus 1299					
Aflatoxina B_1	37.8 ± 0.1	6.5 ± 0.1	2.4 ± 0.08	1.0 ± 0.02	0
Aflatoxina B_2	9.2 ± 0.02	4.4 ± 0.1	2.2 ± 0.06	1.5 ± 0.02	0
A. parasiticus Su-1					
Aflatoxina B_1	24.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0
Aflatoxina B_2	7.4 ± 0.08	4.6 ± 0.02	2.7 ± 0.1	1.3 ± 0.06	0
Aflatoxina G_1	22.0 ± 0.06	9.2 ± 0.04	4.6 ± 0.1	1.9 ± 0.08	0
Aflatoxina G_2	4.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0
A. parasiticus 148					
Aflatoxina B_1	44.2 ± 0.1	6.5 ± 0.08	4.2 ± 0.06	1.8 ± 0.1	0
Aflatoxina B_2	6.5 ± 0.06	2.5 ± 0.08	2.2 ± 0.08	1.2 ± 0.04	0
Aflatoxina G_1	33.7 ± 0.02	6.7 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.2 ± 0.02	0
Aflatoxina G_2	2.4 ± 0.1	0.6 ± 0.008	0.2 ± 0.004	0.03 ± 0.001	0

*: Esta es la media de tres experimentos realizados por duplicado con su desviación típica.
1: ng/g de maíz

Al comparar la efectividad de ambos extractos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con una probabilidad de 0.05.

Efecto sobre la producción de CPA

Para el caso del extracto de *L. tridentata* se observaron reducciones significativas en la producción de esta micotoxina que van desde el 53 % en la concentración de 25 % de la CMI, hasta el 88 % en la concentración del 75 %. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas.

El extracto de *Y. rigida* fue mas activo que el de *Larrea*; el análisis mostró reducciones significativas que van desde un 58 % hasta un 99 % dependiendo de la concentración de extracto usada; se demostraron diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones subinhibitorias.

Efecto sobre la producción de Acido Kójico

El extracto de *L. tridentata*, inhibió la producción de esta toxina observándose que el 25 % de la CMI inhibía un 58 % la producción de AK y que las concentraciones superiores lo hacían hasta en un 91 %, en comparación con el control; se demostraron claras diferencias entre las concentraciones de extracto usadas y el control .

Por otro lado el extracto de *Y. rigida* inhibió mas fuertemente la producción de esta toxina siendo de 68 % en la concentración mas baja y de hasta 99 % en la de 75 % de la CMI, en comparación con los controles que no contenían extracto; se demostró que existen diferencias significativas (P=0.05) entre las concentraciones usadas, el control y el 100 de la CMI.

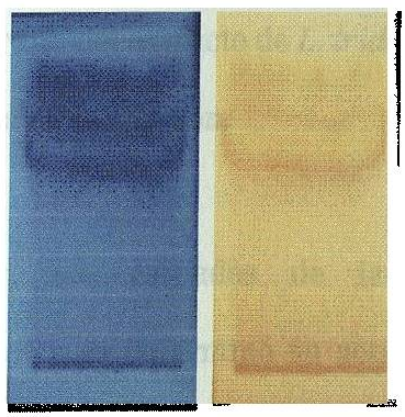
Purificación del compuesto activo de *L. tridentata*

Se probaron 6 fases móviles diferentes, para ver cual de ellas producía una mejor resolución en la separación, de estas la fase móvil de Benceno:Acetona:Metanol fue la que produjo una mejor separación de las bandas (Tabla 23 y Fig 36).

Tabla 23.- Separación del compuesto activo de *L. tridentata* por diferentes fases móviles.

Fase móvil	Número de Bandas Visibles en luz U.V.
Cloroformo	6
Cloroformo:Metanol (1:1)	2
Cloroformo:Acetona:Metanol (3:1:1)	2
Benceno	6
Benceno:Metanol (1:1)	2
Benceno:Acetona:Metanol (3:1:1)	9

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces



A B

Fig 36.- Cromatografía en capa fina del extracto de *L. tridentata* en luz ultravioleta (a) y luz visible (b).

Posteriormente, se procedió a determinar la banda con actividad antifúngica. La técnica de la autobiografía nos mostró que la banda activa presentaba un Rf de 0.88 (Fig. 37); esta banda fue seleccionada y raspada de la placa.

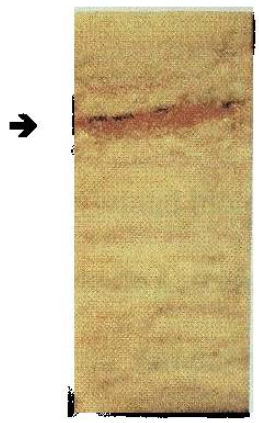


Fig. 37 Autobiografía del extracto de *L. tridentata* contra *Aspergillus*. La flecha indica la zona de inhibición.

Para confirmar, los raspados de las bandas separadas fueron resuspendidos en etanol y se determinó su actividad antifúngica mediante la técnica de difusión; el resultado fue que solo la banda con un Rf de 0.88 presentaba inhibición del crecimiento fúngico (Fig. 38).

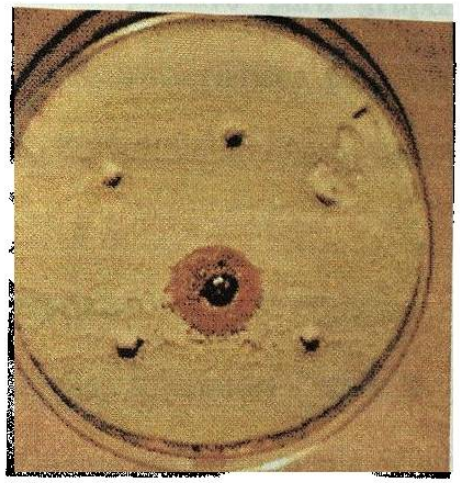


Fig 38.- Comprobación de la actividad biológica de las bandas aisladas del extracto de *L. tridentata.*

Bajo la luz ultravioleta, esta banda mostró un color cafe-morado. El compuesto activo, presentaba una forma de granos irregulares, un color cafe-verde y era soluble en etanol, metanol y cloroformo.

Finalmente, se le realizaron diversas pruebas químicas para determinar la naturaleza del compuesto activo (Tabla 24).

Tabla 24.- Pruebas químicas realizadas para determinar la naturaleza del compuesto activo.

Pruebas Realizadas*	Resultado
Cloruro férrico + Acido Sulfúrico	+++
Formol + Acido Sulfúrico	+++
Pentacloruro de antimonio	+++

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces.

Estas pruebas dieron positivo para grupos metilendioxi y anillos aromáticos, los cuales son característicos para los lignanos. Además de la pruebas con pentacloruro de antimonio que es usado para la identificación de este tipo de compuestos.

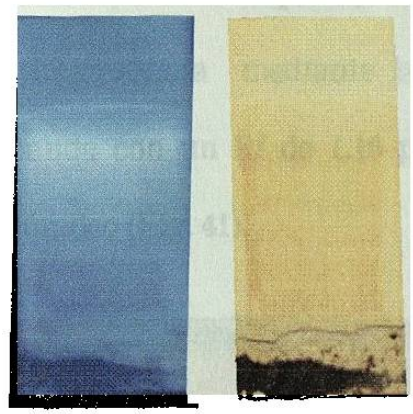
Purificación del compuesto activo de *Y. rigida*

De las 7 fases móviles diferentes (Tabla 25 y Fig. 39) , usadas la de Butanol:Etanol:Agua fue la que nos produjo una mejor resolución.

Tabla 25.- Determinación de la fase móvil mas adecuada para la separación del compuesto activo de *Y. rigida*.

Fase móvil	Número de Bandas Visibles en luz U.V.
Butanol saturado en agua	3
Butanol:Acido Acético: Agua (4:1:15)	5
Butanol:Etanol:Agua (1:1:1)	7
Butanol:Acetato de Etilo: Agua (4:1:5)	4
Cloroformo:Acetona (9:1)	2
Benceno:Acetona (9:1)	4
Benceno:Metanol (9:1)	5

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces



A B

Fig 39.- Cromatografía en capa fina del extracto de *Y. rigida* en luz ultravioleta (a) y luz visible (b).

Una vez realizado esto, se procedió a determinar la banda con actividad antifúngica. La técnica de la autobiografía fue la primera en usarse, observamos que la banda activa presentaba un Rf de 1.16 (Fig. 40).

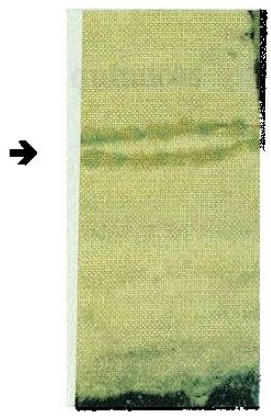


Fig. 40 Autobiografía del extracto de *Y. rigida* contra *Aspergillus*.

La flecha indica la zona de inhibición

Todas las bandas fueron raspadas de la placa, resuspendidas en etanol y se determinó su actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión. El resultado fue que solo la banda con un Rf de 1.16 presentaba una actividad inhibitoria del crecimiento fúngico (Fig. 41).

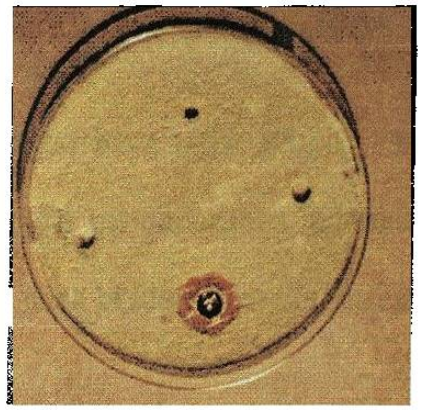


Fig 41.- Comprobación de la actividad biológica de las bandas aisladas del extracto de *Y. rigida.*

Esta banda mostró un color blanquecino bajo la luz ultravioleta y fue purificada en dos ocasiones. Se observó que presentaba un color blanquecino, en forma de polvo, soluble en agua, etanol e isopropanol. Posteriormente, se le realizaron diversas pruebas químicas para determinar la naturaleza del compuesto activo (Tabla 26).

Tabla 26.- Pruebas químicas realizadas para determinar la naturaleza del compuesto activo.

Pruebas Realizadas*	Resultado
Lieberman-Buchard	+++
Salkowski	+++
Molish	+++
Tricloruro de Antimonio	+++
Acido Tricloroacético	+++

*: Estas pruebas fueron realizadas al menos tres veces

Estas pruebas dieron positivo para grupos esteroideos y azucares, los cuales son característicos para las saponinas, además de la prueba con ácido tricloroacetico que es usada para la identificación de este tipo de compuestos.