

INTRODUCCION

Los cereales constituyen una parte importante de la dieta del mexicano. Dadas las condiciones de precosecha, cosecha, almacenamiento, manejo y distribución, los cereales llegan a contaminarse con hongos filamentosos que generan toxinas. Entre estos últimos se encuentran los del género *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, que produce sustancias conocidas como aflatoxinas, algunas de las cuales se les ha clasificado como agentes cancerígenos. La presencia de toxinas producidas por hongos filamentosos es uno de los más serios problemas de calidad en productores y manufactureros de alimento, granos y cereales. Se han realizado numerosas investigaciones sobre métodos físicos, químicos y biológicos para degradar o eliminar a las aflatoxinas, sin embargo se ha comprobado que son compuestos químicos relativamente estables. Es por ello que deseamos estudiar una vía alternativa para controlar este problema de contaminación, en este caso utilizando extractos de plantas como inhibidores tanto del crecimiento de hongos como de la producción de aflatoxinas.

Uno de los controles que ha adquirido más importancia en los últimos años, es aquel que basa su acción en el uso de sustancias de origen natural, esto es, extractos obtenidos de plantas con actividad como fungicidas, herbicidas, bactericidas, etc.

Los extractos o preparaciones de *Yucca schidigera* se utilizan en la industria refresquera como agentes saborizantes y espumantes; en la industria de cosméticos, por sus propiedades tensoactivas, y en la industria de la alimentación animal, por las mejoras en la productividad de los animales, debido a una mejora en la calidad de la

atmósfera en los edificios donde se encuentran confinados, al disminuir las concentraciones de amoníaco y ácido sulfhídrico.

De las muchas plantas de las zonas áridas, las especies de gobernadora son las más químicamente diversas. Este género produce ceras complejas, cientos de compuestos volátiles, saponinas y otros triterpenos, una gran cantidad de fenoles incluyendo muchas agliconas y glicósidos flavonoides y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA)

En base a las investigaciones que se han realizado y a las ventajas que presenta la utilización de compuestos de origen natural para combatir hongos contaminantes productores de toxinas, en nuestro trabajo analizamos extractos de diversas plantas como antifúngicos, determinando su efecto en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, contaminantes frecuentes de granos y cereales en nuestro país.

ANTECEDENTES

LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS

Durante los últimos 20 años se han realizado estudios sistemáticos de hongos y como resultado se han descubierto nuevas variedades y especies. El comité de expertos de la OMS sobre diferentes Aspectos Microbiológicos de la Higiene de los Alimentos reconoció una lista de 150 tipos diferentes de hongos productores de micotoxinas tóxicas para el hombre y los animales. Según varios reportes, el género llamado *Aspergillus* consiste de 18 variedades y 132 especies. *A. flavus* es un grupo de hongos filamentosos constituyentes de la microflora en aire y suelo y es encontrado en plantas y animales vivos o muertos (FAO, 1990). Debido a esto, con frecuencia se le encuentra en el proceso de almacenamiento de diversos productos, alimentos y cereales contribuyendo a su deterioro (Goldblatt, L. A., 1965). Las micotoxicosis son producidas por sustancias generadas por los hongos como producto de su metabolismo, como las aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* (FAO, 1990).

Las aflatoxinas son metabolitos producidos por hongos que pueden estar presentes en una amplia variedad de sustratos incluyendo los alimentos. La contaminación de estos últimos y de piensos por el hongo puede suceder durante las etapas de producción, procesamiento, transporte o almacenamiento. No obstante, la presencia del hongo no significa que automáticamente la toxina esté presente (Goldblatt, L. A., 1969).

Entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termorresistencia, ya que el punto de ebullición está por arriba de los 200 °C. Todas las aflatoxinas exhiben intensa fluorescencia cuando son excitadas por la radiación ultravioleta, por ello su evaluación cuantitativa se basa en la comparación visual o densitométrica de la fluorescencia de la muestra con un estándar (Peña, S. y M. Durán, 1990).

El crecimiento fungal y la contaminación con micotoxinas son la consecuencia de una interacción entre el hongo, el sustrato y al medio ambiente. La combinación apropiada de estos factores determinan la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y cantidad de micotoxina producida. La contaminación de animales y del hombre resulta de la ingestión de alimentos contaminados. En el caso del hombre esto es principalmente con granos, carnes o leche contaminada (Torres, E., 1995).

PERSPECTIVA HISTORICA DE INTOXICACION POR AFLATOXINAS

Por muchos años se supo que los hongos filamentosos producían metabolitos tóxicos, pero sus efectos eran ignorados. Haciendo un estudio retrospectivo, se encontró que en 1954 una enfermedad fatal conocida como hepatitis exudativa había dado muerte a cobayos. La causa de este problema se le atribuyó a la ingestión de alimento contaminado, muy posiblemente con aflatoxinas. En 1955 otra enfermedad llamada hepatitis X se presentó en perros, y se encontró que el alimento estaba hecho a base de harina de cacahuate; otro caso similar ocurrió en 1957 en cerdos y ganado vacuno en donde se detectó la presencia de maíz mohoso en el pienso (Torres, E., 1995).

Las investigaciones relativas a la enfermedad X de los pavos en Inglaterra en 1960 (Goldblatt, L. A., 1969) condujeron al establecimiento de la micotoxicología. Los estudios histopatológicos de los pavos afectados revelaron daños en el tejido hepático, asociado a necrosis en el ducto biliar. Paralelamente se aisló de las muestras *A. flavus* y *A. parasiticus* que han sido identificados como productores de toxinas. La fuente de intoxicación fue el alimento contaminado a base de harina de cacahuate. El análisis cromatográfico de los compuestos permitió caracterizar cuatro productos químicos interrelacionados a los que se les llamó de manera genérica aflatoxinas (de *A. flavus* + toxina) más las letras B (blue) o G (green) con los subíndices 1 y 2 para cada molécula relativa de acuerdo con su movilidad cromatográfica. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son derivados hidroxilados de los compuestos anteriores que se encontraron en la leche de vacas alimentadas con productos que contenían aflatoxinas B₁ y B₂ (Peña S. y M. Durán, 1990).

Hasta el momento, todos los seres vivos han resultado susceptibles a las aflatoxinas. Algunas bacterias se inhiben en su presencia, ciertas plantas verdes presentan clorosis (deficiencia de clorofila), las semillas pierden su capacidad de germinación, y el grado de toxicidad (que puede ser genética o no genética, carcinogénica o mutagénica) varía de acuerdo con las especies. Las dosis letales en animales son variables, pero en el caso de la aflatoxina B₁, que es la más tóxica, pueden ser menores de 0.5 hasta 20 µg de aflatoxina por kg de peso corporal, dependiendo del tipo de ensayo biológico y del tipo de aflatoxina (Peña, S. y M. Durán, 1990).

Se han realizado estudios en pollos que están expuestos a alimento contaminado con aflatoxinas, encontrándose un nivel de aflatoxinas de 0 a 2 ppm. Se demostró que esto afectaba adversamente la retención de nutrientes por los pollos, así como reducía la proteína en suero y producía un incremento en fosfatasa alcalina y en algunas transaminasas (Johri, T. S. y V. R. Sadagopan, 1989).

En mamíferos, la aflatoxicosis provoca una amplia variedad de manifestaciones patológicas relacionadas con la capacidad de la aflatoxina para obstaculizar la síntesis de las proteínas, para reaccionar con las macromoléculas y organelos celulares y para interferir en la producción normal de sistemas enzimáticos. El envenenamiento agudo con aflatoxinas causa necrosis y disfunción hepática y extensas lesiones hemorrágicas que resultan letales.

En 1964, LeBreton y sus colegas propusieron que las aflatoxinas son cancerígenas para el humano. Actualmente existen muchos reportes del efecto de éstas sobre el desarrollo de carcinoma hepatocelular primario en el hombre. Además de ello, estas sustancias afectan adversamente los procesos vitales ya que poseen una propiedad inmunodepresora. Esta última propiedad se ha demostrado en aves, cerdos, caballos, conejos y ratones, y se ha observado que los cerdos juveniles y las aves son las especies más sensibles a la inmunotoxicidad de las aflatoxinas (Ray P. K. *et al*, 1991).

En 1989 se realizó un estudio de los niveles de exposición a aflatoxinas en personas que laboran en la molienda de arroz ya que los trabajadores solían presentar con frecuencia enfermedades respiratorias. Se condujo un muestreo en diferentes lugares de las fábricas como el lugar de procesamiento, el almacén y las oficinas. Al

analizar los resultados, encontraron que los dos géneros que se encontraban en mayor abundancia eran *Cladosporium* y *Aspergillus*, siendo las especies más frecuentes *A. nidulas*, *A. flavus* y *A. niger*, conocidos agentes causales de aspergilosis (Desai M. S. y S. K. Ghosh, 1989)

Aspergillus y aflatoxinas en alimento

En estudios recientes se ha encontrado que no sólo granos y cereales son susceptibles a la contaminación por *A. flavus* y/o aflatoxinas. En 1993, Kumar y Roy, hicieron una revisión de 50 plantas que se utilizan en la medicina tradicional hindú para curar padecimientos del hígado, encontrando que 28 de ellas presentaban diferentes niveles de aflatoxina B₁ y sólo una con aflatoxina G₁. Dichas concentraciones de aflatoxinas están por arriba de los niveles permitidos por la FDA (Food and Drug Administration).

Existen algunas investigaciones que reportan que cuando se usa maíz contaminado con aflatoxinas y después es procesado, ya sea para su fraccionamiento: remojado, fibra, gluten, germinado y almidón (Yahl R. *et al*, 1971), o bien en el procesado de tortillas de maíz (Ulloa-Sosa M. y H. W. Schroeder, 1969), el producto final comercial se puede encontrar con bajos niveles de aflatoxinas. Sin embargo se ha reportado que los procesos como la alcalinización, hace que decrezca la fluorescencia de las aflatoxinas, pero la reacción es reversible con un tratamiento de acidificación (Ulloa-Sosa M. y H. W. Schroeder, 1969). En el caso de otros tipos de tratamientos, los niveles de aflatoxinas no bajan (Yahl R. *et al*, 1971).

Recientemente se realizó una investigación sobre la ocurrencia de *A. flavus* y aflatoxinas en pistachos, el cual es un sustrato común para esta especie. Se encontraron concentraciones muy variables de aflatoxinas dependiendo de la parte del pistacho a analizar y de las condiciones del mismo, siendo que el pistacho con la testa completa era menos susceptible a la contaminación con este hongo (Mahoney N. E. y S. B. Rodríguez, 1996).

Se ha encontrado que productos como el arroz se contaminan por *A. parasiticus* y *A. flavus* en condiciones climatológicas de almacén, como una alta humedad y 30 °C, observándose una concentración máxima de toxinas después de 15 a 33 días (Schroeder H. W. *et al*, 1968)

CONTROL Y MANEJO DE MICOTOXINAS

Las aflatoxinas son consideradas como contaminantes inevitables de alimentos y piensos. La mayoría de los países han establecido los niveles máximos permitidos para diversos tipos de alimentos. Algunos de ellos en base a sus propios estudios, otros como los países latinoamericanos han adoptado las reglamentaciones de la FDA de los E.E.U.U. que son los siguientes:

20 ppb de aflatoxinas totales, para alimento de humanos

0.5 ppb de aflatoxina M₁ en leche

20 ppb para piensos

200 ppb para maíz destinado a ganado porcino

100 ppb para piensos usados para ganado vacuno y porcino de crianza y aves de corral

En México la reglamentación para aflatoxinas es la siguiente:

20 ppb de aflatoxinas totales para alimentos en humanos

0 ppb de aflatoxinas totales en alimentos para ganado lechero y aves

200 ppb para cereales para alimentos balanceados de bovinos y porcinos de engorda (OPS, 1983 y Torres, E. 1995)

OCURRENCIA DE AFLATOXINAS EN MEXICO

La infección por aflatoxinas en campos de maíz fue reportada por primera vez en la literatura científica en 1975 en Estados Unidos, siendo el grano la parte principal contaminada de la planta. Desde entonces la presencia de estas toxinas ha sido reportada en mayor o menor grado en otros países como El Salvador, Costa Rica, Guatemala, Haití, Colombia, Ecuador, Kenia, India, Filipinas, Tailandia y México (Tamaulipas, Chiapas y Baja California) (Reyes, C. 1995).

En México se han realizado estudios sobre la ocurrencia de aflatoxinas en diversos alimentos. En los años 70 se analizaron tortillas, frijol, maíz, harina nixtamalizada, nuez y alimento balanceado. La incidencia de aflatoxinas varió desde 1% hasta 100%. Durante 1980 a 1989 se analizaron cacahuete, mazapán, harina de maíz, fécula de maíz, maíz blanco, sorgo, cacao y leche, encontrándose una incidencia de 17, 48, 0, 0, 0, 33, 48 y 100% respectivamente (Guzmán, D. 1994).

Entre 1989 y 1992 se realizó un programa para supervisar la presencia de aflatoxinas en maíz en el Estado de Tamaulipas. En el periodo de 1990-1991, se encontró que el 66.5% de la cosecha se encontraba aceptable para el consumo

humano y el 33.5% no pudo ser disponible como alimento, ya que contenía un nivel de 21 a 400 mg/Kg de aflatoxinas totales. Por lo que una tercera parte de la producción de maíz estaba contaminada (Juan-López M. *et al*, 1995).

En el norte de Tamaulipas, se han realizado muestreos de maíz, y los niveles de contaminación por aflatoxinas son muy elevados. En Chiapas, se han encontrado niveles bajos de entre 8 y 12 ppb, pero bajo condiciones adecuadas esta cantidad se podría incrementar. En Baja California, en el año de 1993, se hizo un monitoreo de aflatoxinas en algodón y maíz, encontrando en campo cantidades de 16 ppb y en almacén de 74 ppb, en cambio, en 1994, el promedio de aflatoxinas encontradas en los cultivos fue de 391 ppb, con un rango de 9 a 2100 ppb (Reyes, C. 1995).

Se han realizado numerosas investigaciones sobre métodos físicos, químicos y biológicos para degradar a las aflatoxinas, ya que son muy estables. Sin embargo, ninguno de los tratamientos analizados ha mostrado ser totalmente satisfactorio. Se ha probado el tratamiento de muestras contaminadas con irradiación, con calor seco y húmedo, obteniéndose una destoxificación del 70% como máximo al utilizar calor seco. También se ha probado el tratamiento con ácidos y bases, ya que degradan a las aflatoxinas, pero además de que se requieren grandes cantidades de estos compuestos, en ocasiones no reducen suficientemente los niveles en los alimentos (Gray F. A. *et al*, 1982).

En 1994, se investigó el efecto de la inactivación de las aflatoxinas utilizando amonía, esto se llevó a cabo en semillas de algodón mediante dos métodos: amonización a temperatura ambiente (APAT) y amonización a alta presión y alta temperatura (HPHT). Después con este producto se alimentó a vacas. El tratamiento

APAT redujo un 2.5% la incidencia de tumores hepáticos, en cambio con el método HPHT no se observó la aparición de tumores hepáticos (Bailey G. S. *et al*, 1994).

ACTIVIDAD ANTIJUNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS

A través del tiempo, los métodos de combate de microorganismos patógenos o deteriorantes de alimentos, han tenido innovaciones significativas, las cuales han sido motivadas principalmente por la emergencia de nuevos patógenos, por la creciente demanda de alimentos y por la necesidad de evitar la contaminación del medio ambiente. Tomando en cuenta estos tres factores, uno de los controles que ha adquirido más importancia en los últimos años, es aquel que basa su acción en el uso de sustancias de origen natural, esto es, extractos obtenidos de plantas con actividad como fungicidas, herbicidas, bactericidas e insecticidas (Rovalo M. *et al*, 1983). Además de ello, en general, la asimilación de productos naturales por el hombre, es más fácil que la de productos sintéticos.

El uso de plantas superiores para tratar infecciones tanto bacterianas como fúngicas es una práctica muy antigua y en un tiempo fue el único método disponible para tratar enfermedades (Recio M. C. y J. L. Rios, 1989). Se sabe que los egipcios utilizaban materiales de origen vegetal para preservar a sus muertos. Plinio, Virgilio e Hipócrates ya mencionan en sus escrituras que el ajo se utilizaba como un tratamiento para diversas enfermedades tales como indigestión, neumonía e infecciones (Davison, M. 1993). A finales del siglo XIX y principios del XX, se demostraron las propiedades de algunos aceites extraídos de plantas. Chamberland (1887) mostró que el aceite de

canela inhibió la esporulación de *Bacillus anthrax*. En 1910, Grove pudo preservar salsa de tomate con extractos acuoso y alcohólico de clavo y de canela. Hoffman y Evans (1931) y Corran y Edgar (1933) demostraron las propiedades germicidas de las especias y aceites esenciales de diversas plantas. Prasad y Joshi (1929) recomendaron preservar frutas utilizando una infusión de sal con clavo. Más recientemente, Webb y Tanner (1944) demostraron que las infusiones de canela, clavo y pimienta prevenían el crecimiento de levaduras en caldo de cultivo. Frazier (1967) demostró que el aceite de canela fue un inhibidor efectivo de levaduras y bacterias, y que en concentraciones altas evitaba el crecimiento de hongos filamentosos y así mismo, la formación de la spora asexual.

La búsqueda de antimicrobianos se debe realizar, utilizando diversas técnicas de extracción, lo que permite tener diferentes fracciones de una misma planta con una variedad de tipos de compuestos que pudieran tener por consiguiente, otros modos de acción (Mitscher L. A. *et al*, 1972).

Una de las formas más comunes de utilización de extractos de plantas, es como aceites esenciales. En 1978 se mostró el efecto bacteriostático de aceites esenciales de fragancias crudas que se utilizan en los jabones (Morris A. *et al*, 1978).

Existen cuatro factores especialmente importantes que se deben tomar en cuenta para el análisis de la actividad antimicrobiana de los aceites: la técnica de ensayo, el medio de cultivo, el microorganismo y el aceite esencial (Jassen A. M. *et al*, 1986).

Una de las plantas mayormente estudiadas a la fecha para combatir microorganismos perjudiciales es *Allium sativum*, (ajo); desde 1969 se han realizado

numerosos trabajos en los que probó la actividad antimicrobiana de este. (Delaha, E. C. 1985; Johnson M. G. *et al*, 1969 y Moore G. S y R. D. Atkins, 1977). Así como también se trató de identificar la naturaleza del compuesto activo. En 1969 se demostró que el componente del ajo y de la cebolla que inhibía a *Salmonella typhimurium* era un compuesto disulfuro alifático volátil: la alicina, la cual tenía una actividad bacteriostática (Johnson M. G. y R. H. Vaughin, 1969). Años después se probó el aceite esencial de ajo y de cebolla en la producción de la toxina de *Clostridium botulinum*, la cual inhibió sólo parcialmente (De Wit, J. C. *et al*, 1978).

En 1977 Moore G. S y R. D. Atkins demostraron que el extracto acuoso del ajo, tenía actividad fungicida y fungostático, contra levaduras de importancia médica. Un tiempo después se analizó contra micobacterias incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, observándose que el extracto de ajo era un fuerte inhibidor de micobacterias.

Yashphe J. *et al* analizaron la actividad antibacterial de *Artemisia herba-alba*, y su componente activo, el alcohol santolina que se encontraba en el aceite esencial de esta planta. Tiempo después, se probó el efecto de varios aceites esenciales sobre levaduras, siendo los de mayor poder inhibitorio del ajo, pimienta, canela, clavo, cebolla y orégano (Conner D. E. y L. R. Beuchat, 1984). En 1993 se analizó la actividad antimicrobiana del aceite de *Melaleuca alternifolia*, siendo efectivo contra *A. niger* y *Candida albicans* (Carson C. F. y T. V. Riley, 1993).

Además de las plantas que se utilizan normalmente como especias en el alimento, también se han analizado otras que podrían ser antimicrobianos potenciales. En 1980, se estudió el efecto de extractos del álamo (*Populus sp*) contra bacterias

patógenas y levaduras de importancia médica como *C. albicans*, en este trabajo encontraron que las extracciones acuosas y con cloroformo eran activas para las bacterias y levaduras, y que las fracciones metanólicas y con éter de petróleo eran inactivas o pobres antibacterianas (Van Hoof L. *et al*, 1980).

Rovalo M. *et al* realizaron un estudio muy completo sobre la barreta (*Helietta parvifolia*), un recurso natural de nuestra región, y se encontró que la fracción obtenida por arrastre de vapor como aceite esencial, tenía un alto potencial fungicida, inhibiendo completamente el crecimiento de *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, y alterando anatómicamente y fisiológicamente a *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. flavus* (Rovalo *et al*, 1983).

En numerosas investigaciones, se ha tratado de elucidar cuál es la naturaleza del compuesto activo de los extractos de plantas que tienen alguna acción antimicrobiana. En 1980, se estudiaron los compuestos poliacetilenos de las plantas de la familia Asteraceae. Estos son derivados del ácido oléico y algunos de los principales son la tiarubrina A, que es un agente antifúngico en la oscuridad y no tiene actividad antibacteriana. Este compuesto en exposición a la luz ultravioleta se convierte en tiofeno que es extremadamente tóxico para hongos y bacterias en la luz; con esto concluyeron que las plantas que producen furanoacetilenos, tiarubrininas, tiofenos o compuestos alifáticos con 4 o 5 triples enlaces conjugados exhiben fototoxicidad a hongos y bacterias. En 1989 se estudiaron plantas de zonas áridas que son productoras de fototoxinas con acción biocida, en este caso, algunas especies de la familia Asteraceae y *Larrea tridentata* tenían una potente actividad antimicrobiana en ausencia de luz (Downum K. *et al*, 1989).

El-Gammal A. *et al*, estudiaron la actividad antimicrobiana de algunos compuestos flavonoides, mostrándose que en general los hongos fueron más sensibles a su acción que las bacterias. En 1994 se aislaron compuestos isoflavonoides del género *Astragalus*, con una marcada actividad antimicrobiana (Elsebakhy N. A. *et al*, 1994).

En 1987, Rios J. L. *et al*, probaron la actividad antimicrobiana de algunas plantas de España, y determinaron que el efecto antimicrobiano de esas plantas radicaba en los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) y lactonas sesquiterpénicas (terpenoides). En 1993 se aisló un compuesto fenólico de la oliva llamado oleuropeína, y se mostró su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxina B (Kabayaski A. *et al*, 1994). En ese mismo año, Tuncel G. *et al* determinaron que la actividad de los compuestos fenólicos es antioxidante, y que el ácido cafeico es muy efectivo como inhibidor de bacterias como *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* y *S typhimurium*. En 1994, se aisló un compuesto fenólico producido por una peroxidasa del rábano que tenían una marcada actividad antimicrobial contra hongos y bacterias.

En 1988, se aisló un nuevo diterpeno de *Echinolena inflexa*, el cual tiene actividad no sólo antimicrobiana, sino también antineoplásica (Nicoletti M. *et al*, 1988). En ese mismo año, Martino V. *et al*, aislaron compuestos polifenólicos y flavonoides de *Achyrocline tomentosa*, que pertenece a la familia de las compuestas (Martino V. *et al*, 1988). Mientras que Betto P. *et al*, analizaron otro miembro de la misma familia, *Artemisia arborescens*, y se concluyó que la familia de las compuestas es un grupo muy importante por la actividad biológica de sus componentes principales: las lactonas

sesquiterpénicas en sus partes aéreas y sus compuestos poliacetilénicos y lignanos tetrahidrofuránicos de sus partes subterráneas las cuales muestran actividad antitumoral y antifúngica (Betto P. *et al*, 1988). En 1991 se hizo una búsqueda de actividad antimicrobial en plantas mediterráneas, probando 22 extractos de diferentes especies de plantas contra 9 especies de hongos y 6 especies de bacterias. Los hongos filamentosos *A. parasiticus* y *Fusarium culmorum* fueron inhibidos por dos especies de la familia de las compuestas y una gramínea (March C. *et al*, 1991).

Además de algunas especies de la familia de las compuestas como se muestra en los reportes antes citados, en 1988 Lopes L. M. *et al*, encontraron que los miembros de la familia Aristolochiaceae tienen la habilidad de sintetizar alcaloides fenantrénicos y arilpropanoides, que incluyen lignanos y neolignanos que tienen propiedades antitumorales, antifúngicas, antibacteriales e insecticidas.

En 1994, se aislaron compuestos antifúngicos de algunas especies de *Zygophyllum*, la fracción extraída con éter de petróleo, no mostró efecto antifúngico, pero la fracción metanólica exhibió un alto potencial (Ouf S. A. *et al*, 1994).

En 1993 se analizó la actividad antimicrobiana de un compuesto llamado xantina, aislado de la planta *Xanthium spinosum*, y este compuesto mostró tener actividad contra *B. cereus* y *S. aureus* pero no contra *E. coli* y *S. typhi*. Cuando se probó con hongos, tuvo un efecto inhibitor contra *Colletotrichum sp.*, un bajo efecto con *F. oxyspora* y ningún efecto contra *Penicillium italicum* y *A. flavus* (Ginesta-Peris E. *et al*, 1994). En 1994, se aislaron xantonas de la planta *Garcinia cowa*, la cual mostró actividad antimicrobiana al probarse contra *S. aureus* (Pattalung P. N. *et al*, 1994).

Del género *Salvia*, miembro de la familia Labiaceae, se aislaron diterpenos abietánicos que tienen actividad bactericida, antifúngica, y antitumoral . Por otra parte se aislaron tres glucósidos de ácido quinóico de *Bhesa paniculata* (Celastraceae), planta que es utilizada como planta medicinal en Indonesia (Ohashi K. *et al*, 1994).

En 1993 Linton C. J. *et al*, realizaron una revisión de los compuestos volátiles y su actividad biológica, y encontraron que muchos de ellos tienen un efecto inhibitorio en los microorganismos, pero hay algunos que hacen que incrementen las poblaciones bacterianas y fúngicas. Se analizaron los compuestos emitidos por las semillas de frijol y pepino cuando están en su etapa de germinación y se comprobó que reducían la esporulación de hongos filamentosos como *Penicillium sp.* y *Gelasinospora cerealis*. Después se demostró que las hojas de algodón emitían compuestos volátiles que inicialmente inhibían el crecimiento de *A. flavus* y que después de 7 días el efecto de esas sustancias era estimulante del crecimiento del hongo. En 1994, se observó que los productos volátiles del neem, después de incubarse por 3 días con un cultivo de *A. parasiticus*, producían una reducción de 90% de la producción de aflatoxina y un 51% de reducción de la biomasa del hongo, en comparación con el control que no tenía estos compuestos volátiles (Martino, V. *et al*, 1988). En 1994, Eberhardt T. *et al* aislaron polímeros de proanoacianidina (taninos condensados) de extractos de semillas de *Picea glauca*, *Pinus banksiana*, *P. nigra*, *P. ponderosa* y *P. taeda* y se probó su actividad antifúngica contra *Ceratocystis coerulescens* y *Schizophyllum commune*, determinando que efectivamente tenían propiedades inhibitorias contra estos hongos.

En 1986 se reportó que las saponinas son glucósidos que tienen el potencial de afectar la resistencia a las enfermedades en plantas, y Polancheck I. *et al*, comprobaron que las saponinas tienen una toxicidad selectiva a hongos. Por otro lado, en 1990 se estudió un compuesto "G2" aislado de la raíz de la alfalfa aplicándolo en lesiones producidas por hongos dermatofitos en cobayos infectados experimentalmente, y se comprobó que después de 12 a 15 aplicaciones, sanaba el 80% de las lesiones (Evron R. *et al*, 1990). En 1991, Elías R. *et al*, aislaron saponinas triterpenoides de *Hedera helix* y se determinó su actividad biológica, encontrando que tienen propiedades antifúngicas, antihelmínticas, moluscocídicas y antimutagénicas.

En 1989 se realizó una revisión de algunos de los compuestos antimicrobianos aislados de plantas, en los que se mencionan las fitoalexinas como compuestos que producen las plantas en respuesta a una infección, su acción antifúngica ha sido estudiada y probada (Recio M. C. y J. L. Ríos, 1989). En 1994, se aisló un par de compuestos de *Camelina sativa* con un alto potencial antifúngico que resultaron ser fitoalexinas (Conn K. L. *et al*, 1994). Ya desde 1988 se había aislado de la zanahoria la fitoalexina GMM que es capaz de inhibir el crecimiento de células bacterianas, fúngicas, animales y vegetales, alterando la permeabilidad de la membrana (Amin M. *et al*, 1988).

En Latinoamérica se han hecho búsquedas de plantas que se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo: en 1990 se probaron 84 plantas contra 5 enterobacterias (Cáceres A. *et al*, 1990); un tiempo después se analizó la actividad de 38 extractos de plantas contra *Candida spp* (Cáceres A. *et al*, 1990). Y en

1991, se analizaron 68 extractos etanólicos de plantas contra microorganismos que causan enfermedades en las vías respiratorias (Cáceres A. *et al*, 1991).

El estudio de los compuestos antimicrobianos aislados de las plantas, a lo largo de mucho tiempo, nos muestra que son de diferente naturaleza, como alcaloides, cromanos, flavonoides, fenoles, secoiridoides, antraquinonas, terpenos, floroglucinoles, ácidos fenólicos, saponinas y lactonas principalmente (Recio M. C. y J. L. Ríos, 1989).

La mayoría de los estudios sobre la actividad antimicrobiana de plantas, además de su ya legendaria utilización en la medicina tradicional, buscan una aplicabilidad para resolver problemas reales, por ejemplo, en 1993, Sinha H.N. *et al*, utilizaron extractos de plantas medicinales para combatir enfermedades fúngicas de los plátanos, ya que éstos se ven contaminados por hongos como *F. oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Trychothecium roseum* y *A. niger*, obteniendo buenos resultados

En 1982, Azzouz M. A. y L. B. Bullerman hicieron un estudio comparativo de los efectos antimicóticos de 16 hierbas aromáticas y especias, otras 4 plantas y 3 agentes comerciales antifúngicos (ácido tánico y dos inhibidores experimentales) sobre el crecimiento de 7 hongos filamentosos productores de toxinas. De las 26 sustancias probadas, el clavo, la canela, la mostaza, la pimienta, el ajo y el orégano en una concentración del 2% inhibieron a los 7 hongos filamentosos micotoxigénicos probados, así mismo, el sorbato de potasio al 0.3% tuvo una actividad fuertemente inhibitoria en las 7 especies. El antibiótico antifúngico natamicina fue altamente efectivo y las combinaciones de diferentes niveles de sorbato de potasio y clavo mostraron una potencialización del efecto sobre los 7 hongos.

INHIBICION DE LA PRODUCCION DE AFLATOXINAS

La biosíntesis de las aflatoxinas involucra a una ruta metabólica compleja desde decacetida vía antraquinona y xantona como intermediarios, muchas de las etapas ya están bien entendidas a nivel molecular, pero el control y la enzimología de la producción de las aflatoxinas no está bien comprendida, sólo se sabe que la afectan muchos factores ambientales y nutricionales (Gray F. A. *et al*, 1982).

En los últimos años, algunas especias han sido analizadas para inhibir y controlar hongos aflatoxigénicos (Bilgrami K. S. *et al*, 1992). En 1974, Bullerman analizó el efecto sobre el crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxina de los aceites de canela (*Cinnamomun zelyanicum*) y de clavo (*Eugenia aromatica*). Se determinó que la canela contenía entre 0.5 a 1.0% de aceite volátil compuesto por aproximadamente 75% de aldehído cinámico, 8% de eugenol, algo de ácido cinámico y otros compuestos. Y el clavo contenía 14 a 21% de aceites volátiles con más del 95% de eugenol. Las cuatro sustancias inhibieron tanto el crecimiento de *A. parasiticus* como la producción de aflatoxinas, necesitando cantidades de 200-250 ppm de aceite de canela o de clavo, 150 ppm de aldehído cinámico o 125 ppm de eugenol. En este mismo año, Bullerman publicó otro trabajo en el que se mostró la actividad de la canela contra la producción de aflatoxina por *A. flavus*, teniendo una inhibición de B1, B2, G1 y G2 a una concentración del aceite de 1%, 0.2%, 0.2% y de 0.2% respectivamente.

En 1992, Bilgrami K. S. demostró la inhibición de la producción de aflatoxina y crecimiento de *A. flavus* en granos de maíz, utilizando extracto de ajo y cebolla además de eugenol aislado. Encontró que la máxima inhibición de crecimiento micelial

ocurrió con el extracto de ajo (61.94%), y la inhibición mayor de producción de aflatoxina ocurrió con el extracto de cebolla (60.44%). El eugenol fue el inhibidor con mayor disponibilidad para inhibir la producción de aflatoxina (60.35%) en los granos de maíz.

El aceite de eucalipto es conocido como antiséptico, profiláctico y antihelmíntico, y en 1991 (Ansari A. A. y A. K. Shivastava) probaron su acción sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *A. flavus*. Para esto se adicionaron al medio tres diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.2 mg/50 ml de medio). A los 6 días se observó una inhibición de crecimiento y de la producción de aflatoxina, esta inhibición se incrementó proporcionalmente a la concentración del aceite. A los 12 días de incubación, hubo un aumento en la producción de aflatoxina, la tasa de potencialización de la producción de la toxina fue directamente proporcional a la concentración del inhibidor aplicado, pudiendo existir una correlación entre el estrés y la biosíntesis de aflatoxinas.

En 1989, Farag R. S. *et al* analizaron la influencia de algunos aceites esenciales de especias, en el crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas en un medio sintético. Ellos determinaron que entre los compuestos de cada aceite esencial de tomillo, comino y clavo, se encontraban timol, aldehído de comino, eugenol, carcoma, borneol y tujona. A la vez demostraron que los aceites causaban una completa inhibición del crecimiento micelial y de la producción de aflatoxina.

Patkay K. L. *et al* en 1993 probaron el efecto de los aceites esenciales de canela, clavo, almendra y cardamomo en el crecimiento y la producción de aflatoxina

B1 por *A. flavus*. Los aceites de la canela y del clavo, inhibieron completamente el crecimiento y la producción de aflatoxinas a una concentración de 0.5 y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio respectivamente. El aceite de almendra y el de cardamomo sólo afectaron el crecimiento cuando su concentración excedió los 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La producción de aflatoxina se vio estimulada con el aceite de almendra a una concentración de 0.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ o por una concentración de aceite de cardamomo de 0.25 y 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

La utilización de aceites esenciales se ha llevado a la práctica de manera experimental, por ejemplo, en 1992 Sinha K. K. *et al*, analizaron "in vitro" el efecto de los aceites de clavo y de canela en el crecimiento y la producción de aflatoxina por *A. flavus*. El efecto de estos compuestos se verificó con la producción de aflatoxina en el maíz reproduciendo las condiciones de almacenamiento. En medio de cultivo, ocurrió una reducción significativa de la producción de aflatoxina al utilizarse los aceites a concentraciones mayores de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El aceite de canela exhibió la mayor acción inhibitoria y redujo un 78% la formación de aflatoxina en maíz al emplearse a una concentración de 1 mg/kg . Un año antes, Chatterjee D. propuso una formulación efectiva para el almacenamiento de maíz libre de hongos y aflatoxina. El se basó en la eficacia del aceite de canela como inhibidor del crecimiento del hongo y la producción de aflatoxina. La mezcla contenía además una solución de cloruro de sodio al 5%, que inhibía sinérgicamente la infección por los hongos, el crecimiento de éstos, la producción de aflatoxinas, y el deterioro de los granos de maíz, ya que causaba una disminución en su germinabilidad.

Además de los aceites esenciales examinados, también se han probado otras plantas medicinales. En 1992, Kumar S. y G. Prasad analizaron el extracto acuoso de

una planta medicinal de la India *Andrographis peniculata*, a diferentes concentraciones (3, 5, 8 y 10 mg/ml) sobre el crecimiento y producción de aflatoxina por *A. flavus*. Ellos mostraron que la inhibición máxima de la producción de aflatoxina y crecimiento de *A. flavus* fue con 10 mg/ml, teniendo un 78.6% de reducción de aflatoxina B1 y un 75.1% de disminución de crecimiento micelial, encontrando que el crecimiento y la producción de aflatoxina son procesos correlacionados.

En 1994 Prasad G. *et al* analizaron la planta *Amorphophallus campanulatus* y el oxalato de calcio como inhibidor de la biosíntesis de aflatoxina. Ellos encontraron que el oxalato de calcio era uno de los componentes principales de esta planta, por lo que lo probaron por separado. Determinaron que a una concentración de 4.5 mg/ml de extracto de las hojas de *A. campanulatus* y a una concentración de 0.4 mg/ml de oxalato de calcio, se inhibía el crecimiento y la biosíntesis de aflatoxina.

Goodrich-Tanrikulu *et al*, en 1995, lograron aislar un compuesto llamado metil jasmonato, que es un regulador de crecimiento. Se le analizó su efecto sobre la producción de aflatoxinas de *A. flavus*, y se encontró que inhibía tanto el crecimiento como la producción de aflatoxinas.

En 1988, Badii F. y M. O. Moss probaron el efecto de los fungicidas tridemórficos, fenpropimórfico y fenarimol en el crecimiento y la producción de aflatoxina por *A. parasiticus*. El tridemórfico, fenpropimórfico y fenarimol, inhibieron, en concentraciones de 240, 250 y 0.75 µg/ml respectivamente, el crecimiento de *A. parasiticus*. El fenpropimórfico fue el compuesto más efectivo y es considerado un inhibidor del citocromo P 450, lo cual influye en la tasa de proporción de las aflatoxinas B y G, ya que éste está involucrado en la conversión de aflatoxina B a G.

HIPOTESIS

Los extractos de varias plantas del norte de la república presentan sustancias capaces de inhibir el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*

OBJETIVOS

Demostrar en forma preliminar el efecto de extractos de plantas utilizadas como antifúngicos empíricos, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*

Aislar las fracciones de los extractos crudos de las plantas, que muestren efecto inhibitorio en el crecimiento y/o en la producción de aflatoxinas por el hongo *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Determinar el efecto de las fracciones sobre el crecimiento radial, peso seco y producción de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus*

Establecer las concentraciones mínimas de las diferentes fracciones que inhiban el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus*

Determinar la actividad esporocida de los extractos activos

MATERIALES Y METODO

PLANTA UTILIZADA	PARTE
<i>Opuntia leptoculis</i> DC.	Toda
<i>Leucophyllum frutescens</i> L.	Toda, tallo, hoja
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	Hoja, hoja
<i>Agave lecheguilla</i> Torr.	Hoja, raíz, brote
<i>Jatropha dioica</i> (HBK) Mac Vaugh	Hoja, tallo, raíz
<i>Opuntia sp.</i>	Toda
<i>Asphodelus fistulosus</i> L.	Raíz, tallo
<i>Yucca filifera</i> Chab.	Tallo, corteza, raíz
<i>Larrea tridentata</i> (DC) Cov.	Toda
<i>Baccharis glutinosa</i> Pers	Toda
<i>Quillaia saponaria</i> L.	Toda
<i>Lantana involucrata</i> L.	Toda
<i>Berberis trifoliata</i> Moric.	Toda
<i>Euphorbia maculata</i> L.	Toda
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd.	Toda
<i>Eugenia aromatica</i> Baill	Toda
<i>Prosopis julifolia</i> Swartz	Hoja
<i>Litsea glausescens</i> HBK	Hoja
<i>Cinnamomun zelynicum</i> Nees	Tallo
<i>Origanum vulgare</i> L.	Hoja
<i>Helietta parvifolia</i> (Gray) Benth	Toda
<i>Yucca schidigera</i> Roezl ex Ortgies	Tallo
<i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	Toda
<i>Salvia mexicana</i> L.	Toda
<i>Ocimum micranthum</i> Willd	Toda
<i>Capsicum annuom</i> L. var <i>ceraciforme</i> Irish	Fruto
<i>Capsicum annuom</i> L. var <i>grossum</i> Sendlt	Fruto

Tabla 1 Plantas utilizadas

ORGANISMO E INÓCULO

Las cepas utilizadas fueron *A. flavus* NRRC 1059, 1299, 1273 y *A. parasiticus* NRRC Su-1 y 148, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Deepak Bhatnagar del Southern Regional Research Center y por el Dr. John Linz del Department of Food Science and Human Nutrition de Estados Unidos. El inóculo se preparó creciendo al organismo en medio agar papa dextrosa (PDA) por 7 días, incubándolo a una temperatura de 28°C. Las esporas se obtuvieron en 3 ml de agua destilada estéril y subsecuentemente se hicieron diluciones para obtener una suspensión de esporas de 1×10^6 . Cada uno de los experimentos realizados en este trabajo se hicieron al menos por duplicado.

PREPARACION DE EXTRACTOS:

Obtención de extractos:

Se tomó una muestra de 10 g de la parte utilizada la cual se limpió y se mantuvo seca a peso constante. Después, se trituró y se maceró en 50 ml de cada uno de los siguientes solventes: éter de petróleo, cloroformo, metanol, etanol y agua. El proceso se llevó a cabo por 24 h a temperatura ambiente, excepto el acuoso que se mantuvo a 4 °C. Para la obtención del extracto, la suspensión se centrifugó a 3,000 x g por 20 min, y el sobrenadante obtenido se filtró en papel Whatman No. 5. Después este extracto se esterilizó utilizando membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45µm y se colocó en viales estériles que se mantuvieron a 4°C por un periodo máximo de 20 días (Dominguez, 1973).

Se prepararon discos de papel filtro con un diámetro de 5 mm, los cuales se impregnaron con 100µL de cada uno de los extractos y se mantuvieron en un lugar seco.

Análisis:

Para las pruebas preliminares se utilizaron cajas Petri con medio PDA, las cuales fueron inoculadas con los microorganismos. Después se colocaron sobre el agar, discos de papel filtro impregnados con los diferentes extractos. Se consideraron como positivos aquellos extractos que originaron un halo de inhibición o que no permitieron crecimiento sobre el disco.

TOXICIDAD DE LOS SOLVENTES

En este análisis se probó la toxicidad de 6 compuestos que fueron: glicerol, tween 20, DMSO, etilenglicol, acetona y metanol. Para esto se inoculó *A. flavus* y *A. parasiticus* en 25 mL de medio SMKY, y se agregó 1 mL de cada solvente. Los cultivos se incubaron por 7 días a temperatura ambiente. Por otro lado se les determinó la miscibilidad en agua y en cloroformo, así como su capacidad de resuspensión de extractos, tomando como indicador extracto clorofórmico de *L. tridentata*.

OBTENCION DE EXTRACTOS

Los extractos que mostraban inhibición del crecimiento se consideraron con potencialidad antifúngica, por lo que se procedió a la obtención de éstos con la utilización de un extractor Soxhlet.

Extracción continua

Las plantas activas se sometieron a extracción continua. Para esto, 20 g de la planta seca se colocaron en un percolador (Soxhlet). Se realizó una extracción primaria con éter de petróleo para desengrasar la muestra de la planta, al residuo de la percolación, el marco (orujo), se le hizo una extracción con cloroformo. El marco, se utilizó para realizar otra extracción con metanol, y por último se usó agua como solvente. El residuo se desechó. Los extractos fueron sometidos a un rotavapor para concentrar la muestra y recuperar el solvente (Domínguez, 1973).

Para la utilización de los extractos se determinó su peso seco, y después se resuspendió en un volumen determinado de solvente, utilizando acetona en el extracto clorofórmico, y metanol y agua en el extracto metanólico. El extracto acuoso se resuspendió en agua. Todos los extractos disueltos se esterilizaron por filtración utilizando una membrana con un poro de 0.45 µm.

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA

ANALISIS DE DIAMETRO DE COLONIA

En estos experimentos, se procedió a resuspender el extracto en un volumen de solvente conocido para determinar la concentración final. En cada caja Petri se agregó el extracto y después se le adicionaron 15 mL de agar (PDA). Ya preparadas las cajas, se realizó una inoculación central y se midió el diámetro cada dos días hasta el noveno (Bragulat, 1991).

ANALISIS DEL CRECIMIENTO DEL MICELIO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS

Este análisis se realizó en medio líquido SMKY, (200 g de sacarosa, 3 g de KNO_3 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 7 g de extracto de levadura, en un litro de agua destilada). El pH final del medio se ajustó a 6.0. Diferentes concentraciones de los extractos de las plantas a analizar se adicionaron a 25 ml del medio en matraces Erlenmeyer de 250 ml, el cual fue inoculado con 0.5 mL de la suspensión de esporas previamente ajustadas a 10^6 esporas/mL. El cultivo se incubó a 28 °C por 7 días sin movimiento. Después se filtró y se obtuvo el paquete celular el cual se secó a una temperatura de 60°C hasta obtener peso constante y se determinó el peso seco. Del sobrenadante del medio de cultivo, se realizó la extracción de aflatoxinas, mediante la adición de 100 ml de cloroformo. La fracción clorofórmica se evaporó hasta secarse y

se realizaron cromatografías de capa fina para su purificación, se colectó la mancha que contenía las toxinas y se guardó en seco.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

Para la determinación de la concentración mínima del extracto que inhibe el crecimiento (CMI), se realizaron los experimentos como se mencionó anteriormente, agregando diferentes concentraciones de los extractos en forma ascendente, hasta encontrar la concentración del extracto en que no se obtuvo crecimiento. Esto se realizó tanto en medio sólido PDA como en medio líquido SMKY.

PRUEBAS DE VIABILIDAD

a) Medio de cultivo: Después de 7 días de cultivo en medio SMKY, de los matraces en donde no había crecimiento (CMI), se tomó una muestra de 25 μ L y se inoculó en una caja Petri con agar PDA, y se determinó el crecimiento a las 24, 48 y 72 h.

b) Solución salina: Ya determinadas las CMI de todos los extractos en todas las cepas, se prepararon tubos con 5 mL de solución salina con 0.05% de Tween 20, a los cuales se les agregó la concentración de extracto determinada como inhibitoria y se inoculó con 100 μ L de suspensión de esporas (10^8 esporas/mL). Se tomó una alícuota cada 2 días y se inoculó una caja con PDA con 25 μ L del cultivo. Este procedimiento se llevó a cabo por 13 días. Se determinó el crecimiento a las 24, 48 y 72 h.

c) Análisis de viabilidad con el extracto clorofórmico de *Y. schidigera*. Se realizó el mismo ensayo mencionado anteriormente, incluyendo dos concentraciones mayores a la CMI, y se determinó viabilidad por 4 días de la forma ya mencionada.

CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS

Para determinar la presencia y la cantidad de aflatoxinas en las muestras, se utilizaron los métodos oficiales de la AOAC. La extracción clorofórmica del sobrenadante se sometió a cromatografía en capa fina de sílica gel, con un grosor de 500 μm , el sistema de eluentes fue de tolueno: alcohol amílico: metanol en una proporción de 90: 32: 2, teniendo como referencia que los Rf's son: B₁= 0.56, B₂ = 0.48, G₁ = 0.42 y G₂ = 0.34 (Singh, 1970).

Las manchas observadas bajo luz ultravioleta correspondientes a las aflatoxinas, se obtuvieron de la placa y se almacenaron hasta su cuantificación.

El protocolo propuesto por la AOAC para su cuantificación es el siguiente:

Para la calibración del espectrofotómetro, se hicieron tres soluciones de K₂Cr₂O₇ en H₂SO₄ a 0.25, 0.125 y 0.0625 mM. Se calculó la absorbancia molar ϵ de cada concentración, siendo que:

$$\epsilon = (A \times 1000) / \text{Concentración en mM}$$

El promedio de las tres nos da el ϵ de la solución. Se determinó el factor de corrección con la fórmula:

$$CF = 3160 / \epsilon$$

Para la curva de calibración se pesó 1 mg de aflatoxinas y se disolvieron en 100 mL de Metanol. Se determinó la absorbancia molar (ϵ) con la fórmula:

$$\epsilon = (A \times MW \times 1000) / \mu\text{g de aflatoxinas} / \text{mL}$$

La medición de aflatoxinas en espectrofotómetro de luz ultravioleta, se realizó entre 330 - 370 nm, para determinar la concentración se midió la absorbancia en la absorción máxima cercana a 350 nm y después se aplicó la fórmula:

$$\mu\text{g aflatoxina} / \text{mL} = (A \times MW \times CF) / \epsilon$$

A partir de este análisis, se determinó la productividad específica. Esta consistió en el cálculo de la producción de aflatoxinas (mg) por g de peso seco del micelio.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LAS PLANTAS UTILIZADAS

ANCLAMIENTO DE LA FRACCIÓN ACTIVA

Se prepararon placas de vidrio de 5 X 10 cm con sílica gel para cromatografía en capa fina al 30%, a un centímetro de la parte inferior de la placa se le colocó una muestra de cada extracto y se probaron diferentes sistemas de eluentes tomando en cuenta los siguientes solventes:

- * Cloroformo
- * Metanol
- * Acetona
- * Benceno
- * Butanol

Se probaron las siguientes combinaciones de eluentes y se determinaron los R_fs de cada banda obtenida con cada extracto:

- * Cloroformo
- * Cloroformo:Metanol (1:1)
- * Cloroformo:Acetona:Metanol (1:1:1)
- * Cloroformo:Acetona:Metanol (2:1:1)
- * Cloroformo:Acetona:Metanol (3:1:1)
- * Cloroformo:Acetona:Metanol (1:1:2)
- * Cloroformo:Acetona:Metanol (1:1:3)

- * Benceno
- * Benceno:Metanol (1:1)
- * Benceno:Acetona:Metanol (1:1:1)
- * Benceno:Acetona:Metanol (2:1:1)
- * Benceno:Acetona:Metanol (3:1:1)
- * Benceno:Acetona:Metanol (1:1:2)
- * Benceno:Acetona:Metanol (1:1:3)
- * Butanol:Metanol (1:1)
- * Butanol:Metanol (2:1)
- * Butanol:Metanol (4:1)
- * Butanol:Metanol (10:1)

Cada banda obtenida se obtuvo de la cromatografía y se resuspendió en solvente y se concentró la muestra.

ANÁLISIS ANTIFUNGICO

Se tomaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro y se impregnaron con 200µL de la solución obtenida del concentrado de cada banda.

Se inocularon cajas Petri conteniendo PDA con la cepa 1273 de *A. flavus* y la cepa Su-1 de *A. parasiticus* Ya inoculadas las cajas, se procedió a colocar los discos de papel filtro impregnados con cada fracción. Se dejó incubar 4 días y se observaron

los resultados. Las muestras positivas presentaron halo de inhibición o bien nulo crecimiento del hongo sobre los discos.

*PURIFICACION DEL COMPUESTO ACTIVO DE *L. tridentata**

Para comprobar la pureza del compuesto de la fracción activa se volvió a correr una placa de cromatografía en capa fina, con otro sistema de eluente, siendo este solamente cloroformo. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones. Finalmente se filtró en papel Whatman No. 4 y el filtrado se dejó secar en placas de vidrio, y ya seca la muestra se obtuvo y se guardó en un vial.

*PURIFICACION DEL COMPUESTO ACTIVO DE *V. schlotgera**

Metanólico:

Ya habiendo determinado cual fracción es la inhibitoria, se procedió a purificar el o los compuestos de la misma manera como ya se describió para *L. tridentata*.

Clorofórmico:

Para su purificación, se aislaron la o las bandas que presentaban inhibición, se resuspendieron en cloroformo, se centrifugaron y el sobrenadante se concentró para correr otra vez la muestra en una cromatografía en capa fina utilizando benceno como otro sistema de eluente, que ayudara a su purificación.

EXTRACCION DE SAPONINAS DEL EXTRACTO METANOLICO DE *V. schdtigera*

Para esta extracción se tomaron 5 mL del extracto y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min, el precipitado se desechó y se tomó el sobrenadante. En un embudo de separación se adicionaron 30 mL de n-butanol y 30 mL de agua destilada, y a esta mezcla se le agregaron los 5 mL del extracto. Se agitó vigorosamente por 1 min y se dejó reposar 5 min. La fracción butanólica (superior) era la que contenía saponinas (Headon *et al*, 1992).

Se probó la actividad antifúngica de la fracción acuosa (glicofracciones) y la fracción butanólica (saponinas), como se mencionó anteriormente.

ANALISIS ESPECTROSCOPICO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

*DE *C. tridentata* Y *V. schdtigera**

ESPECTROMETRIA DE LUZ UV

Para este análisis, se utilizaron celdas de cuarzo, en las que se adicionaron 3 mL de la solución. Se determinaron los picos de absorbancia del solvente utilizado; para el caso de metanol, la absorbancia máxima es de 177 nm y la absorbancia molar ϵ es de 200. Ya obtenidos los picos máximos de absorbancia, se procedió al análisis de las gráficas (Silverstein *et al*, 1991).

ESPECTROMETRIA INFRARROJA

Una muestra líquida se presionó en dos placas de sal, produciendo una película de 0.01 mm de grosor o menos. Se requirieron 10 mg de la muestra. Las muestras más delgadas absorben mayormente y tienen un espectro satisfactorio.

Las muestras en solución fueron colocadas en celdas de 0.1 a 1 mm de grosor, y el volumen colocado fue de 0.1 a 1 mL de la solución al 0.05 al 10%. Para este análisis se debió tener una celda con solvente puro para usarlo de referencia. A la gráfica obtenida se le restaron los picos del solvente, el solvente debió estar seco y transparente.

Se analizaron los resultados de la gráfica (Silverstein *et al*, 1991).

RESULTADOS

EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Se probaron los diferentes extractos de las plantas que fueron colectadas en campo. No se encontraron diferencias entre las cepas en cuanto a la ausencia o presencia de inhibición. Se encontró que los extractos con propiedades antifúngicas fueron los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Y. schidigera* y el clorofórmico y metanólico de *L. tridentata* (Tabla 2).

Para resuspender los extractos que mostraron inhibición, se analizaron varios solventes, tomando en cuenta la toxicidad, su miscibilidad en agua y en cloroformo, y la resuspensión del extracto. Los resultados se muestran en la tabla 3, encontrando que la acetona resultó el solvente más efectivo para la resuspensión y análisis de los extractos clorofórmicos, mientras que para los extractos metanólicos fue efectivo en el mismo solvente y el agua.

Planta	Parte	EP	Cif	Me	Et	Aq
<i>Opuntia leptocadis</i> DC	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Leucophyllum frutescens</i> L.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
	tallo	NI	NI	NI	NI	NI
	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
	tallo	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Agave lechuguilla</i> Torr.	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
	raiz	NI	NI	NI	NI	NI
	brote	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Jatropha dioica</i> (HBK) Mac Vaugh	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
	tallo	NI	NI	NI	NI	NI
	raiz	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Opuntia</i> sp.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Asphodelus fistulosus</i> L.	raiz	NI	NI	NI	NI	NI
	tallo	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Yucca filifera</i> Khab.	tallo	NI	NI	NI	NI	NI
	corteza	NI	NI	NI	NI	NI
	raiz	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Larrea tridentata</i> Cov.	toda	NI	+	+	NI	NI
<i>Baccharis glutinosa</i> Pers.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Quillaia saponaria</i> L.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Lantana involucreta</i> L.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Berberis trifoliata</i> Moric.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Euphorbia maculata</i> L.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Eugenia aromatica</i> Baill	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Prosopis julifolia</i> Swartz	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Litsea glaucescens</i> HBK	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Cinnamomun zelynicum</i> Neers	tallo	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Organum vulgare</i> L.	hoja	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Helietta parvifolia</i> (Gray) Benth	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Yucca schidigera</i> Link ex Fries	tallo	NI	++	++	++	++
<i>Ocinum micranthum</i> Willd	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Ruta graveolens</i> L.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Salvia mexicana</i> L.	toda	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Capsicum annuom</i> L. var <i>grossum</i>	fruto	NI	NI	NI	NI	NI
<i>C. annuom</i> L. var <i>ceraciforme</i>	fruto	NI	NI	NI	NI	NI
<i>C. annuom</i> L. var <i>grossum</i>	fruto	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: NI = No inhibición + = No crecimiento en disco ++ = Halo de inhibición

Tabla 2 Extractos de las diferentes plantas con actividad antifúngica

Solventes	Tox.	Mis./Agua	Mis./Clf	Resuspensión
Glicerol	-	+++	-	-
Tween 20	++	+++	+++	-
DMSO	++	+++	+++	++
Etilenglicol	-	+++	-	-
Acetona	+	+++	+++	+++

Nota: - Nulo + Poco ++ Moderado +++ Abundante

Tabla 3 Misibilidad y toxicidad de solventes

Todos los extractos analizados de *Y. schidigera* y *L. tridentata* fueron capaces de inhibir el crecimiento de las diferentes cepas de *Aspergillus*. El efecto de los diferentes extractos de *Y. schidigera* fue variado, ya que los extractos metanólicos presentaron una inhibición de la esporulación, la cual fue determinada visualmente, con aproximadamente el 50% de la CMI encontrada para cada extracto, y el micelio tuvo un crecimiento aéreo de manera algodonosa. Un efecto similar se encontró también con el extracto acuoso, sin embargo, el extracto clorofórmico no inhibió la esporulación. También se observó una disminución drástica de aproximadamente el 60% de crecimiento radial al aplicar un 10% de la CMI de extracto metanólico. El efecto del extracto clorofórmico fue similar, aunque la disminución de crecimiento a concentraciones menores fue un poco más bajo, siendo de aproximadamente un 40-50% con un 20% de la CMI. En la tabla 4 se muestra el resumen de las concentraciones mínimas de cada extracto que inhibieron el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en el medio PDA.

El decremento del crecimiento fue gradual, pero no proporcional, conforme se aplicaban mayores concentraciones de cada extracto, este comportamiento se pudo observar con todas las cepas (Figs 1-24).

El efecto de los extractos de *L. tridentata*, sobre las características coloniales fue muy diferente al de *Y. schidigera*, ya que en este caso la esporulación no se inhibió, y el crecimiento micelial fue plano, no aéreo y escaso (Figs 31-32). En cuanto a los extractos, éstos mostraron una inhibición muy drástica en el crecimiento radial siendo que, cuando se aplicaba un 10% de la CMI, resultaba con una inhibición aproximada del 90% en ambos extractos (Figs. 25-30).

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las cepas de las dos especies realizando un ANOVA, pero si encontramos diferencias ($p < 0.01$) entre los extractos. Al aplicar el método no paramétrico de TUKEY, nos mostró grupos homogéneos uno de ellos con los extractos metanólicos de *Y. schidigera*, otro con el extracto acuoso y el clorofórmico de esta misma planta y un grupo más con los dos extractos de *L. tridentata*.

Los extractos de *L. tridentata* presentaron un efecto inhibitorio del crecimiento con menores concentraciones que los extractos de *Y. schidigera*, siendo más efectivo el extracto clorofórmico en ambas plantas.

La inhibición causada por el efecto de los extractos fue mayor en la cepa 1273 de *A. flavus*, ya que las CMI fueron menores. Siendo las más resistentes las cepas de *A. parasiticus*.

CMI (mg/mL)					
Extractos	Af 1059	Af 1273	Af 1299	Ap Su-1	Ap 148
YsMe	86±4	84±5	80±4	125±3	130±6
YsMe-Aq	91±3	88±3	85±2	120±5	115±4
YsClf-Ace	27±1	21±2	22±1	28±2	25±2
YsAq	59±3	59±4	50±4	57±3	55±4
GobMe	13±1	13±2	8±2	13±1	16±1
GobClf-Ace	7±1	15±2	7±1	9±2	13±3

Tabla 4 Concentración mínima de extractos de *Y. schidigera* y *L. tridentata* que inhiben el crecimiento de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio PDA. (Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona).

Como puede observarse en la tabla 4, los extractos de *L. tridentata* fueron más efectivos para inhibir ambas especies en el medio PDA que los de *Y. schidigera*.

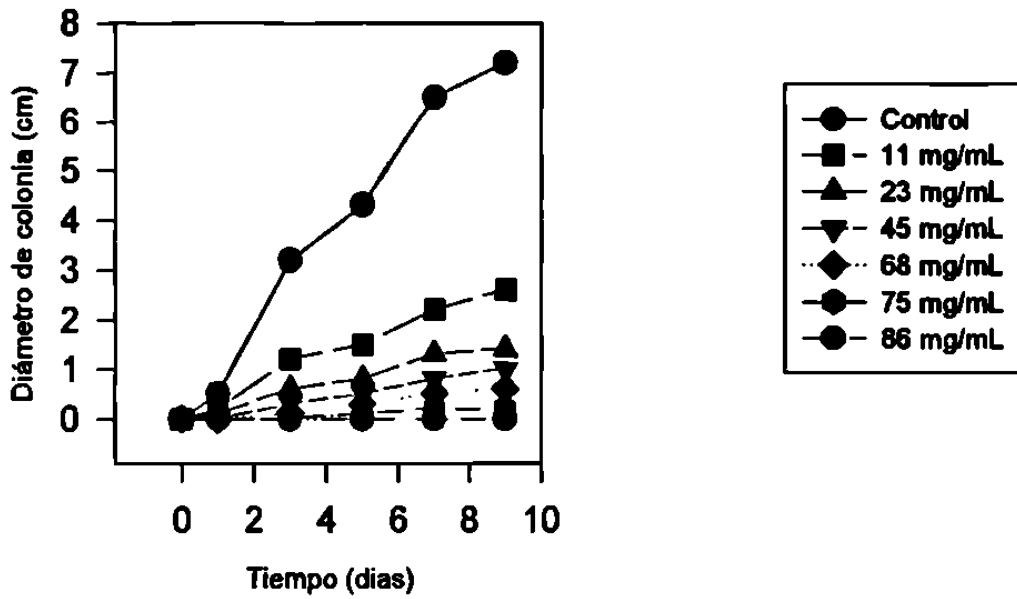


Fig. 1 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1059 en medio PDA

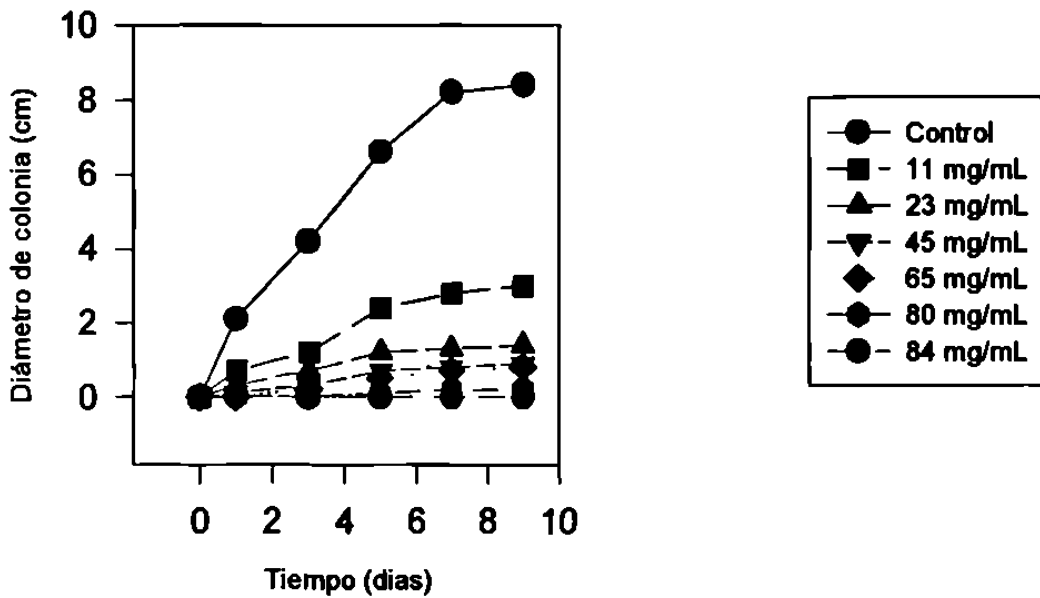


Fig. 2 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1273 en medio PDA

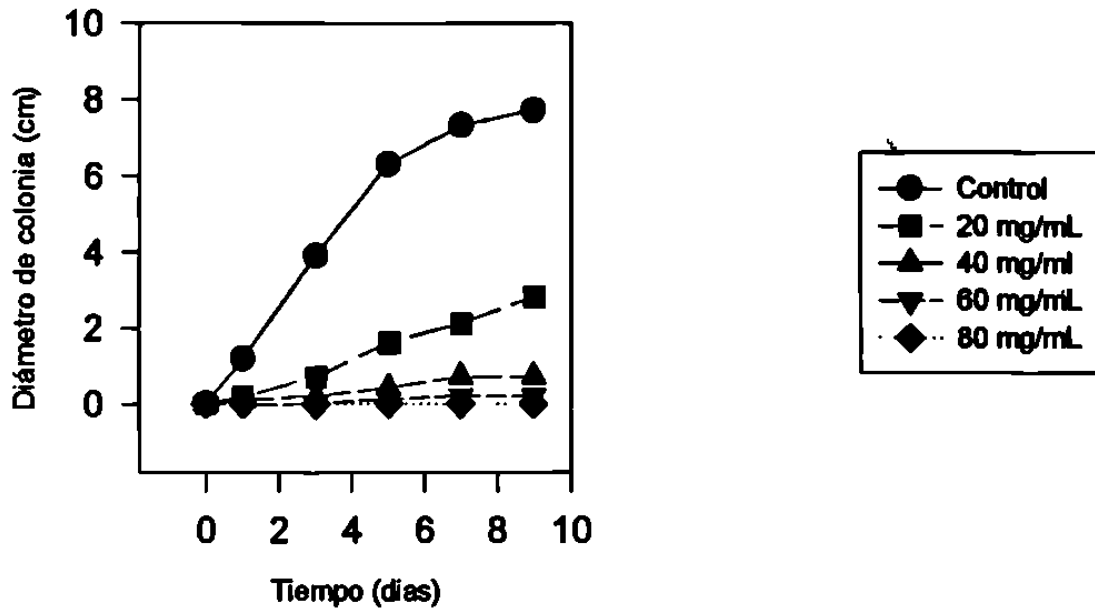


Fig. 3 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1299 en medio PDA

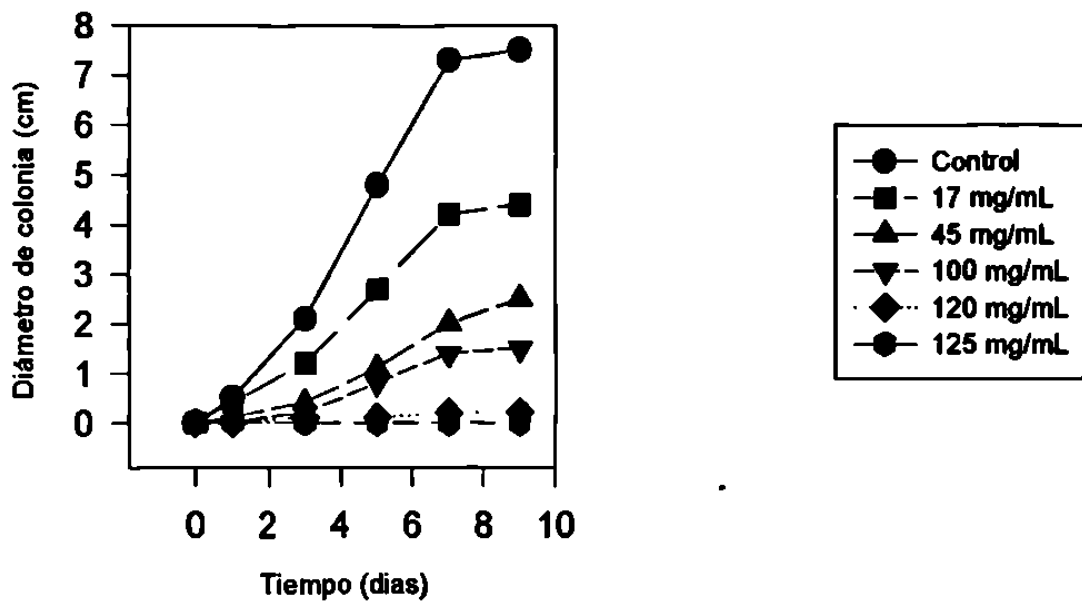


Fig. 4 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio PDA

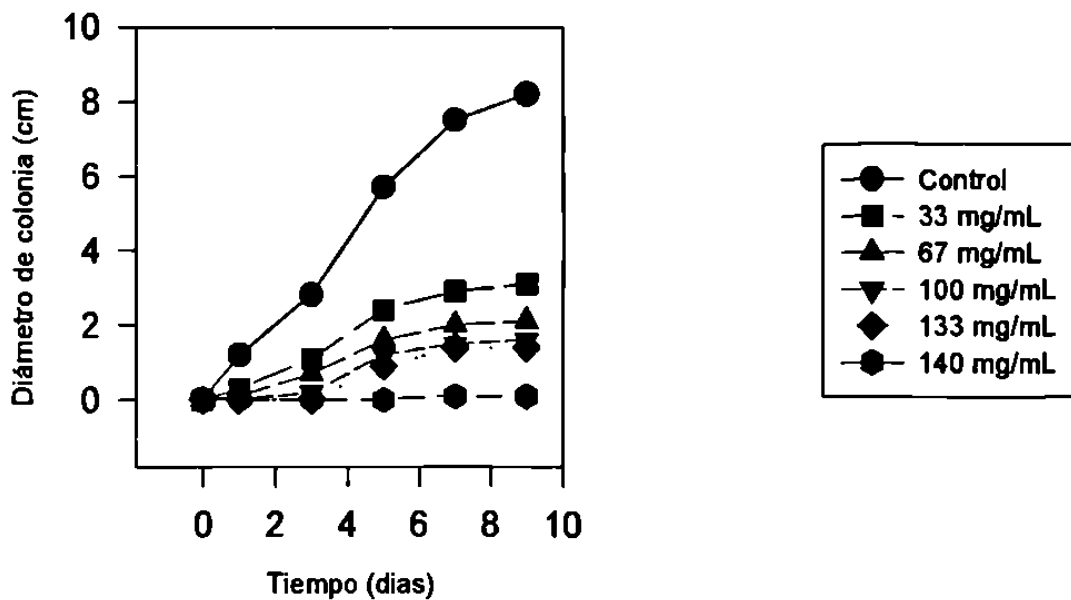


Fig. 5 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa 148 en medio PDA

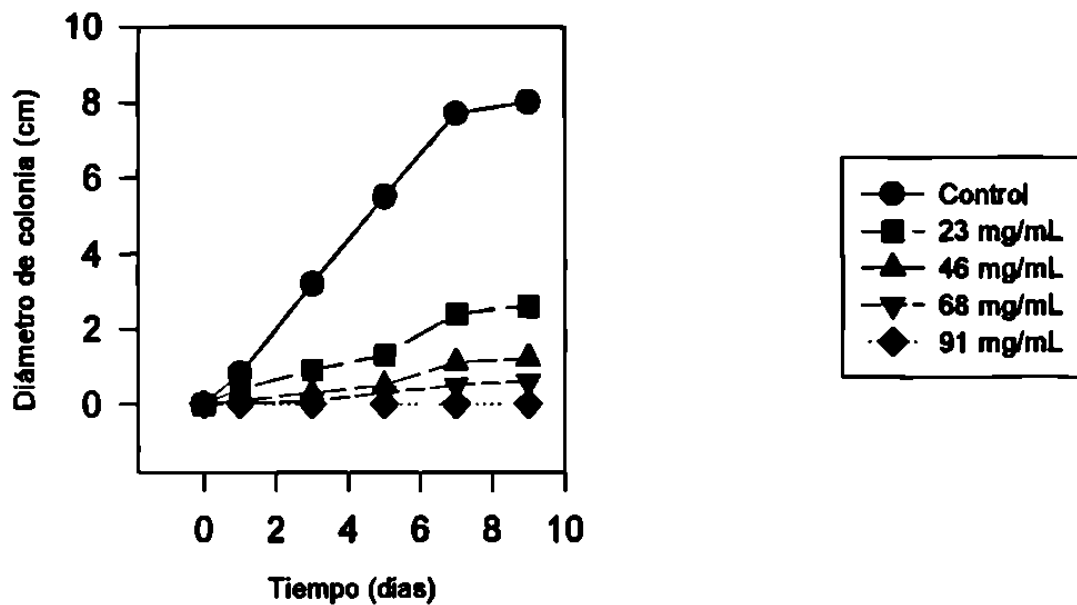


Fig. 6 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1059 en medio PDA

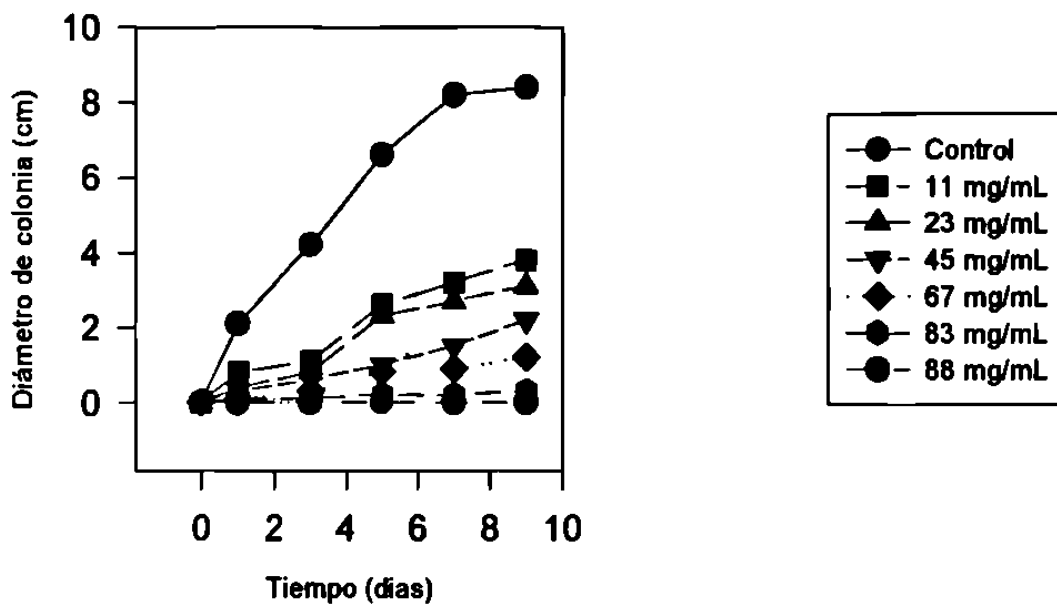


Fig. 7 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1273 en medio PDA

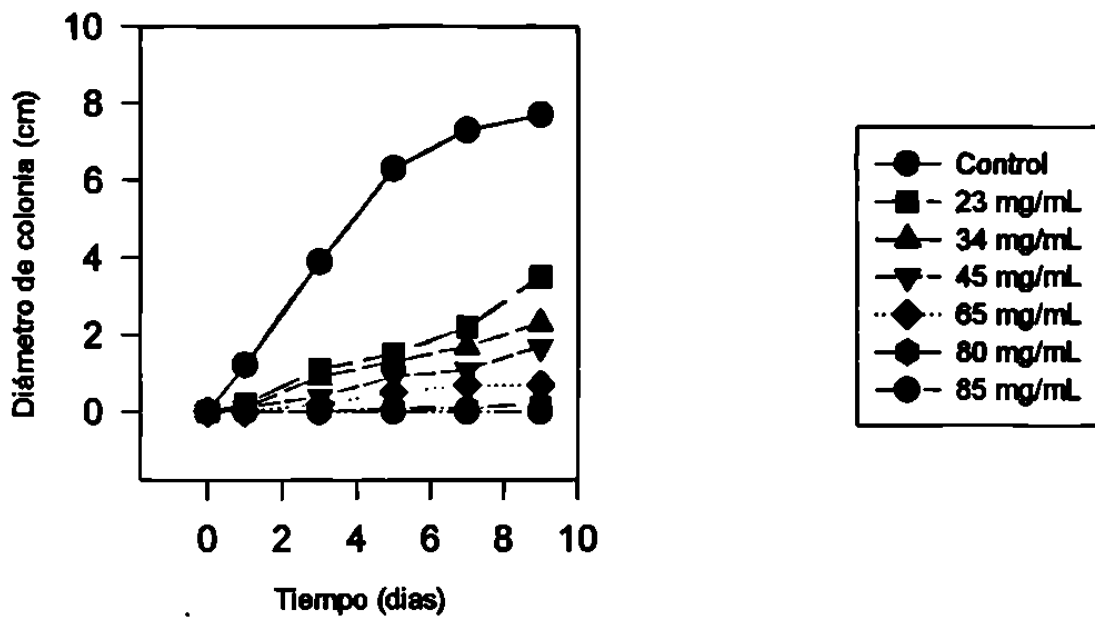


Fig. 8 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1299 en medio PDA

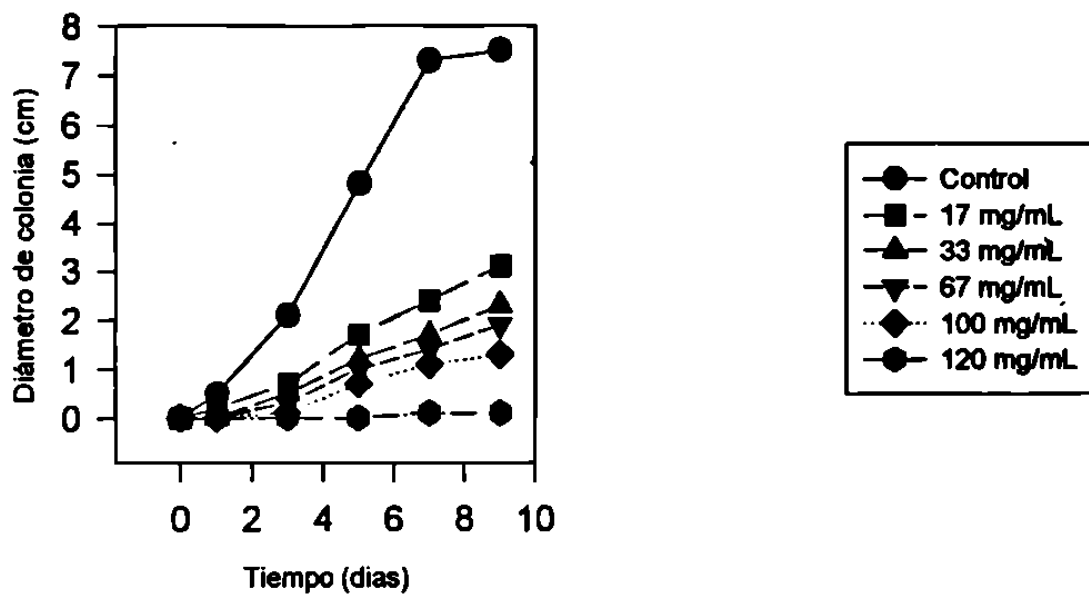


Fig. 8 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio PDA

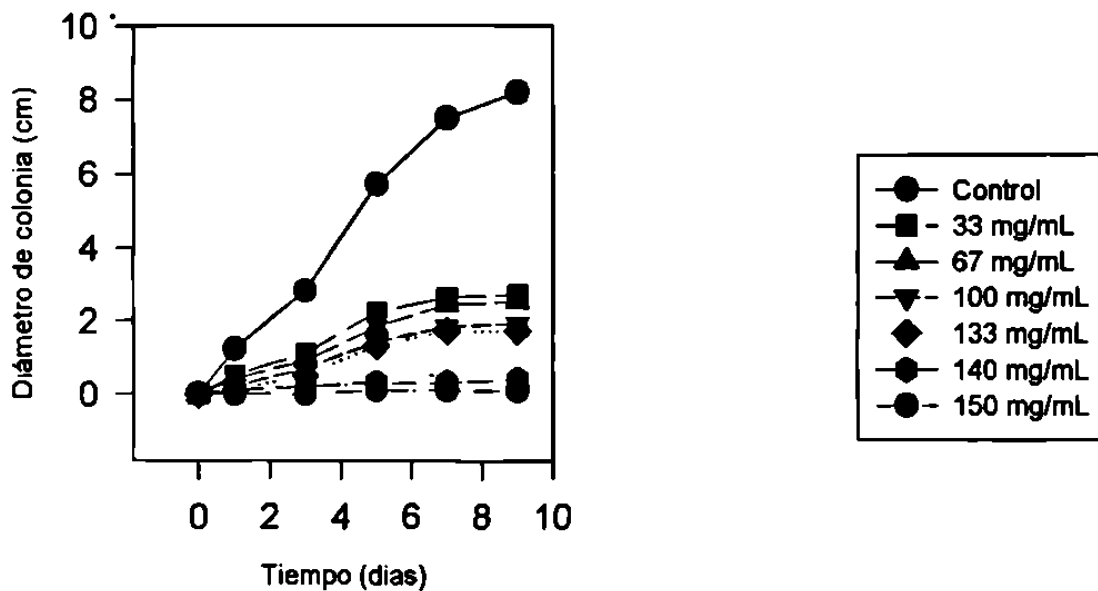


Fig. 10 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa 148 en medio PDA

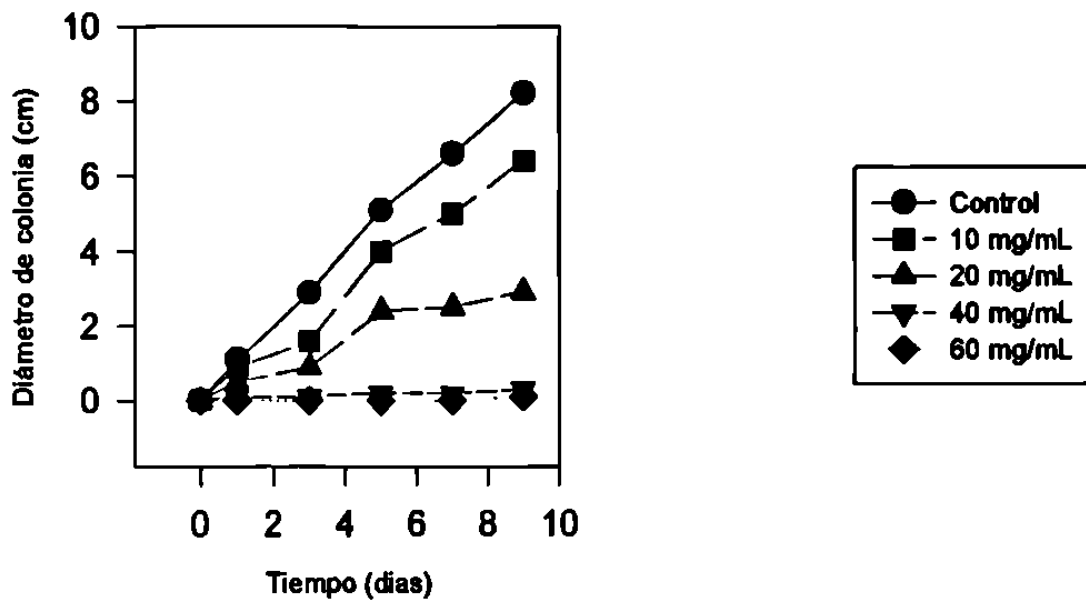


Fig. 11 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1059 en medio PDA

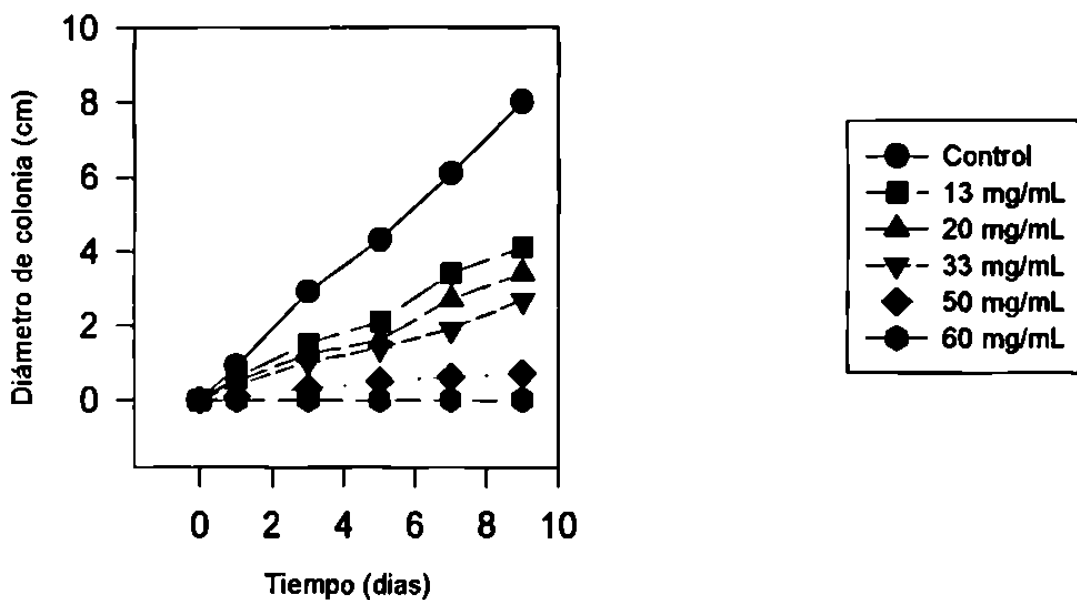


Fig. 12 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1273 en medio PDA

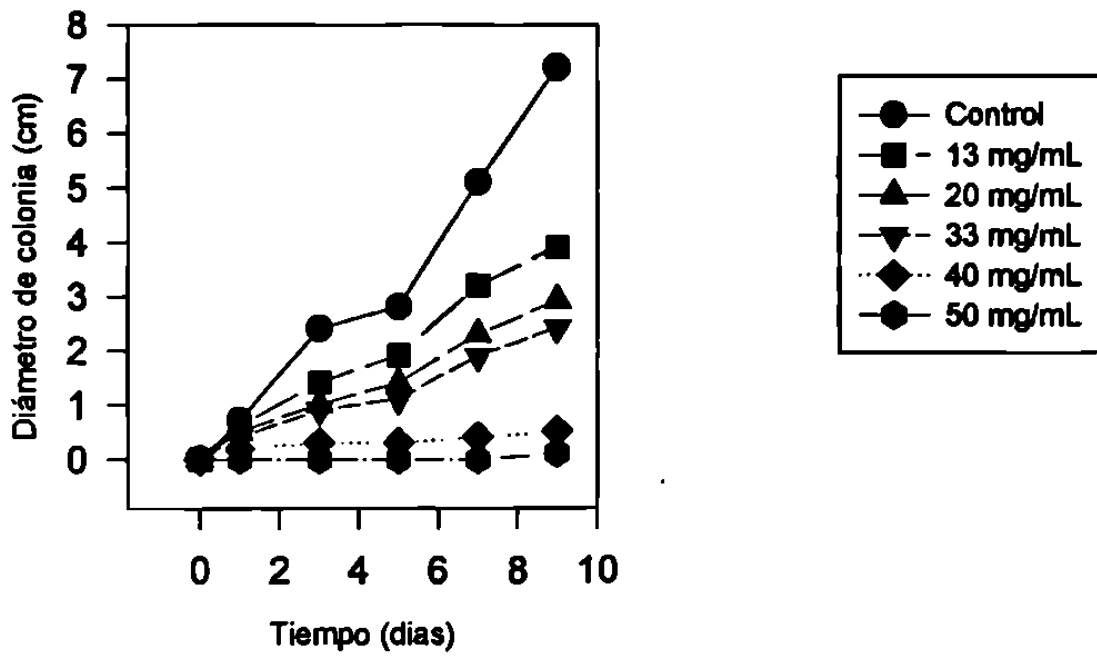


Fig. 13 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1299 en medio PDA

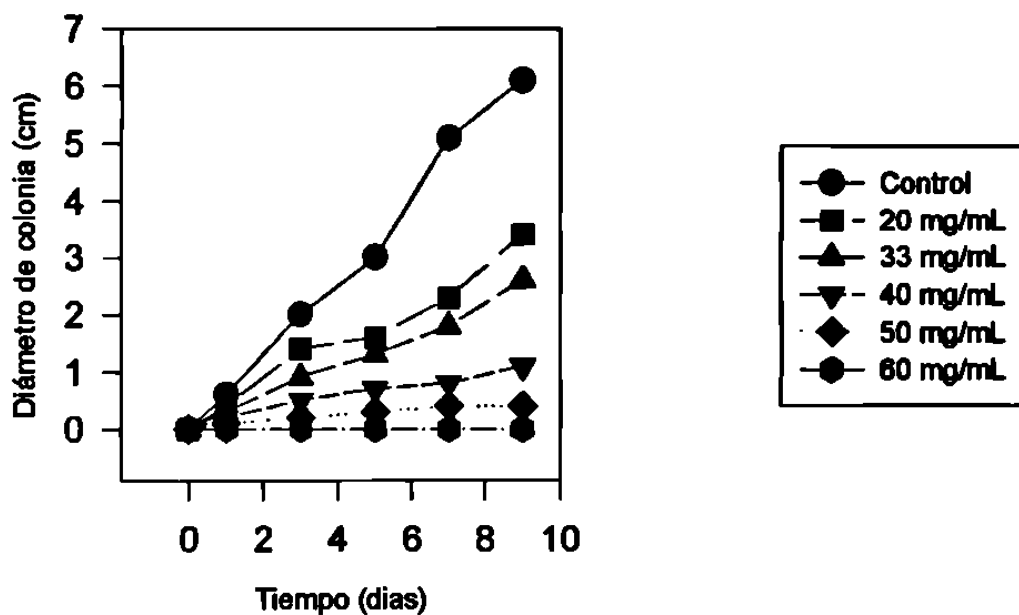


Fig. 14 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio PDA

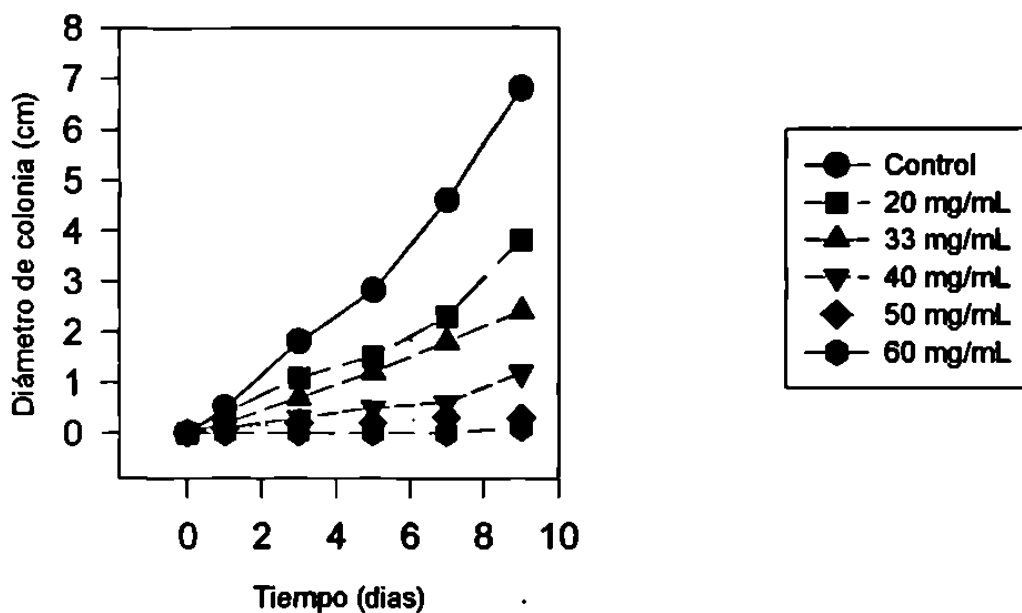


Fig. 15 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa 148 en medio PDA

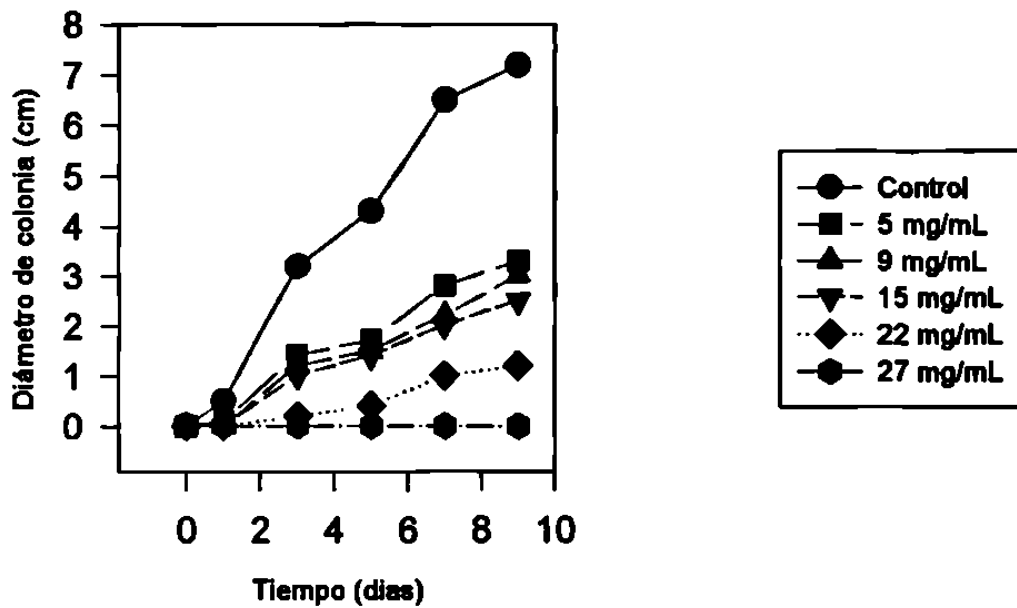


Fig. 16 Efecto del extracto cloroformico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1059 en medio PDA

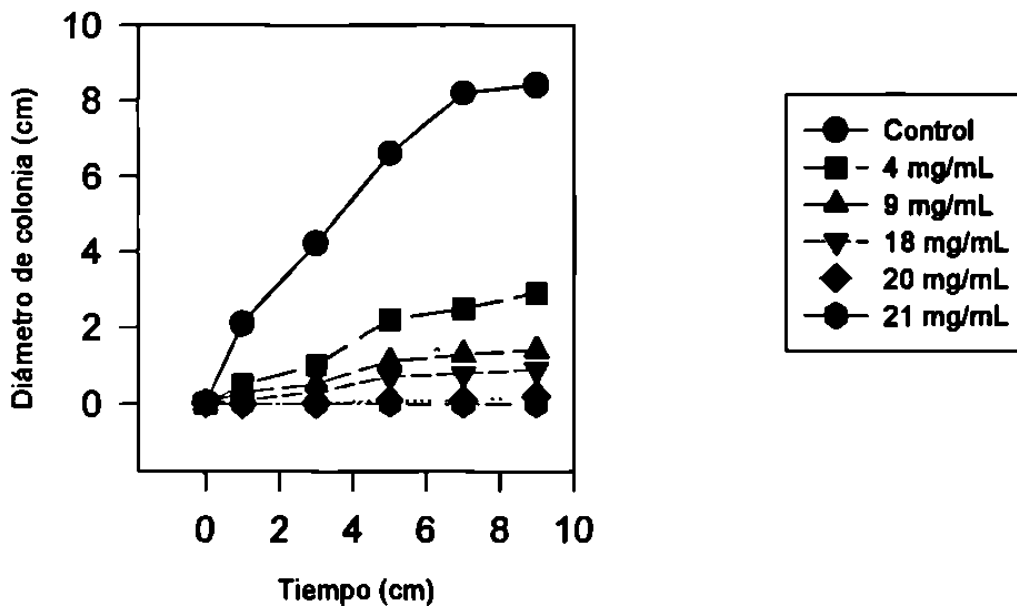


Fig. 17 Efecto del extracto cloroformico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1273 en medio PDA

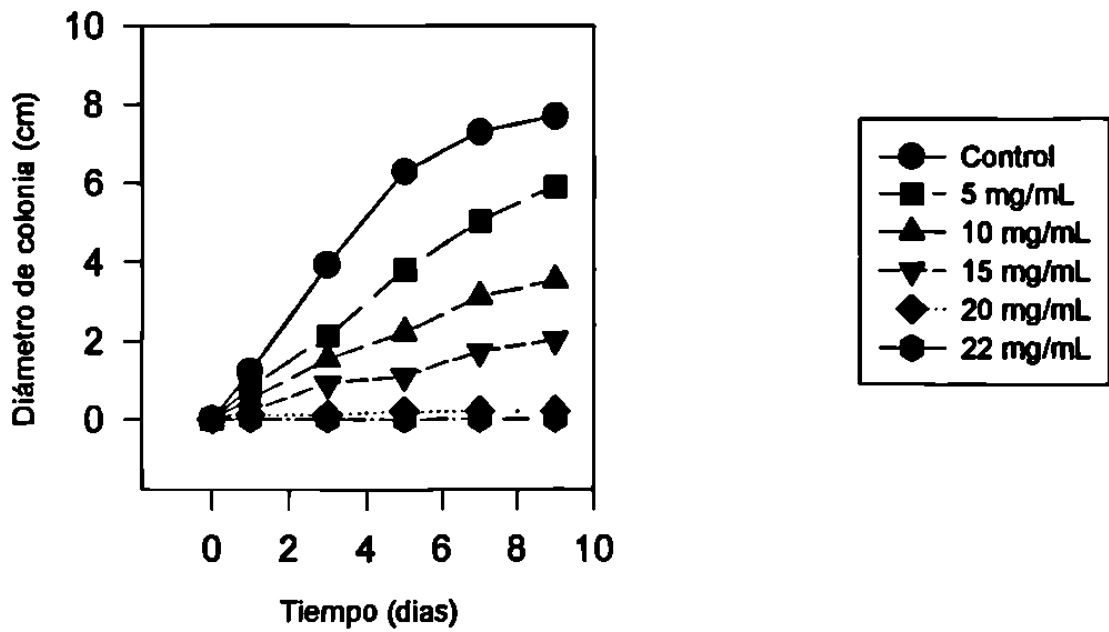


Fig. 18 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1299 medio PDA

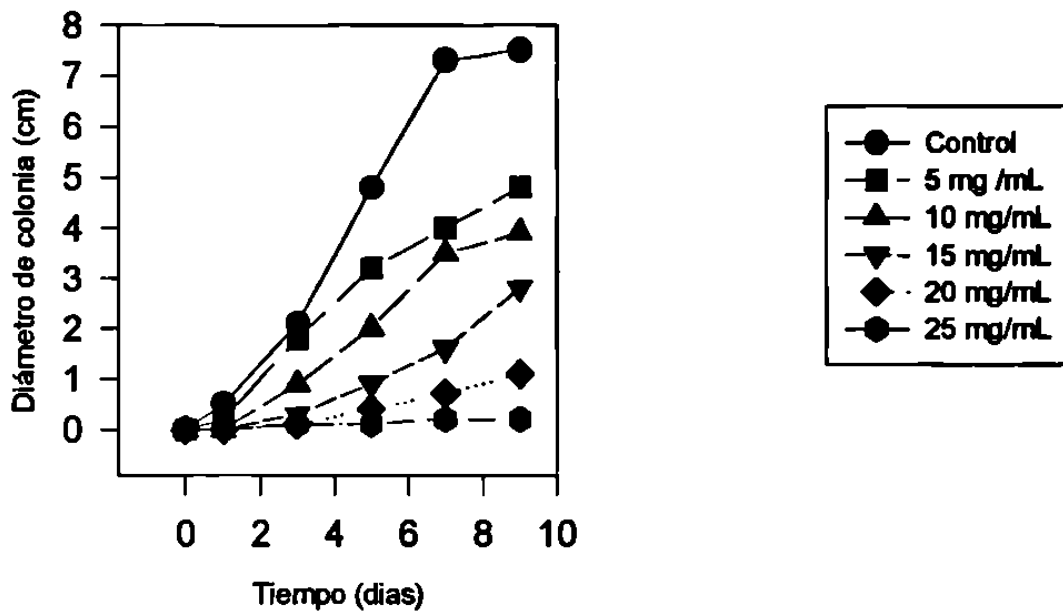


Fig. 19 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio PDA

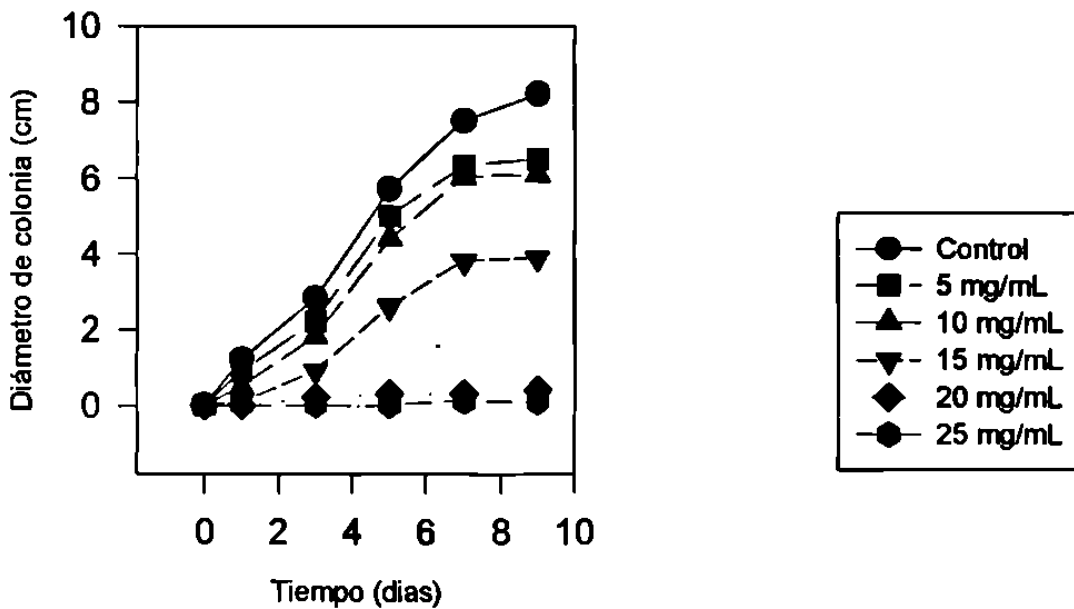


Fig. 20 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa 148 en medio PDA

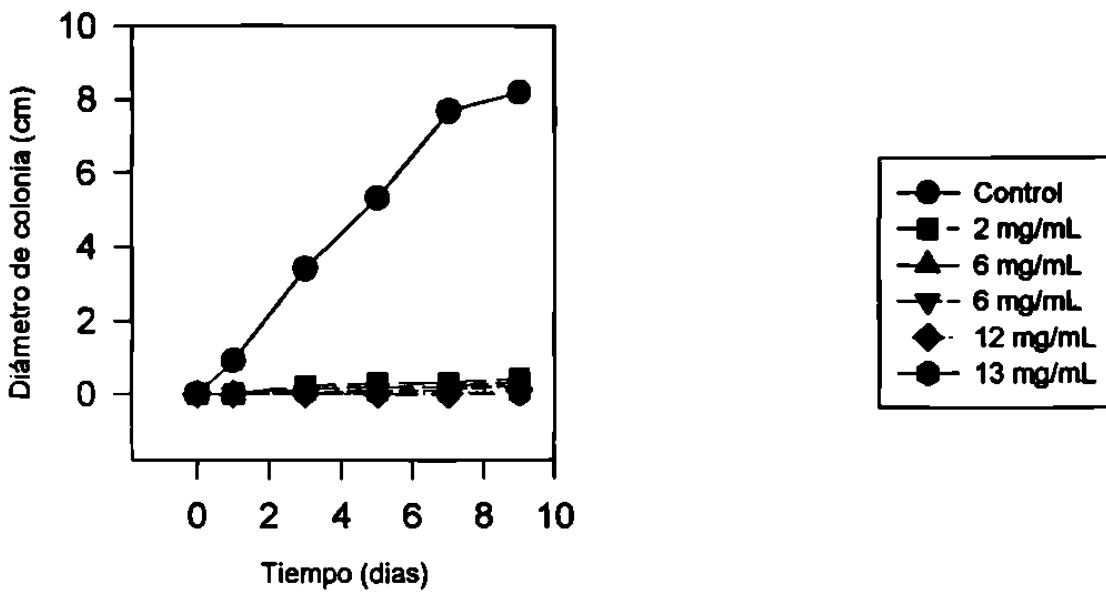


Fig. 21 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1059 en medio PDA

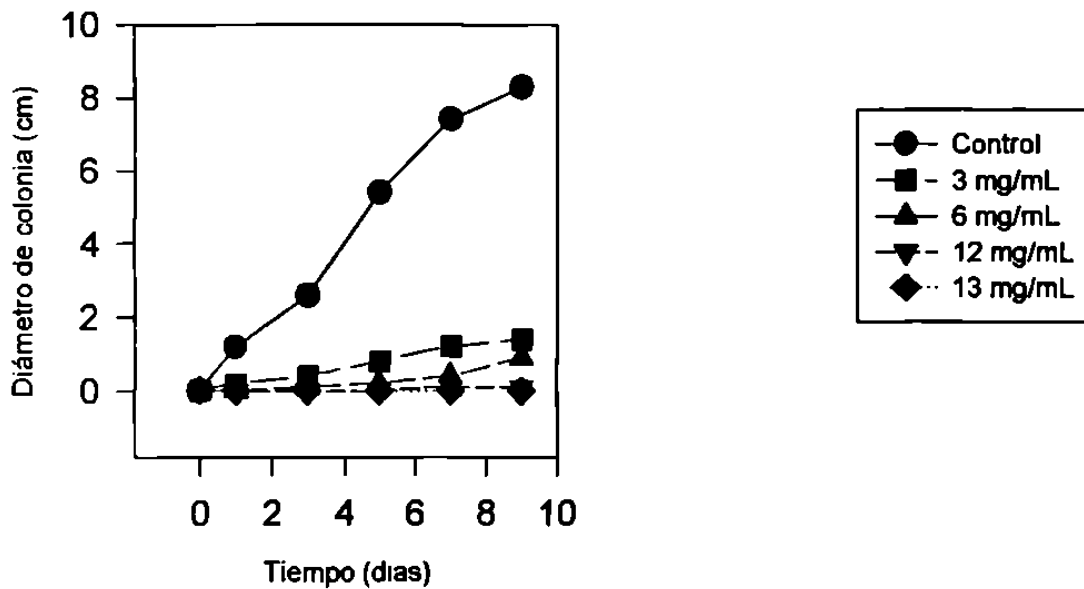


Fig. 22 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1273 medio PDA

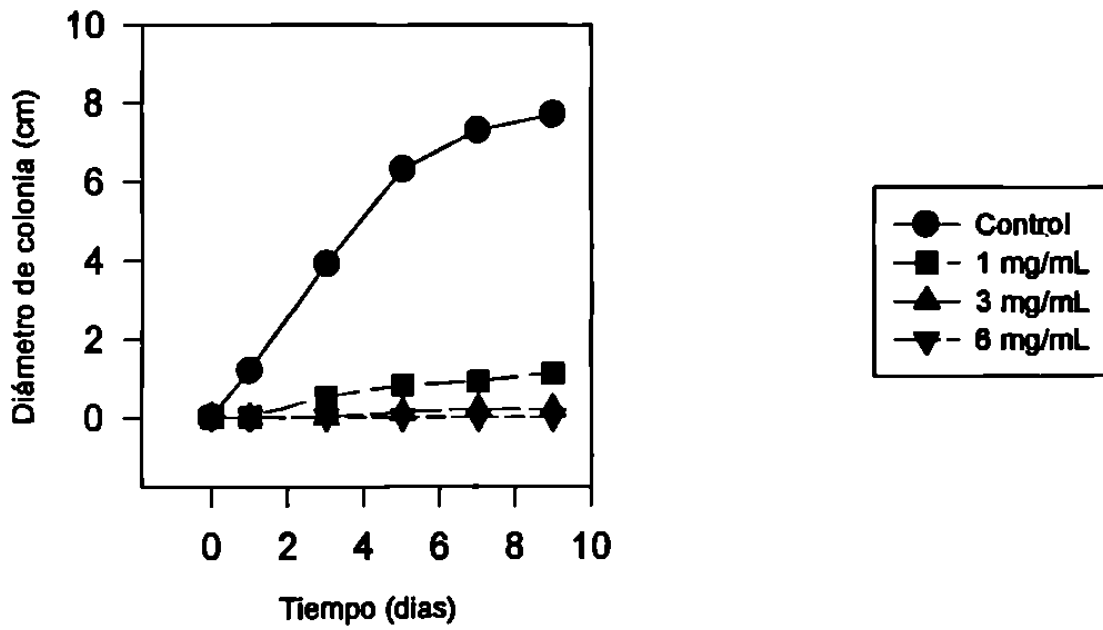


Fig. 23 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1299 en medio PDA

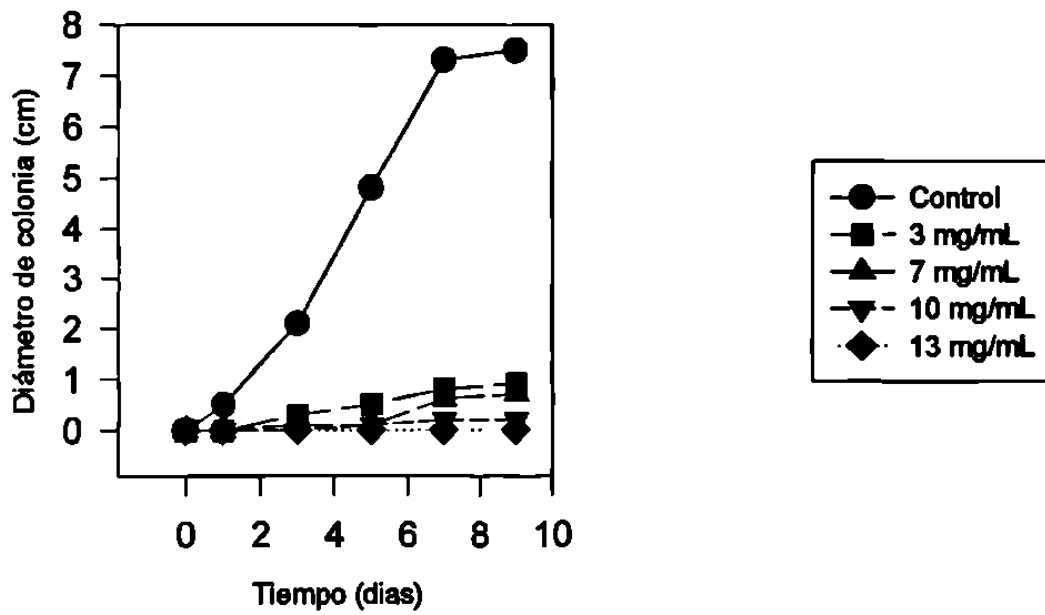


Fig. 24 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio PDA

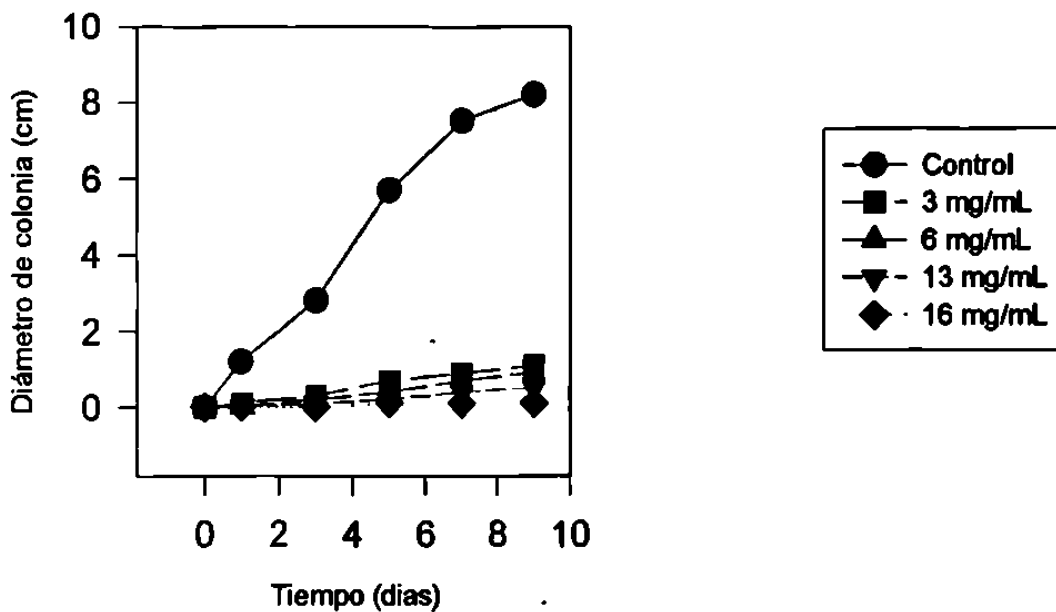


Fig. 25 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa 148 en medio PDA

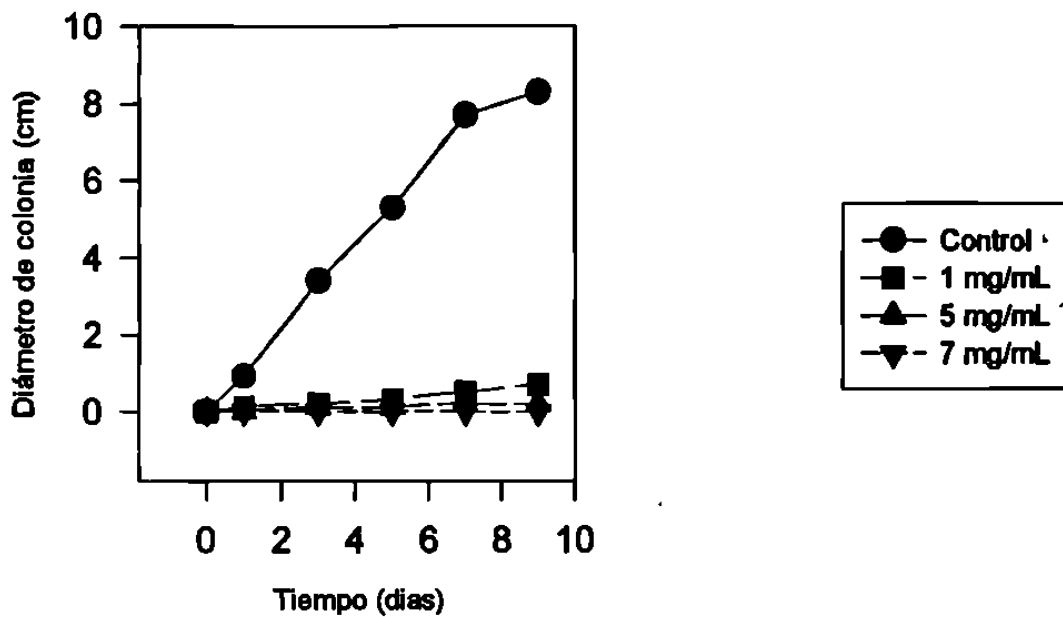


Fig. 26 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1059 en medio PDA

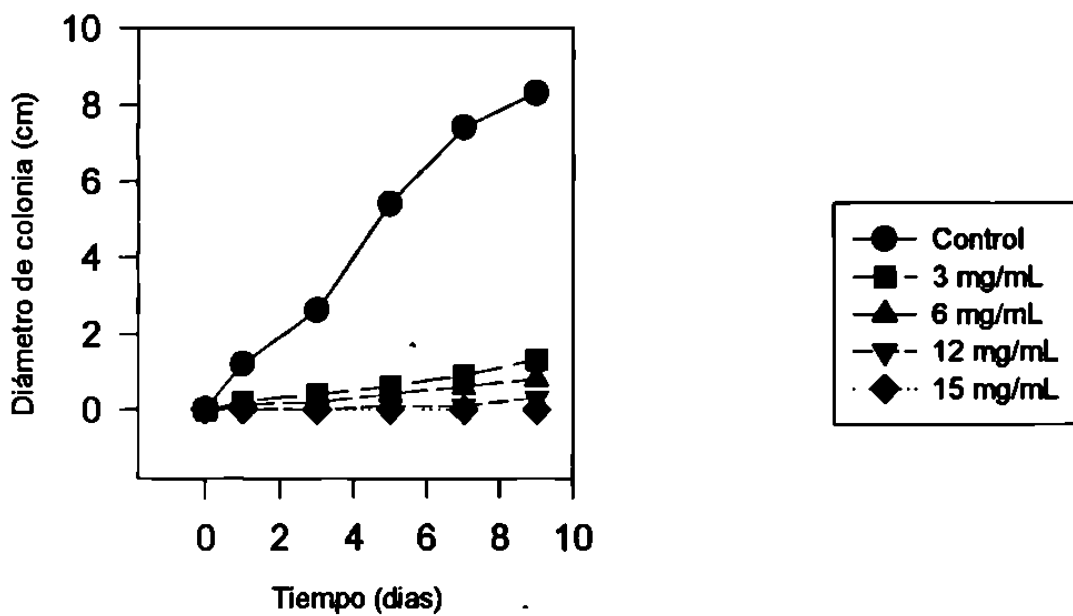


Fig. 27 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1273 medio PDA

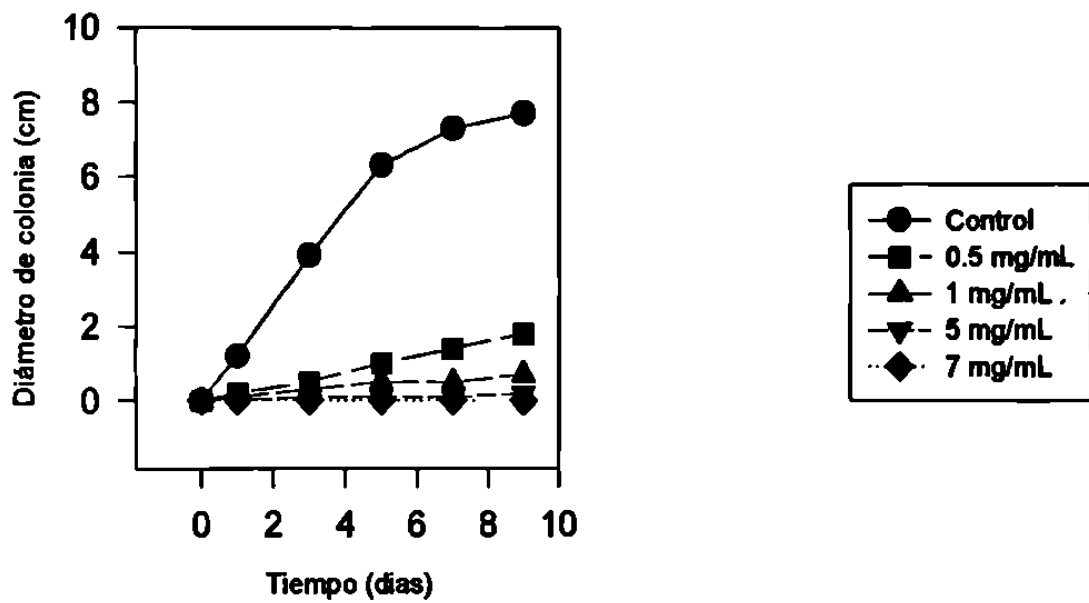


Fig. 28 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. flavus* cepa 1299 en medio PDA

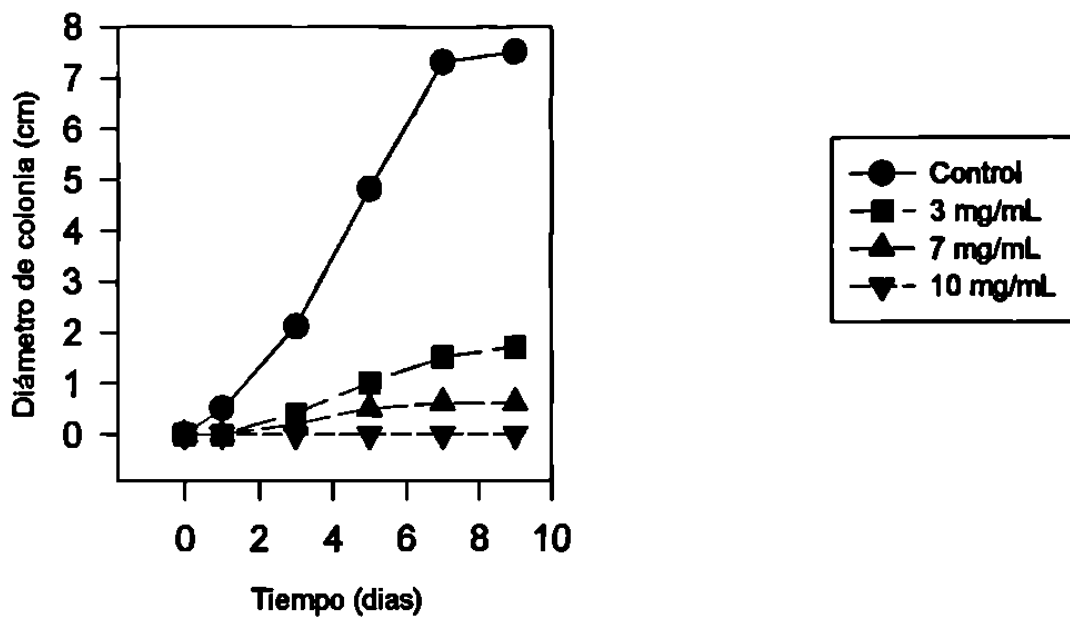


Fig. 29 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio PDA

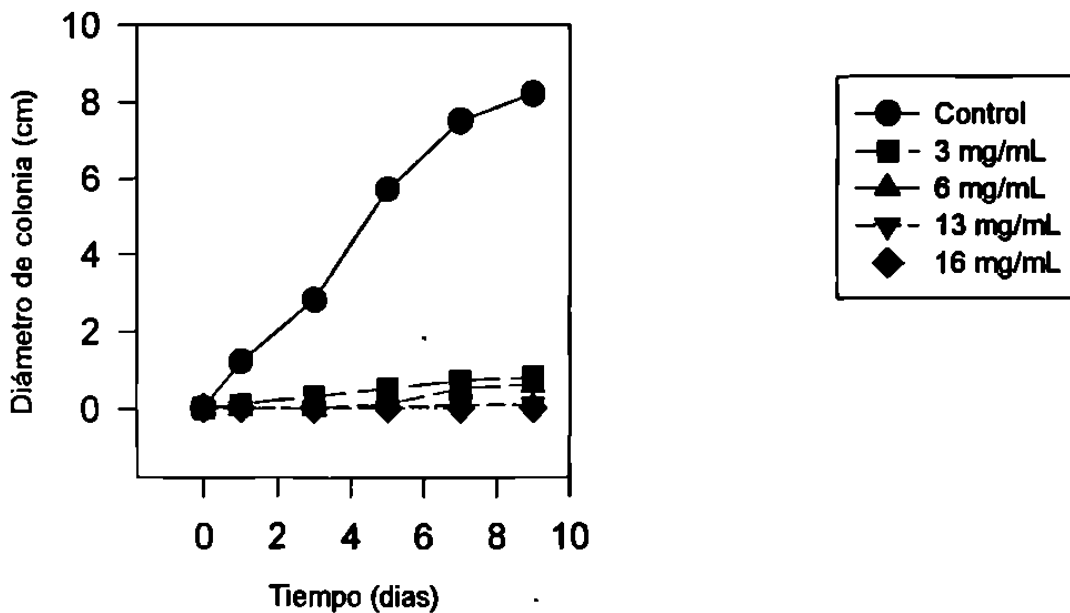


Fig. 30 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento radial de *A. parasiticus* cepa 148 en medio PDA

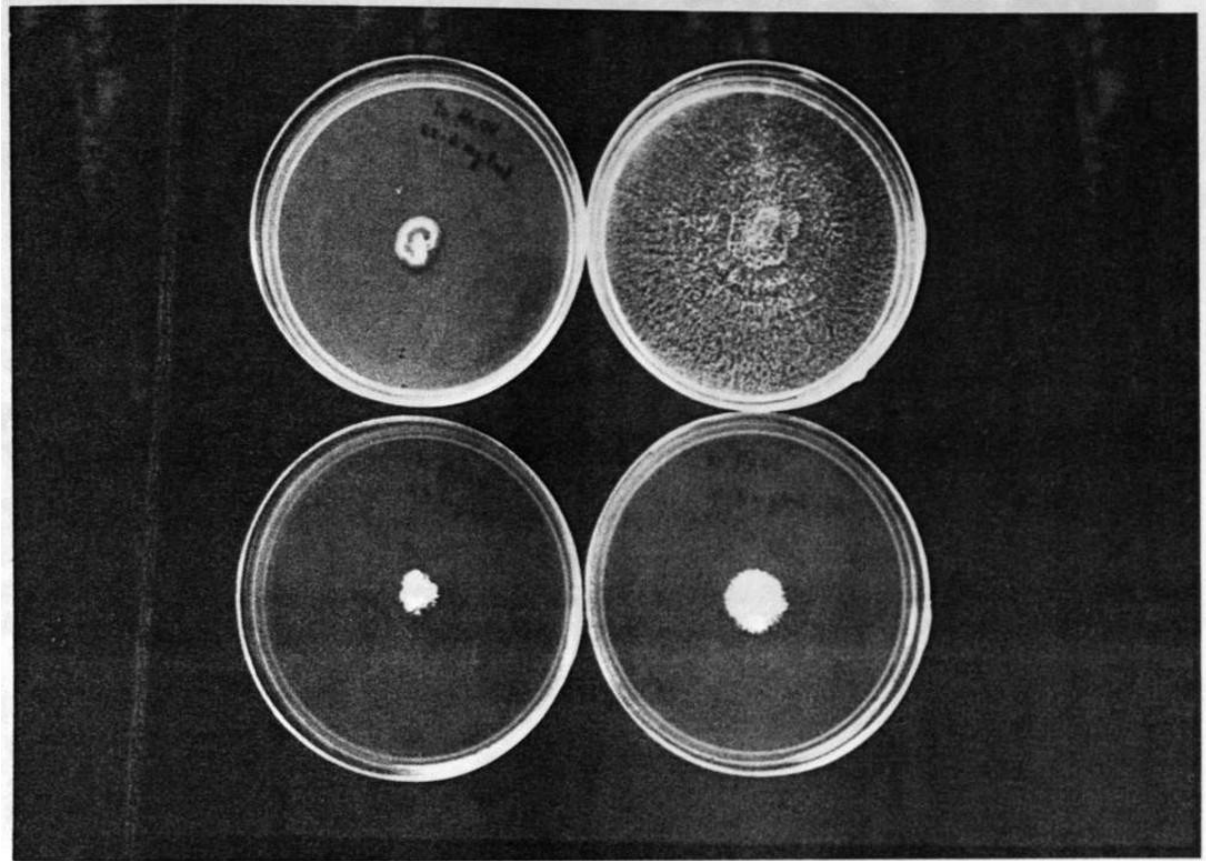


Fig. 31 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento de *A. flavus* en medio PDA

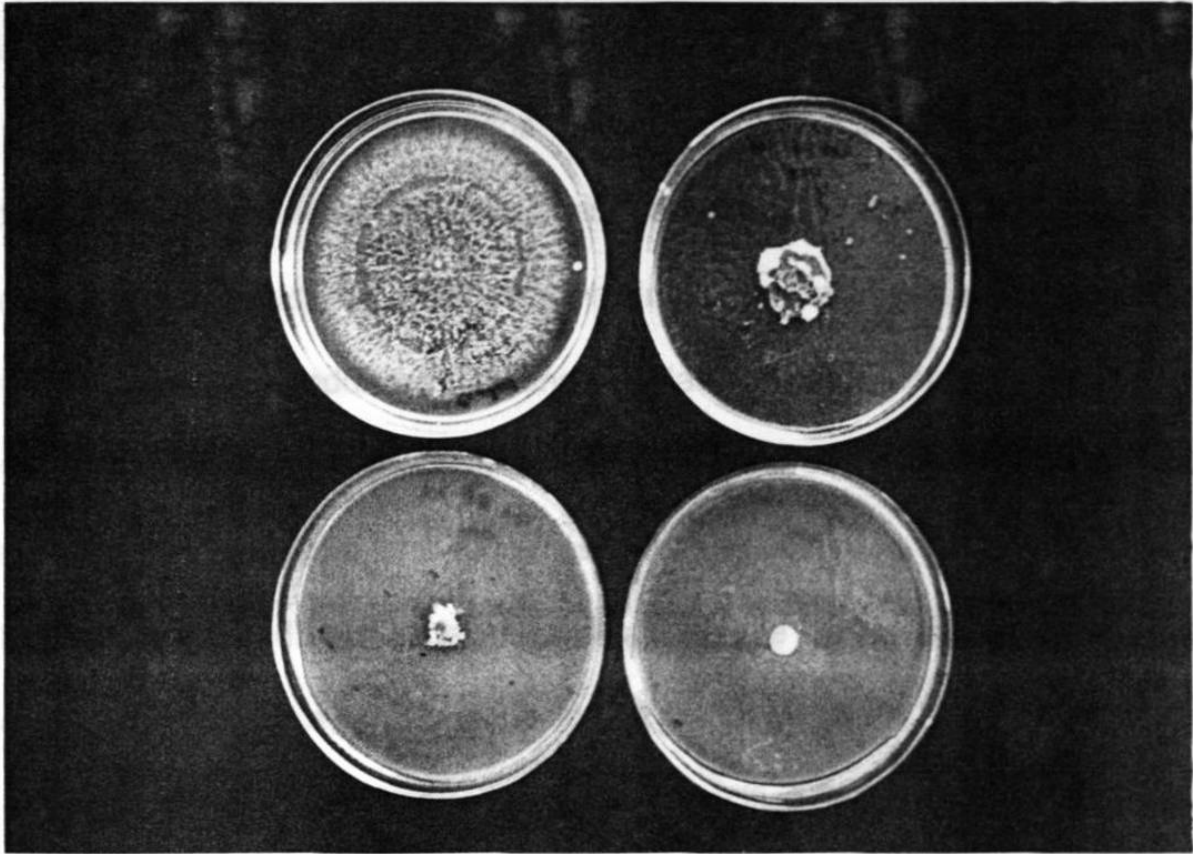


Fig 32 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* en medio PDA

INHIBICION DEL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN MEDIO LIQUIDO

Para este análisis se determinó el peso seco del hongo, la cantidad de aflatoxinas y la producción específica.

Todos los extractos analizados fueron capaces de inhibir el crecimiento y la producción de aflatoxinas. Aproximadamente con un 50% de la CMI de los extractos metanólicos de *Y. schidigera* fue posible inhibir la esporulación, mientras que el micelio mostró un aspecto algodonoso. El rango de las CMI se mantuvo entre 140 y 275 mg/mL según la cepa y el solvente utilizado para su resuspensión. El extracto clorofórmico tuvo un efecto inhibitorio más eficaz, ya que su rango de CMI varió de 12 a 14 mg/mL, comparado con el del extracto acuoso que fue de 85 a 92 mg/mL según la cepa utilizada en el ensayo. Con respecto a la producción de aflatoxinas, en el caso de los extractos metanólicos, la productividad específica de las cepas disminuyó un logaritmo desde la concentración menor utilizada. Con el extracto acuoso, tanto la producción de aflatoxinas totales como la productividad específica fue disminuyendo gradualmente conforme se aumentaba la concentración del extracto. Con respecto al extracto clorofórmico el comportamiento no fue generalizado, ya que la disminución fue gradual en algunas cepas y drástica en otras, más aún en una de ellas, la productividad específica se aumentó ligeramente a las concentraciones menores.

Los extractos de *Y. schidigera* presentaron una inhibición gradual del crecimiento al incrementar su concentración, en cambio la disminución de la producción de aflatoxinas fue drástica, observándose un cambio en la productividad específica de más de un logaritmo en las cepas 1059 y 1273 de *A. flavus* y la cepa

Su-1 de *A. parasiticus*. El crecimiento de *A. flavus* cepa 1299 y la cepa 148 de *A. parasiticus*, altamente productoras de aflatoxinas, se vió inhibido por estos extractos, pero en el caso del extracto resuspendido en agua, la producción de aflatoxinas fue estimulada y por ende la productividad específica también sufrió este mismo efecto (Fig 33-52).

En las tablas 5-8, se muestra que *A. parasiticus* cepa Su-1, al probarse con los extractos metanólicos de *Y. schidigera*, mostró una disminución tanto de crecimiento como de producción de aflatoxinas de manera gradual, por lo que la productividad específica disminuyó también de la misma manera (Fig 33-42).

El extracto acuoso de *Y. schidigera* (Tablas 9 y 10), mostró una inhibición de crecimiento de manera gradual, y la productividad específica en cambio, se vio disminuída en un logaritmo en las mínimas concentraciones utilizadas (17 mg/mL) en las cepas de *A. flavus*. El efecto de este extracto en las cepas de *A. parasiticus* fue notorio, ya que el crecimiento disminuyó gradualmente, no así la productividad específica, ya que ésta disminuyó dos unidades logarítmicas (Fig 43-47).

El extracto clorofórmico de esta planta, en general mostró una inhibición alta a concentraciones bajas (Tablas 11 y 12), teniendo una disminución de una unidad logarítmica con respecto a la productividad específica de aflatoxinas totales. Con la cepa 1273 de *A. flavus*, este extracto disminuyó el crecimiento de manera gradual, pero la producción de aflatoxinas se vió estimulada con las concentraciones de 2, 4 y 8 mg/mL, aumentando a su vez la productividad específica en un logaritmo con respecto al control (Fig 48-51).

Las cepas de ambas especies, al analizarlas con los extractos de *L. tridentata*, cambiaron su desarrollo colonial, presentándose un crecimiento fragmentado, sin desarrollo de micelio aéreo, formando una capa delgada y de consistencia no algodonosa, pero la esporulación no se vió afectada. La CMI del extracto metanólico estuvo en un rango de 25 a 50 mg/mL, sin embargo, el extracto clorofórmico resultó ser más efectivo necesitando sólo una concentración de alrededor de 15 mg/mL. Tomando en cuenta la producción de aflatoxinas y la productividad específica, los extractos no tuvieron un efecto bien definido, siendo que en algunas cepas, la disminución fue drástica en las concentraciones más bajas, pero en otras fue aumentada ligeramente con las concentraciones menores aunque después hubo una disminución de un logaritmo en la productividad específica. En la tabla 17 se muestran las CMI de cada extracto en medio líquido SMKY.

Con el extracto metanólico de *L. tridentata* (tablas 13 y 14), se mostró un decremento paulatino de crecimiento, de producción de aflatoxinas y productividad específica, en todas las cepas, excepto en la cepa 1273 de *A. flavus* en la que, aunque el crecimiento y la producción de aflatoxinas disminuyeron, la productividad específica se vio aumentada aproximadamente al doble (Fig. 53-57)

El clorofórmico de *L. tridentata* mostró un decremento de la productividad específica equivalente a un logaritmo (tablas 15 y 16), ya que la disminución de aflatoxinas fue mayor que el crecimiento. Excepto en la cepa 1273, en la que aunque el crecimiento y la producción de aflatoxinas disminuyeron, la productividad específica se vio aumentada aproximadamente al doble (Fig. 58-63).

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
1059	0	0.99± 0.1		68.58± 2.39		0.069
1059	8	0.79± 0.2	(19.5)	2.35± 0.02	(96.6)	0.003
1059	13	0.73± 0.2	(26.2)	1.57± 0.05	(97.7)	0.002
1059	17	0.47± 0.1	(52.3)	0.75± 0.03	(98.9)	0.001
1059	25	0.16± 0.01	(83.3)	0.85± 0.02	(98.8)	0.005
1273	0	1.49± 0.14		7.93±0.31		0.005
1273	20	1.02± 0.1	(31.5)	0.8±0.1	(89.9)	0.0008
1273	40	0.92± 0.1	(38.4)	0.47±0.08	(94.1)	0.0005
1273	60	0.76± 0.1	(49.1)	0.45±0.1	(94.4)	0.0006
1273	80	0.55± 0.1	(62.8)	0.4±0.1	(94.9)	0.0007
1273	85	0.11± 0.05	(92.5)	0.1±0.1	(98.7)	0.0007
1299	0	1.24±0.25		152.2±4.25		0.123
1299	33	0.82±0.1	(61.7)	72.6±1.8	(29.2)	0.088
1299	67	0.48±0.1	(39.0)	37.4±0.5	(47.8)	0.079
1299	100	0.46±0.1	(63.3)	25.8±0.4	(78.7)	0.055
1299	133	0.46±0.08	(97.0)	22.8±0.2	(89.9)	0.050
1299	150	0.12±0.05	(90.1)	7.21±0.1	(95.2)	0.058

Tabla 5 Efecto de diferentes concentraciones extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. flavus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
Su-1	0	1.19±0.2		154.15±3.96		0.129
Su-1	100	0.39±0.1	(67.7)	28.94±1.1	(81.2)	0.075
Su-1	133	0.35±0.1	(71.0)	19.21±0.7	(87.5)	0.055
Su-1	145	0.07±0.01	(94.1)	3.50±0.1	(97.7)	0.050
148	0	1.14±0.2		104.45±5.32		0.092
148	67	0.81±0.2	(28.3)	56.32±2.1	46.1)	0.069
148	100	0.76±0.2	(32.8)	31.05±1.3	(70.3)	0.041
148	130	0.42±0.1	(63.1)	17.45±0.7	(83.3)	0.041
148	140	0.09±0.01	(92.1)	3.05±0.3	(97.1)	0.033

Tabla 6 Efecto de diferentes concentraciones extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. parasiticus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
1059	0	1.18±0.2		45.1±0.95		0.038
1059	13	0.15±0.02	(87.2)	19.6±0.64	(67.6)	0.130
1059	25	0.11±0.02	(90.6)	4.07±0.05	(90.9)	0.037
1059	38	0.11±0.01	(90.9)	4.02±0.05	(91.0)	0.037
1059	51	0.09±0.01	(91.9)	2.83±0.01	(93.7)	0.029
1273	0	1.49±0.14		7.93±0.31		0.005
1273	20	0.76±0.2	(49.1)	0.45±0.1	(94.3)	0.0006
1273	40	0.54±0.2	(63.4)	0.42±0.05	(94.7)	0.0007
1273	60	0.46±0.1	(69.2)	0.40±0.1	(94.9)	0.0008
1273	80	0.34±0.05	(77.2)	0.27±0.1	(96.6)	0.0007
1273	85	0.21±0.02	(85.9)	0.09±0.02	(98.9)	0.0004
1299	0	1.24±0.2		152.2±4.12		0.123
1299	67	0.81±0.2	(34.3)	107.8±2.36	(29.2)	0.132
1299	100	0.62±0.1	(49.8)	79.40±2.15	(47.8)	0.128
1299	133	0.62±0.1	(30.3)	32.37±1.48	(78.7)	0.052
1299	167	0.32±0.05	(74.4)	12.81±0.82	(91.6)	0.040
1299	233	0.09±0.01	(92.7)	2.23±0.01	(98.5)	0.024

Tabla 7 Efecto de diferentes concentraciones extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. flavus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
Su-1	0	1.19±0.3		154.15±4.0		0.129
Su-1	100	0.58±0.1	(51.2)	45.89±1.3	(70.2)	0.078
Su-1	133	0.56±0.1	(53.1)	30.14±1.0	(80.4)	0.054
Su-1	180	0.39±0.2	(66.7)	22.82±0.8	(85.2)	0.057
Su-1	225	0.11±0.03	(90.5)	7.41±0.1	(95.2)	0.065
Su-1	275	0.04±0.01	(96.7)	4.23±0.1	(97.2)	0.031
148	0	1.14±0.3		30.87±2.87		0.027
148	100	1.32±0.3	(15.7*)	56.32±3.12	(82.44*)	0.093
148	133	1.15±0.2	(1.3*)	15.90±1.23	(48.5)	0.014
148	175	0.97±0.2	(14.7)	12.70±1.02	(58.8)	0.015
148	200	0.75±0.2	(34.4)	7.8±0.8	(74.7)	0.010
148	250	0.32±0.05	(71.8)	1.4±0.2	(95.5)	0.004
148	275	0.04±0.01	(96.5)	0.1±0.01	(99.7)	0.002

Tabla 8 Efecto de diferentes concentraciones extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. parasiticus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
1059	0	1.18±0.2		46.0±1.02		0.039
1059	10	0.78±0.2	(33.6)	26.3±0.77	(42.7)	0.033
1059	13	0.75±0.2	(36.2)	20.8±0.32	(54.7)	0.027
1059	23	0.66±0.2	(44.3)	16.7±0.14	(63.7)	0.025
1059	30	0.42±0.1	(64.3)	8.9±0.02	(80.6)	0.021
1059	40	0.22±0.05	(81.3)	2.1±0.03	(95.6)	0.009
1273	0	0.96±0.17		22.62±1.48		0.010
1273	17	0.80±0.14	(16.9)	4.75±0.52	(79.0)	0.0009
1273	29	0.71±0.1	(26.4)	2.2±0.2	(90.3)	0.0002
1273	37	0.57±0.1	(41.2)	0.94±0.1	(95.8)	0.0001
1273	53	0.32±0.05	(66.3)	0.52±0.1	(97.7)	0.0001
1273	80	0.09±0.02	(90.5)	0.12±0.02	(99.5)	0.0002
1299	0	1.01±0.1		40.35±2.12		0.040
1299	17	0.67±0.08	(33.5)	3.95±0.67	(90.2)	0.006
1299	29	0.62±0.08	(38.7)	2.07±0.51	(94.9)	0.003
1299	37	0.56±0.06	(44.3)	1.21±0.2	(97.0)	0.002
1299	53	0.32±0.04	(68.0)	0.52±0.1	(98.2)	0.002
1299	80	0.05±0.01	(94.8)	0.09±0.01	(99.8)	0.001

Tabla 9 Efecto de diferentes concentraciones extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. flavus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
Su-1	0	1.19±0.18		153.0±4.23		0.128
Su-1	17	0.94±0.14	(21.6)	4.85±0.23	(96.8)	0.005
Su-1	29	0.83±0.12	(30.8)	0.87±0.1	(99.4)	0.001
Su-1	37	0.68±0.12	(43.3)	0.37±0.05	(99.8)	0.0005
Su-1	60	0.41±0.1	(65.7)	0.11±0.02	(99.9)	0.0003
Su-1	80	0.26±0.05	(78.3)	0.05±0.01	(100)	0.000
Su-1	90	0.09±0.02	(92.5)	0.00±0.0	(100)	0.000
148	0	1.12±0.2		153.2±4.68		0.137
148	17	0.94±0.2	(15.5)	5.37±1.56	(96.5)	0.005
148	29	0.77±0.1	(30.9)	1.10±0.2	(99.3)	0.001
148	37	0.57±0.1	(49.1)	0.20±0.01	(99.8)	0.003
148	60	0.32±0.1	(71.2)	0.10±0.01	(99.9)	0.002
148	80	0.20±0.05	(82.0)	0.00±0.0	(100)	0.000
148	85	0.09±0.01	(91.9)	0.00±0.0	(100)	0.000

Tabla 10 Efecto de diferentes concentraciones extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. parasiticus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
1059	0	0.99±0.1		68.58±2.39		0.069
1059	0.4	0.84±0.1	(15.3)	1.37±0.02	(98)	0.002
1059	1	0.79±0.2	(20.3)	1.67±0.03	(97.6)	0.002
1059	2	0.01±0.004	(98.9)	1.72±0.03	(97.5)	0.003
1059	4	0.002±0.004	(99.8)	0.42±0.02	(97.9)	0.003
1273	0	1.49±0.14		7.93±0.31		0.005
1273	2	0.92±0.12	(38.6)	8.82±0.1	(11.28*)	0.009
1273	4	0.79±0.18	(46.6)	9.23±0.1	(16.39*)	0.011
1273	8	0.74±0.18	(50.7)	8.4±0.08	(5.92*)	0.011
1273	12	0.32±0.05	(78.2)	0.39±0.07	(88.9)	0.001
1273	14	0.09±0.02	(93.9)	0.11±0.05	(98.6)	0.001
1299	0	1.24±0.2		152.2±3.95		0.123
1299	3	0.76±0.2	(38.6)	87.55±1.25	(42.5)	0.044
1299	6	0.72±0.2	(42.1)	42.88±0.95	(71.8)	0.030
1299	1	0.05±0.01	(95.9)	2.81±0.2	(98.2)	0.000

Tabla 11 Efecto de diferentes concentraciones extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. flavus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
Su-1	0	1.19± 0.1		154.15±3.75		0.129
Su-1	3	0.74± 0.1	(38.1)	73.95±1.24	(52.0)	0.099
Su-1	6	0.60± 0.05	(49.4)	52.92±1.02	(65.7)	0.087
Su-1	12	0.37± 0.05	(69.2)	12.81±0.5	(91.7)	0.035
Su-1	14	0.12± 0.01	(89.9)	0.9±0.01	(99.4)	0.007
148		1.14±0.2		104.45±2.52		0.092
148	3	1.03±0.2	(9.5)	70.77±1.78	(32.2)	0.068
148	6	0.96±0.2	(16.2)	47.72±1.06	(54.3)	0.049
148	10	0.34±0.1	(70.1)	21.45±0.5	(79.5)	0.063
148	12	0.01±0.001	(99.1)	2.8±0.1	(97.3)	0.028

Tabla 12 Efecto de diferentes concentraciones extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. parasiticus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
1059	0	1.18±0.1		36.7±1.75		0.031
1059	3	0.93±0.1	(21.5)	16.5±0.78	(55.0)	0.017
1059	6	0.84±0.2	(28.9)	10.8±0.80	(70.5)	0.013
1059	12	0.55±0.1	(53.4)	7.45±0.5	(79.7)	0.014
1059	20	0.005±0.001	(99.6)	0.2±0.01	(99.5)	0.004
1273	0	1.49±0.2		7.93±0.8		0.005
1273	2	0.79±0.2	(46.9)	8.9±0.7	(12.2*)	0.011
1273	4	0.71±0.1	(52.7)	1.57±0.1	(80.2)	0.002
1273	10	0.40±0.1	(72.9)	0±0.0	(100)	0.000
1273	15	0.009±0.001	(99.4)	0±0.0	(100)	0.000
1299	0	1.24±0.1		152.2±4.32		0.123
1299	6	0.77±0.1	(37.6)	35.5±1.05	(76.6)	0.045
1299	13	0.55±0.05	(55.4)	24.5±0.85	(83.9)	0.044
1299	20	0.53±0.05	(56.9)	5.82±0.3	(96.2)	0.010
1299	33	0.38±0.05	(69.6)	2.71±0.1	(98.2)	0.007
1299	50	0.01±0.01	(99.1)	0.00±0.0	(100)	0.002

Tabla 13 Efecto de diferentes concentraciones extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. flavus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
Su-1	0	1.19±0.2		154.2±4.13		0.129
Su-1	6	0.89±0.2	(25.4)	112.0±3.65	(27.3)	0.126
Su-1	15	0.81±0.2	(32.5)	42.1±1.54	(72.7)	0.052
Su-1	21	0.05±0.001	(54.8)	18.8±0.8	(87.7)	0.035
Su-1	28	0.01±0.001	(98.7)	1.72±0.1	(94.5)	0.020
148	0	1.14±0.1		104.4±2.83		0.092
148	6	0.98±0.2	(22.7)	21.95±0.6	(79.5)	0.022
148	15	0.87±0.1	(23.8)	19.73±0.7	(81.1)	0.023
148	21	0.59±0.1	(48.6)	14.87±0.6	(85.8)	0.025
148	25	0.12±0.05	(89.4)	2.21±0.3	(97.9)	0.018
148	28	0.05±0.01	(95.6)	0.00±0.0	(100)	0.000

Tabla 14 Efecto de diferentes concentraciones extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. parasiticus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
1059	0	0.99±0.1		68.58±2.39		0.069
1059	0.7	0.88±0.1	(11.3)	1.22±0.08	(98.2)	0.001
1059	1.7	0.86±0.2	(13.5)	1.12±0.07	(98.4)	0.001
1059	3.5	0.71±0.2	(17.8)	0.70±0.05	(98.9)	0.001
1059	5.2	0.11±0.01	(88.5)	0.13±0.001	(99.8)	0.001
1273	0	1.49±0.2		7.93±0.31		0.005
1273	2	0.86±0.2	(42.2)	7.73±0.32	(2.5)	0.008
1273	4	0.81±0.2	(45.5)	6.67±0.25	(15.9)	0.008
1273	10	0.16±0.05	(89.2)	1.32±0.13	(83.4)	0.008
1273	15	0.002±0.001	(99.9)	0.01±0.01	(99.9)	0.002
1299	0	1.24±0.1		152.2±4.56		0.123
1299	6	0.53±0.05	(57.5)	23.3±1.23	(84.7)	0.044
1299	13	0.005±0.001	(99.0)	1.7±0.1	(99.0)	0.030
1299	20	0.00±0.0	(100)	0.0±0.0	(100)	0.000

Tabla 15 Efecto de diferentes concentraciones extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. flavus*

Cepa	Concen (mg/mL)	Peso Seco(g)	(%Inh)	AF(mg)	(%inh)	Produc. Especifica
Su-1	0	1.19±0.2		154.15±4.57		0.129
Su-1	6	0.59±0.05	(50.0)	32.15±1.64	(79.1)	0.054
Su-1	15	0.26±0.05	(78.3)	7.65±1.02	(95.0)	0.029
Su-1	21	0.002±0.001	(99.8)	0.72±0.1	(99.5)	0.021
148	0	1.14±0.1		104.45±3.15		0.092
148	6	0.87±0.1	(23.2)	51.02±1.25	(51.1)	0.058
148	15	0.55±0.07	(51.8)	13.37±0.84	(87.2)	0.024
148	21	0.00±0.0	(100)	0.00±0.0	(100)	0.000

Tabla 16 Efecto de diferentes concentraciones extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento, producción y productividad específica de aflatoxinas de *A. parasiticus*

Según el análisis de ANOVA, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre las cepas utilizadas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, sin embargo, si existieron diferencias significativas entre los extractos. Cuando utilizamos el método no paramétrico de TUKEY para determinar los grupos homogéneos, encontrando 4 grupos, uno constituido por los extractos metanólicos de *Y. schidigera*, otros dos con los extractos clorofórmico y acuoso de la misma planta y un grupo más con los dos extractos de *L. tridentata*.

CMI (mg/mL)					
Extracto	Af 1059	Af 1273	Af 1299	Ap Su-1	Ap 148
YsMe	155±5	145±5	150±4	145±5	140±4
YsMe-Aq	144±4	135±3	235±8	275±7	265±8
YsClf-Ace	12±1	14±2	12±1	14±2	12±1
YsAq	88±3	85±4	91±3	92±4	87±3
GobMe	33±2	25±3	20±2	50±3	28±3
GobClf-Ace	15±1	12±2	15±1	18±3	10±1

Tabla 17 Concentraciones mínimas de los extractos de *Y. schidigera* y *L. tridentata* que inhiben el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio SMKY. (Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona).

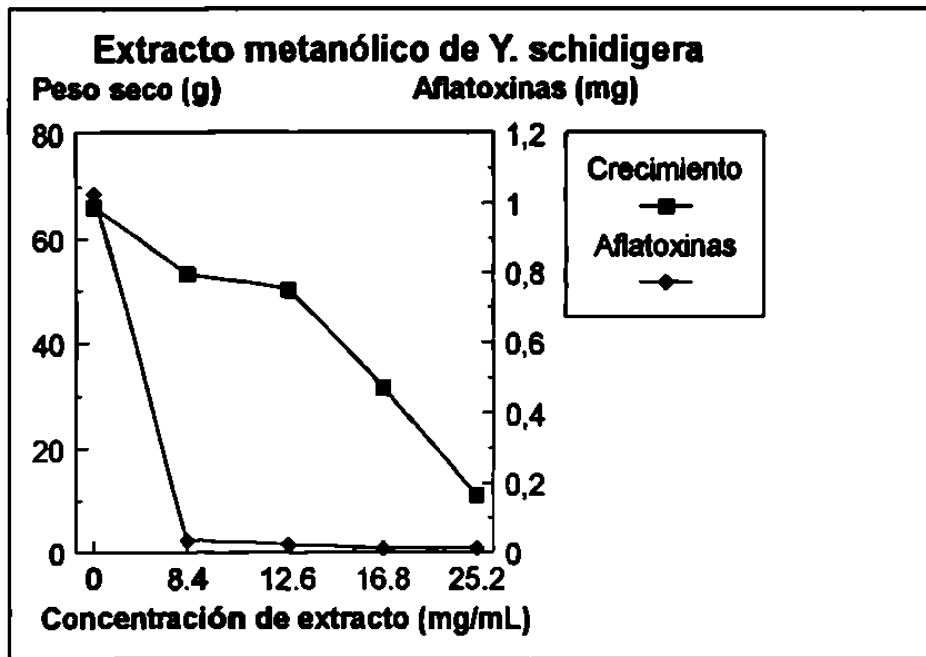


Fig. 33 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1059 en medio SMKY

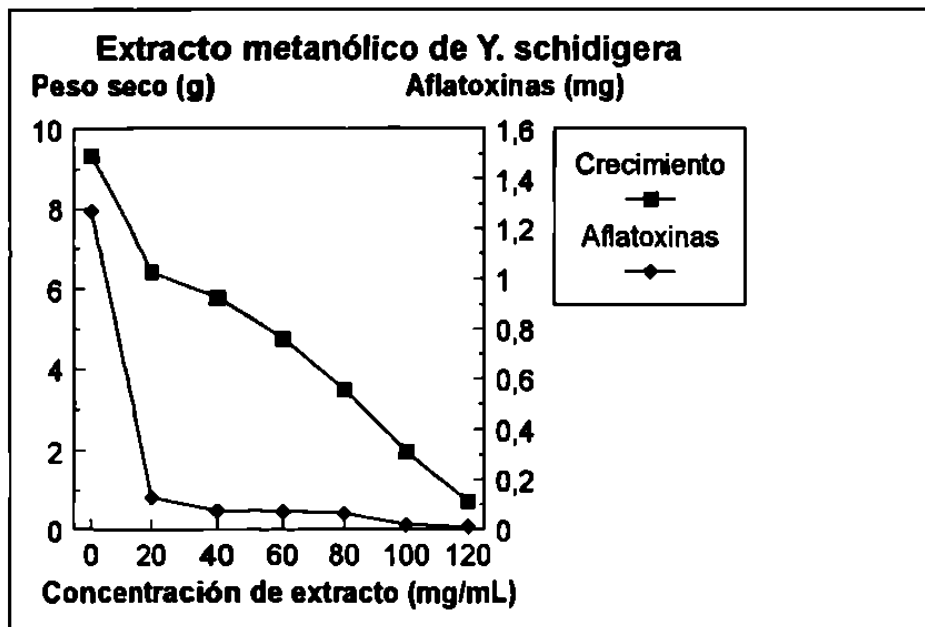


Fig. 34 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1273 en medio SMKY

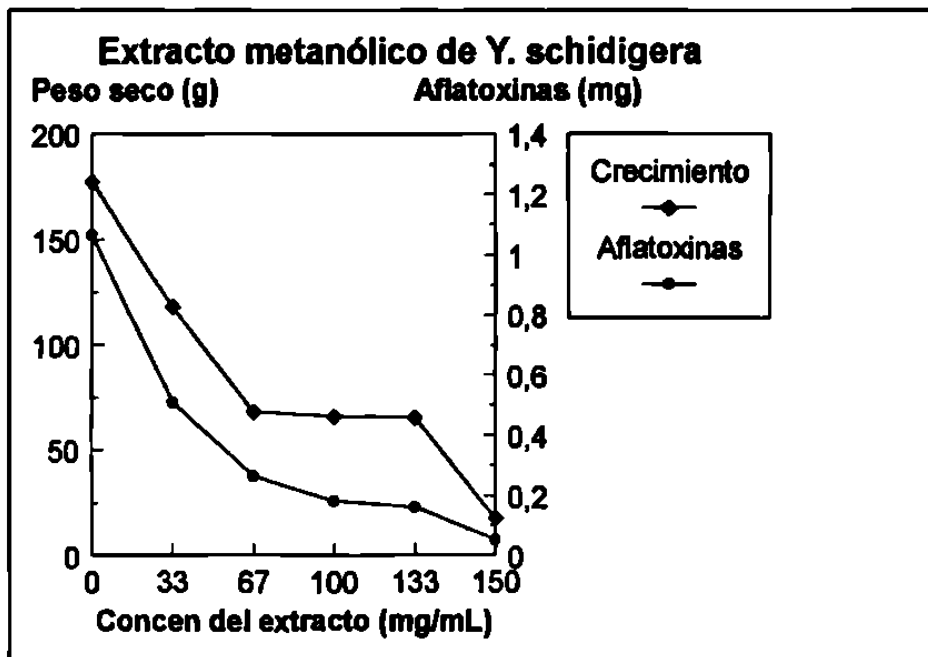


Fig. 35 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1299 en medio SMKY

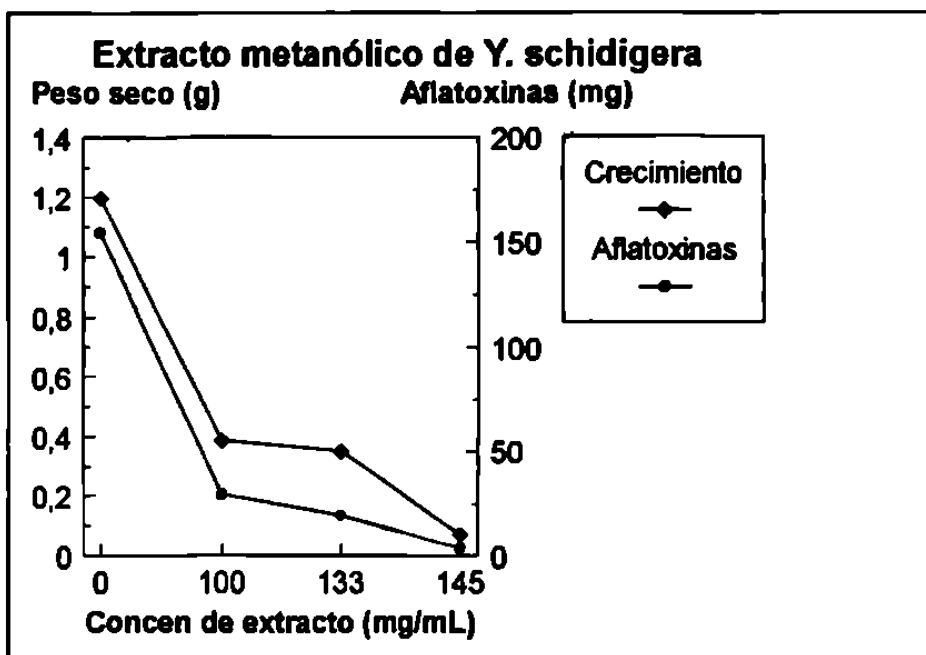


Fig. 36 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio SMKY

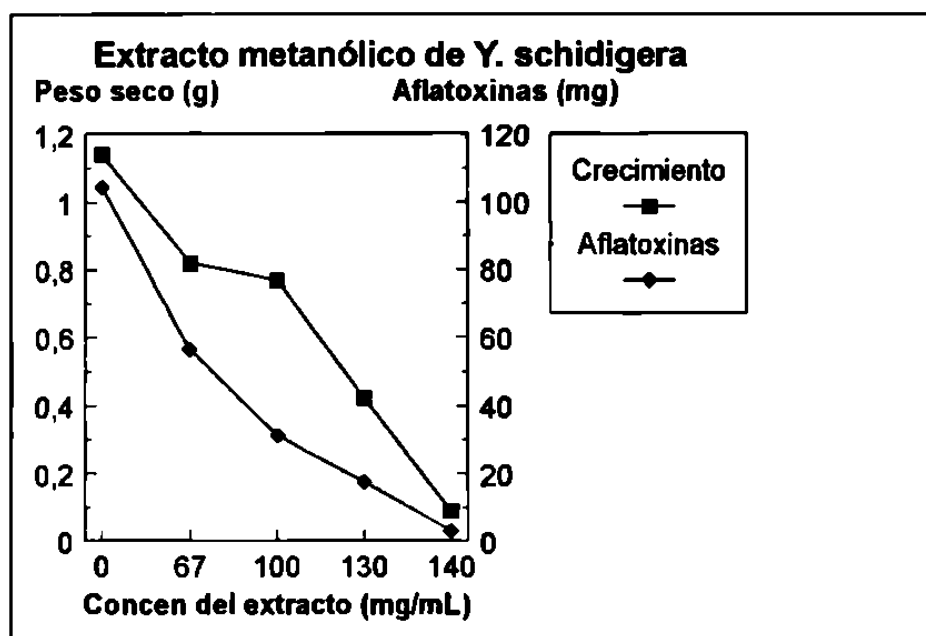


Fig. 37 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa 148 en medio SMKY

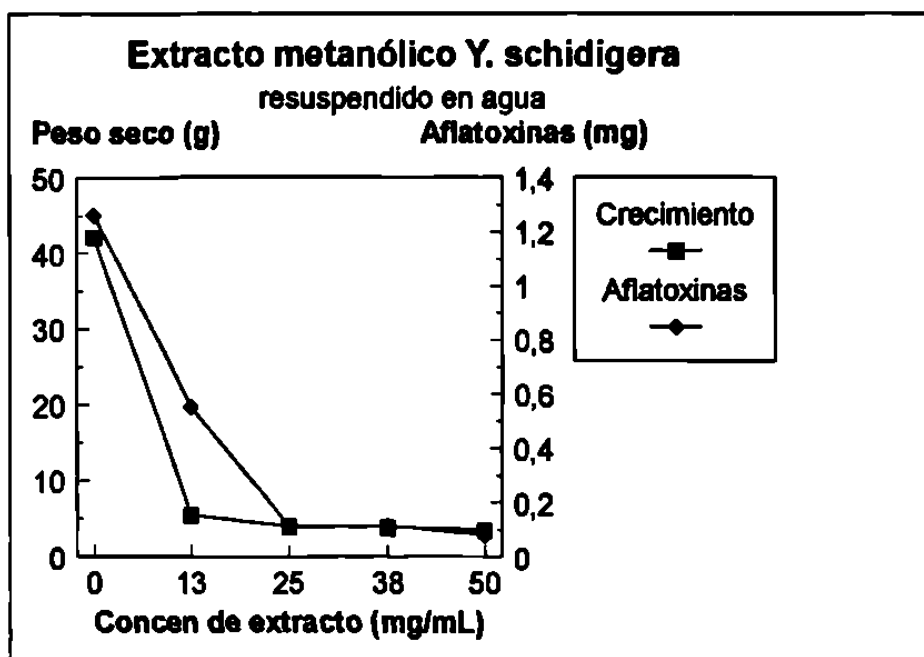


Fig. 38 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1059 en medio SMKY

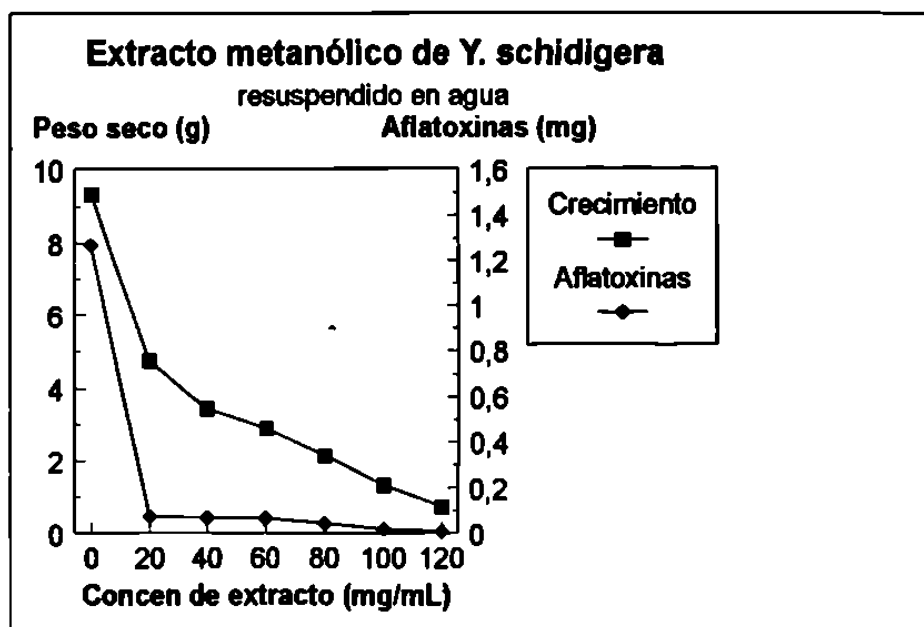


Fig. 39 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1273 en medio SMKY

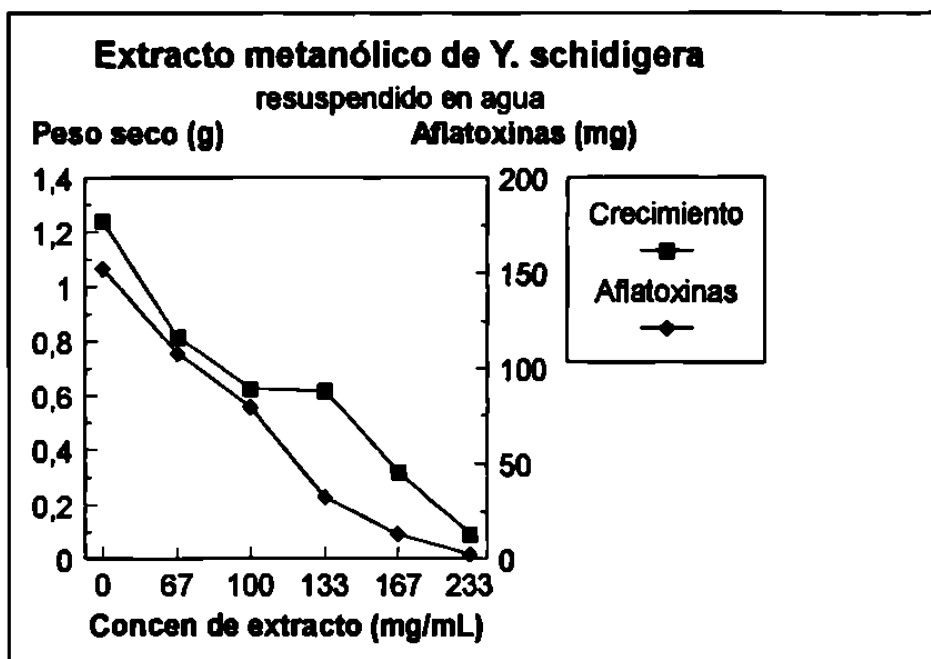


Fig. 40 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1299 en medio SMKY

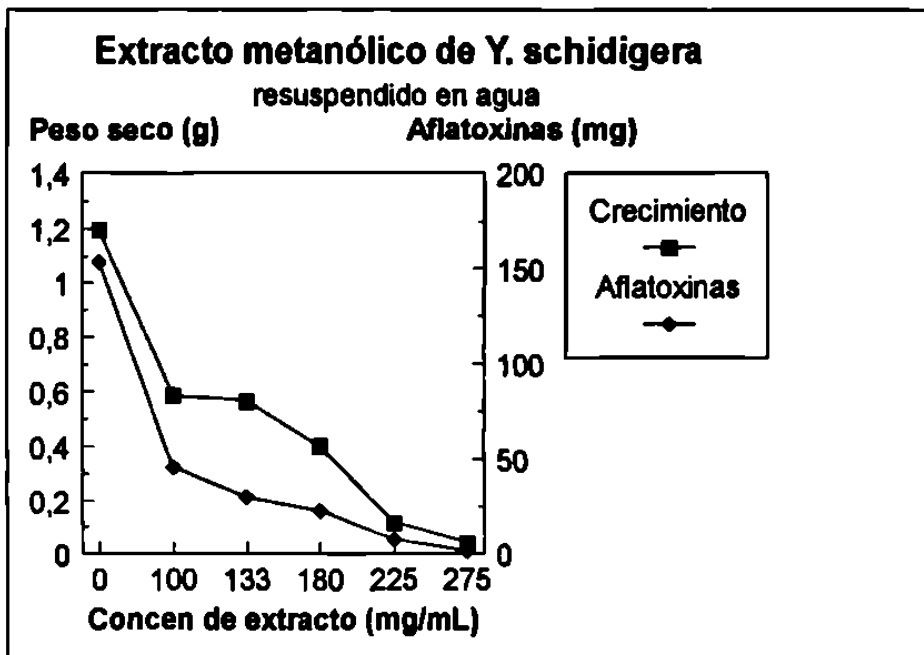


Fig. 41 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio SMKY

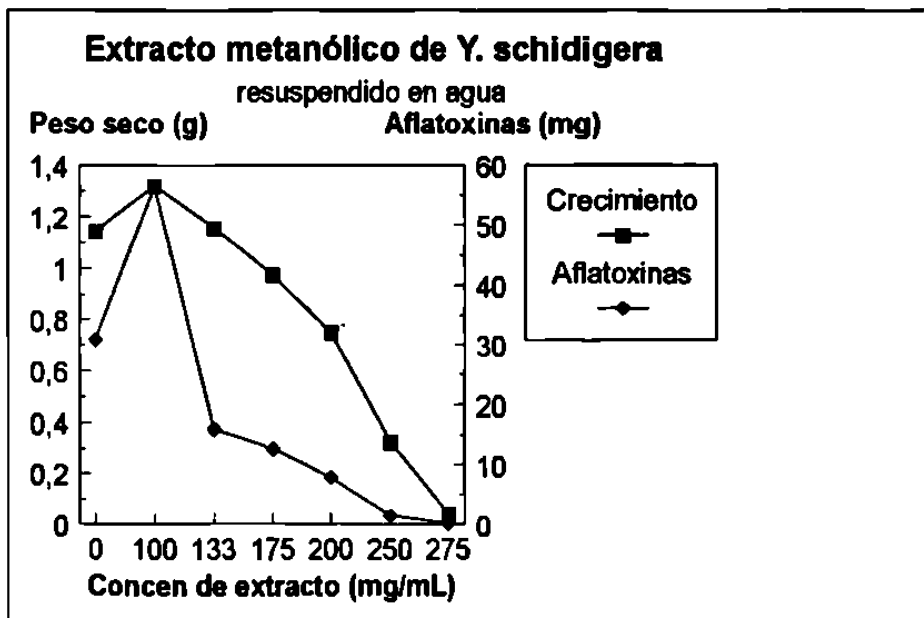


Fig. 42 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa 148 en medio SMKY

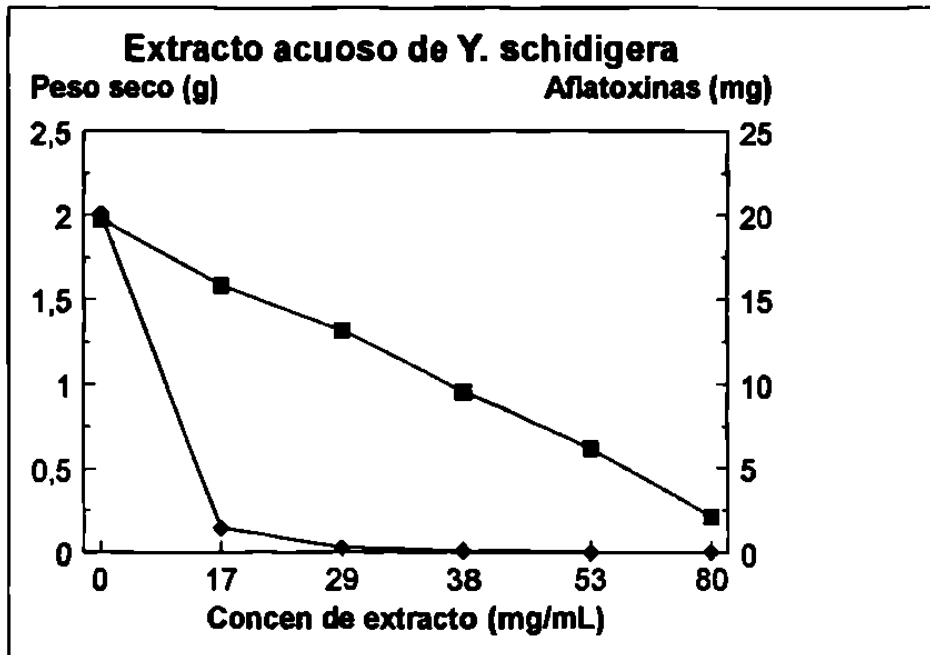


Fig. 43 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1059 en medio SMKY

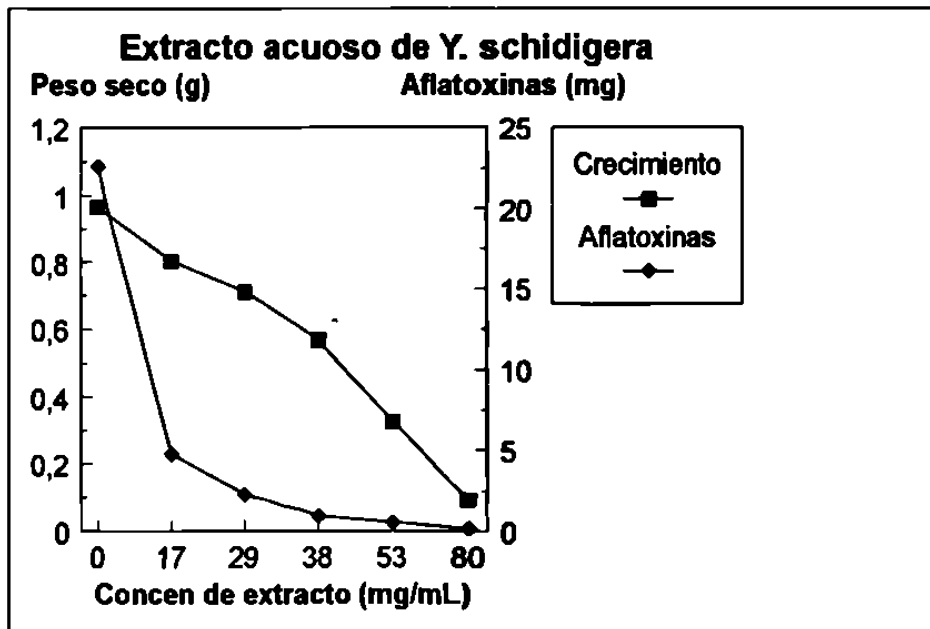


Fig. 44 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1273 en medio SMKY

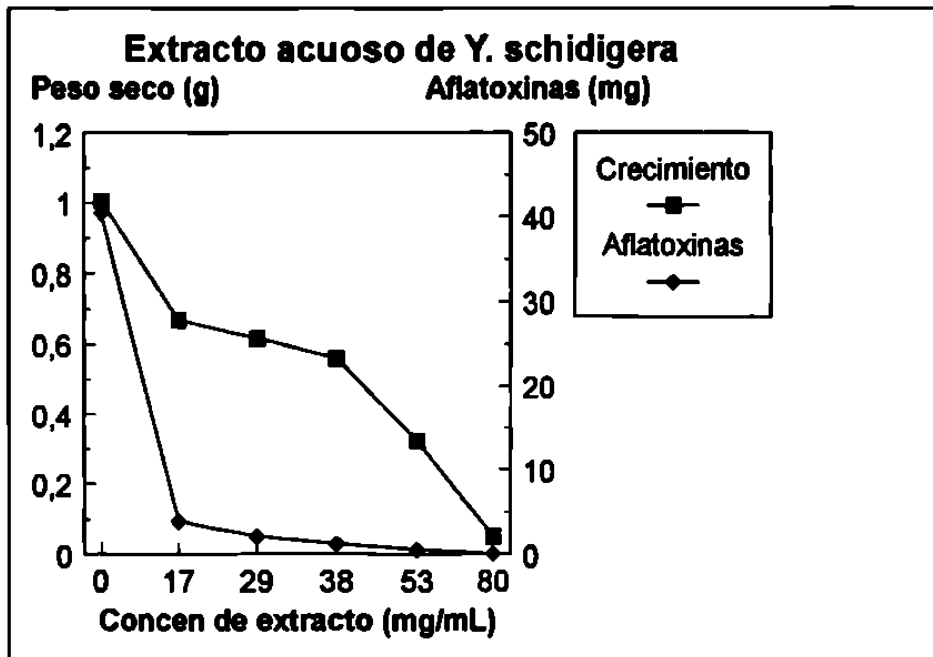


Fig. 45 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1299 en medio SMKY

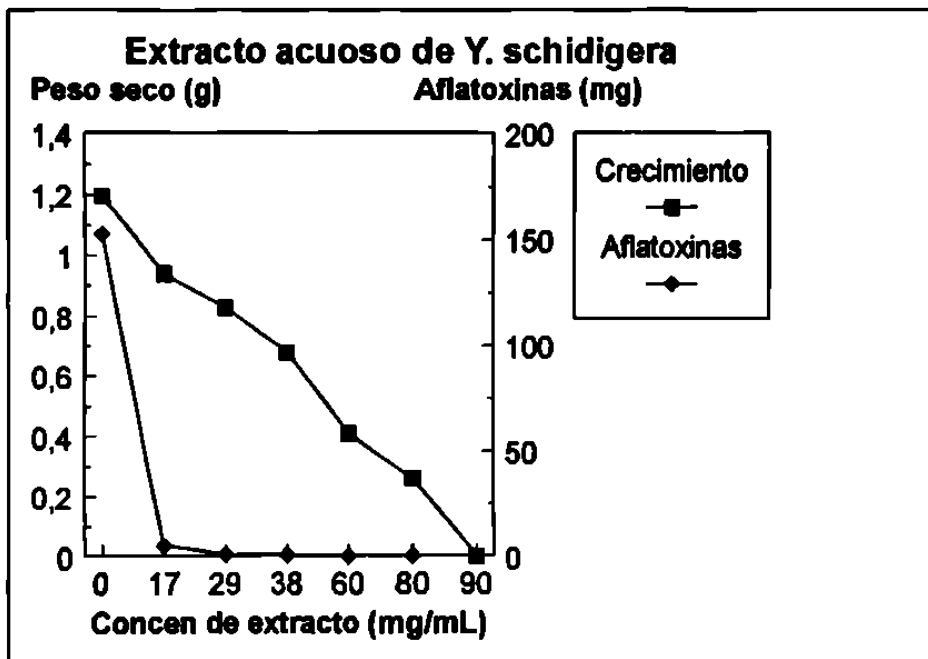


Fig. 46 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio SMKY

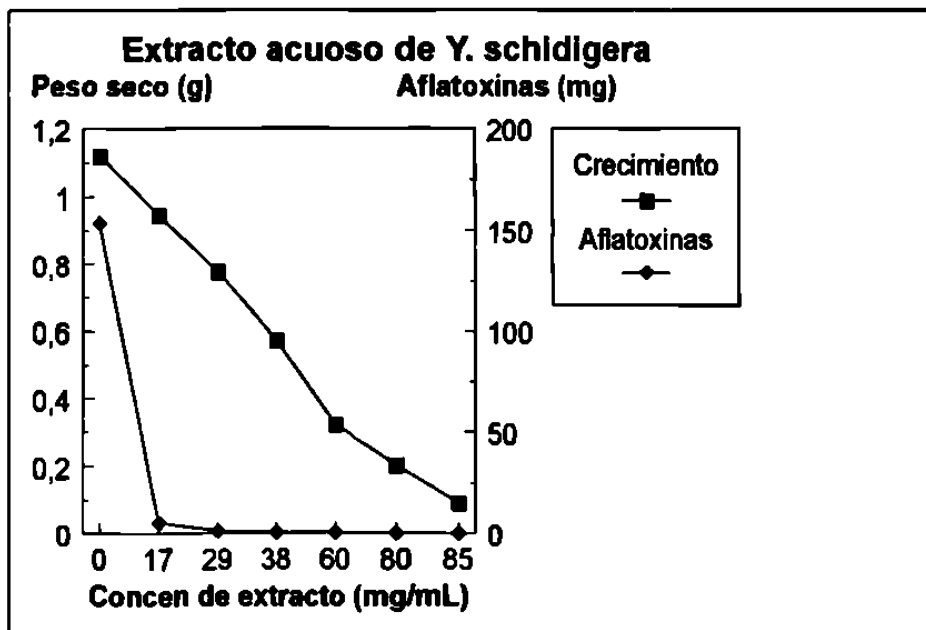


Fig. 47 Efecto del extracto acuoso de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa 148 en medio SMKY

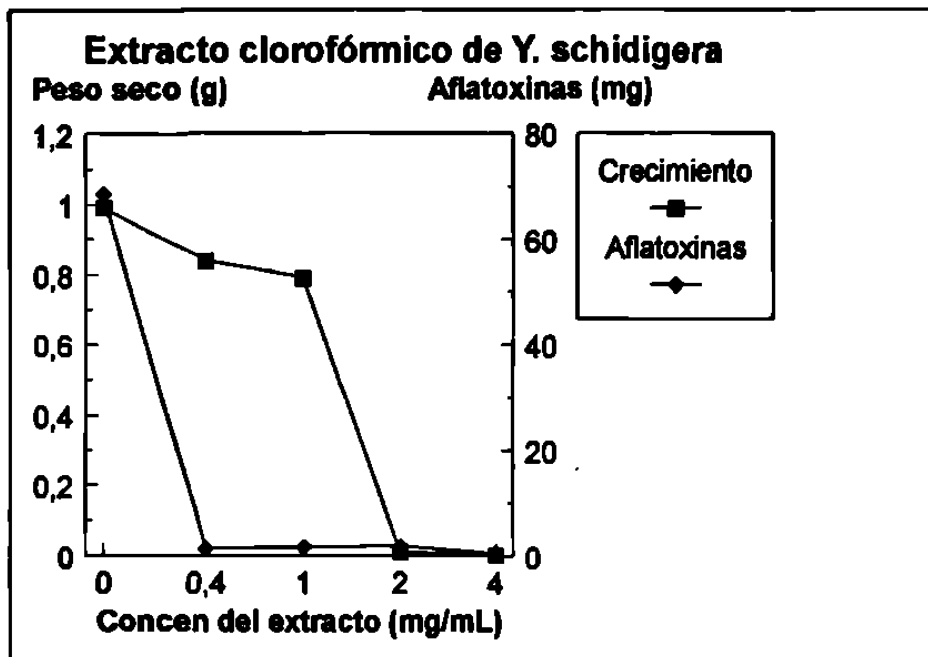


Fig. 48 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1059 en medio SMKY

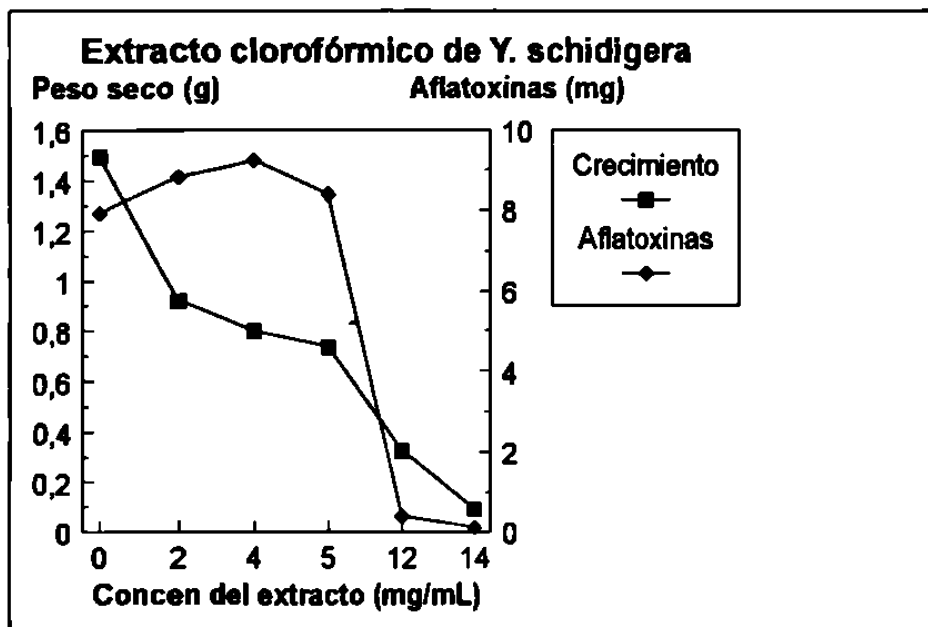


Fig. 49 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1273 en medio SMKY

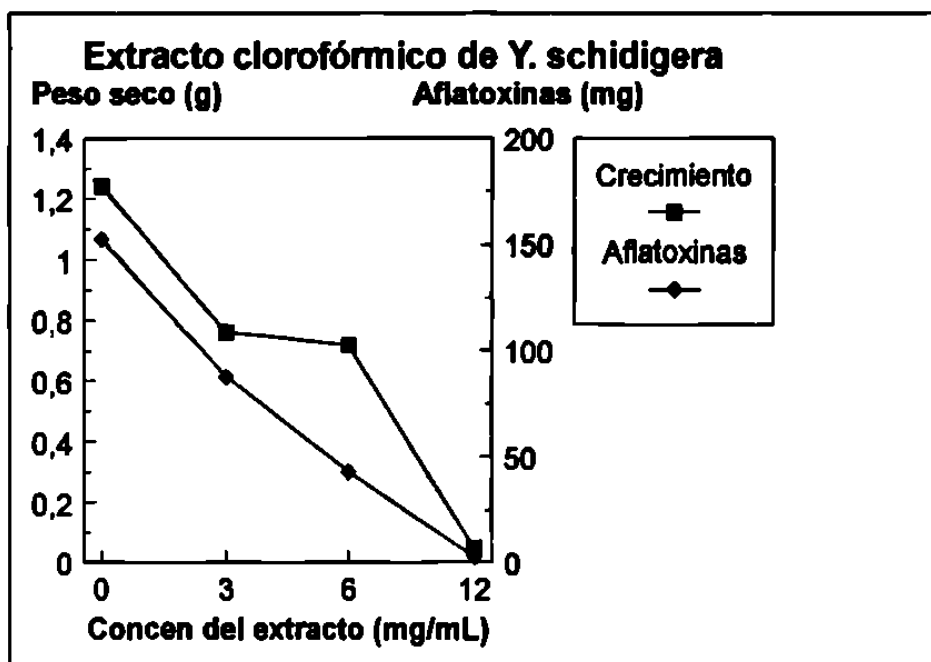


Fig. 50 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1299 en medio SMKY

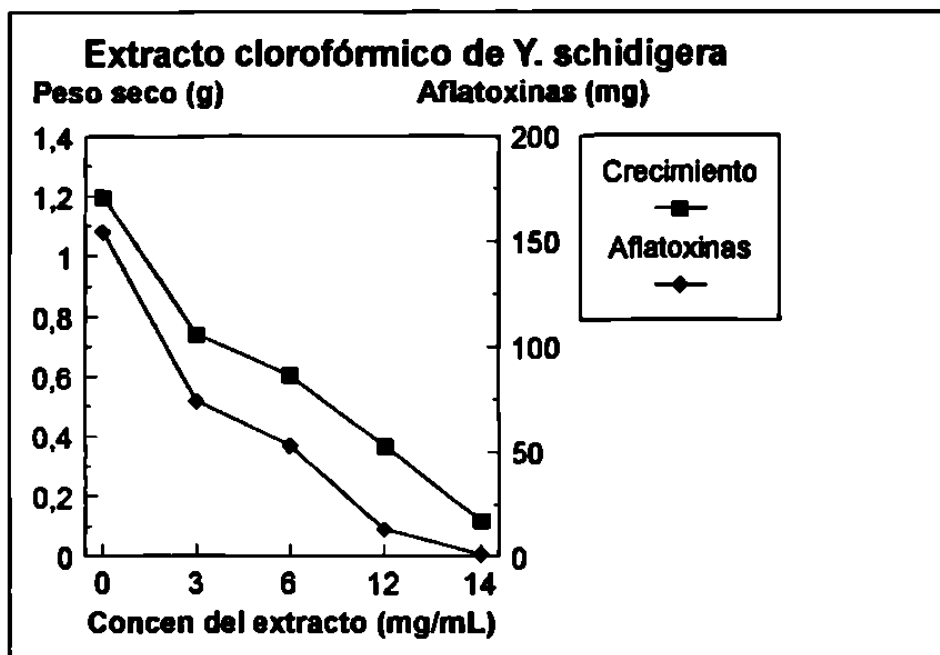


Fig. 51 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio SMKY

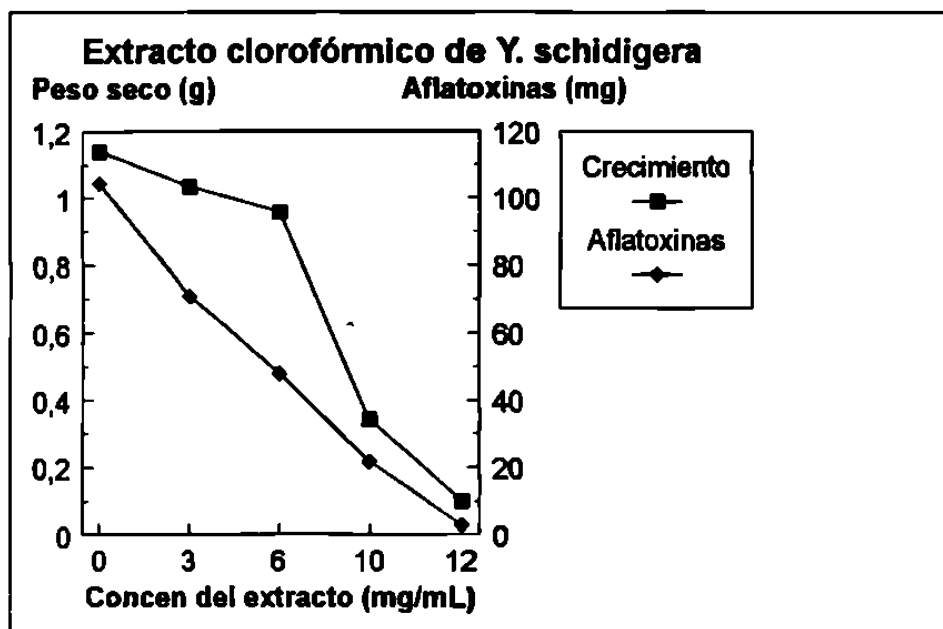


Fig. 52 Efecto del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa 148 en medio SMKY

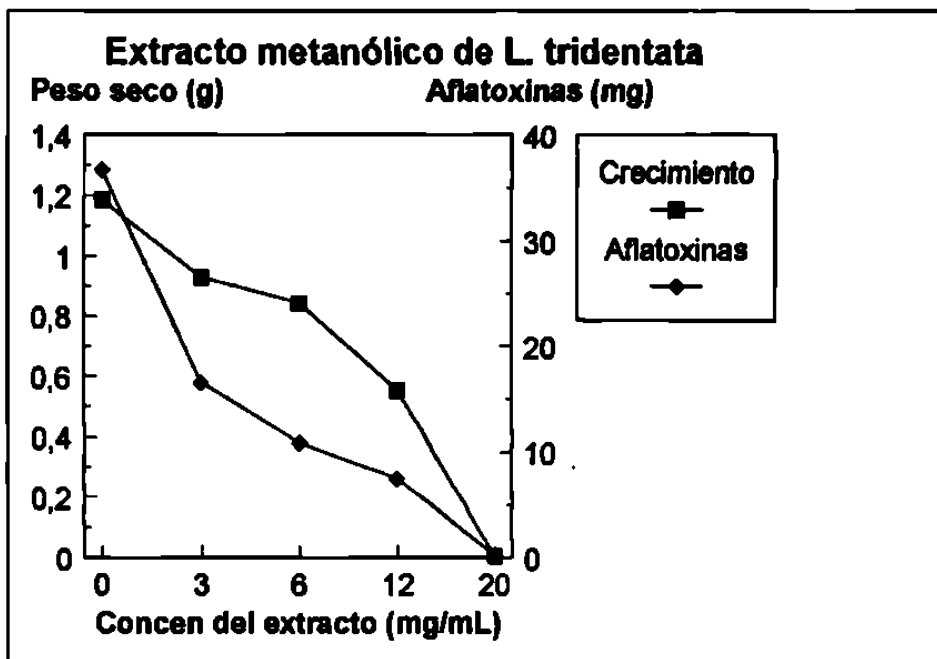


Fig. 53 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1059 en medio SMKY

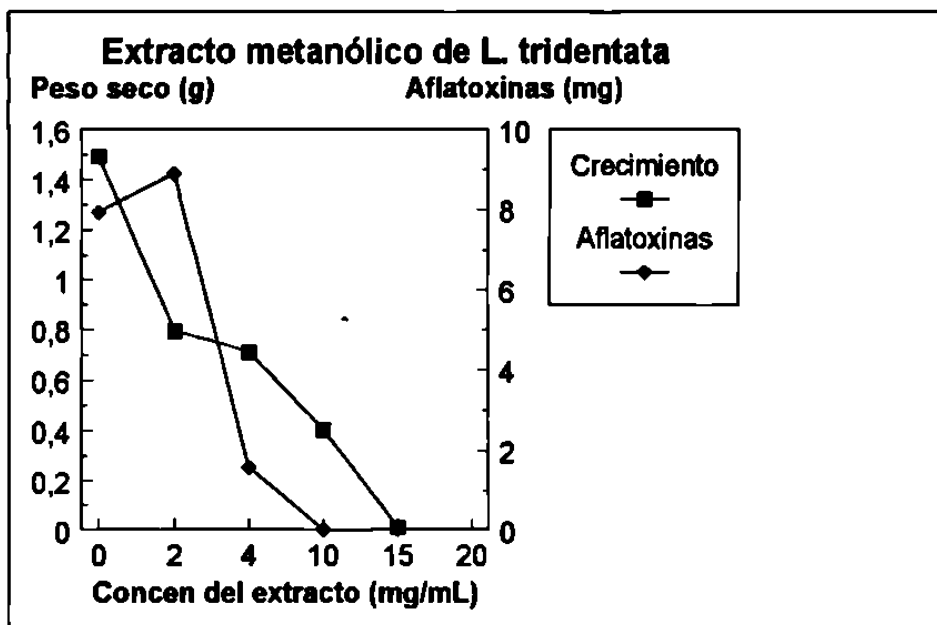


Fig. 54 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1273 en medio SMKY

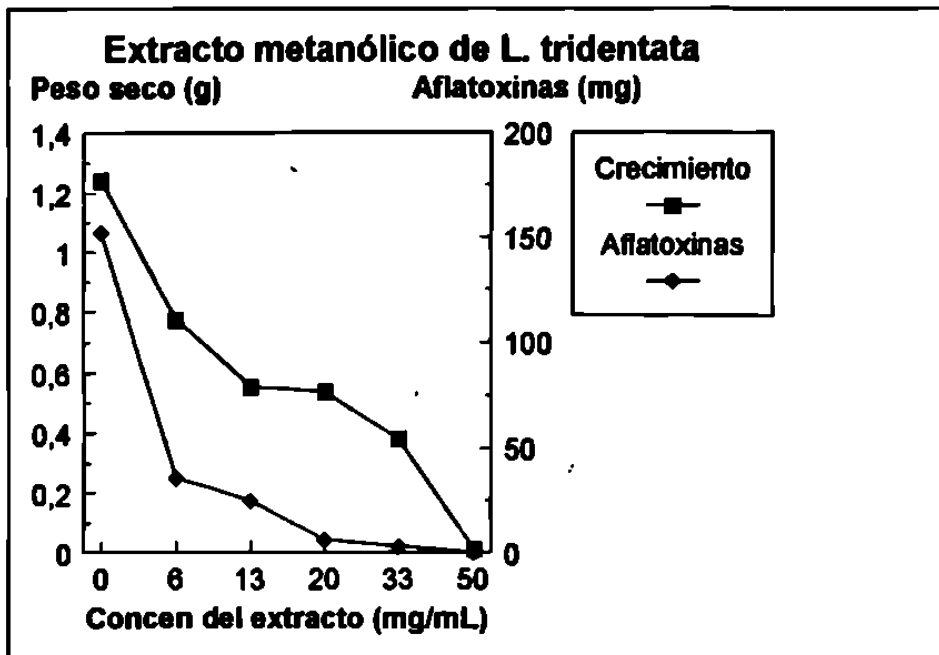


Fig. 55 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1299 en medio SMKY

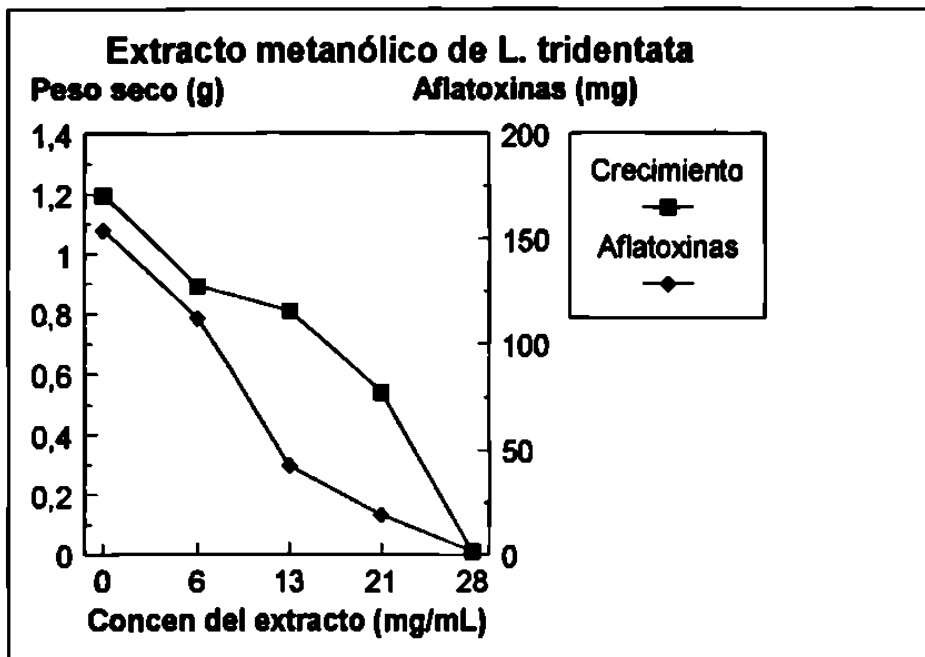


Fig. 56 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio SMKY

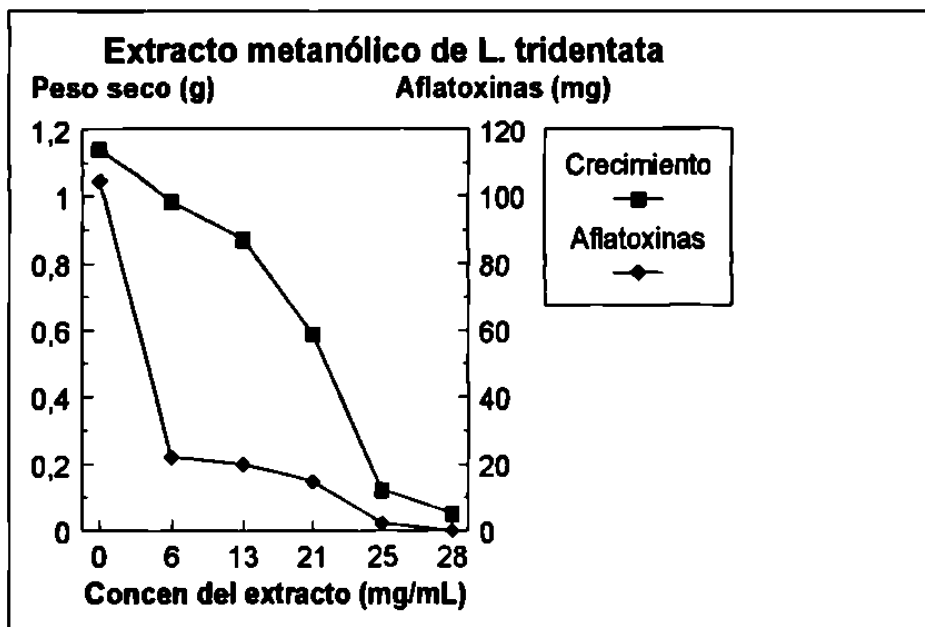


Fig. 57 Efecto del extracto metanólico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa 148 en medio SMKY

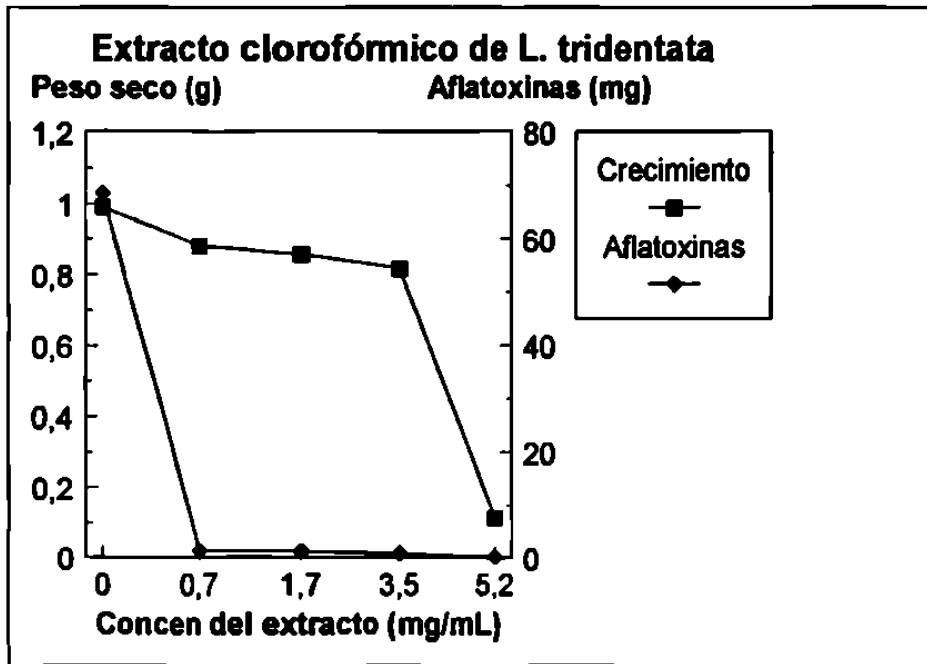


Fig. 58 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1059 en medio SMKY

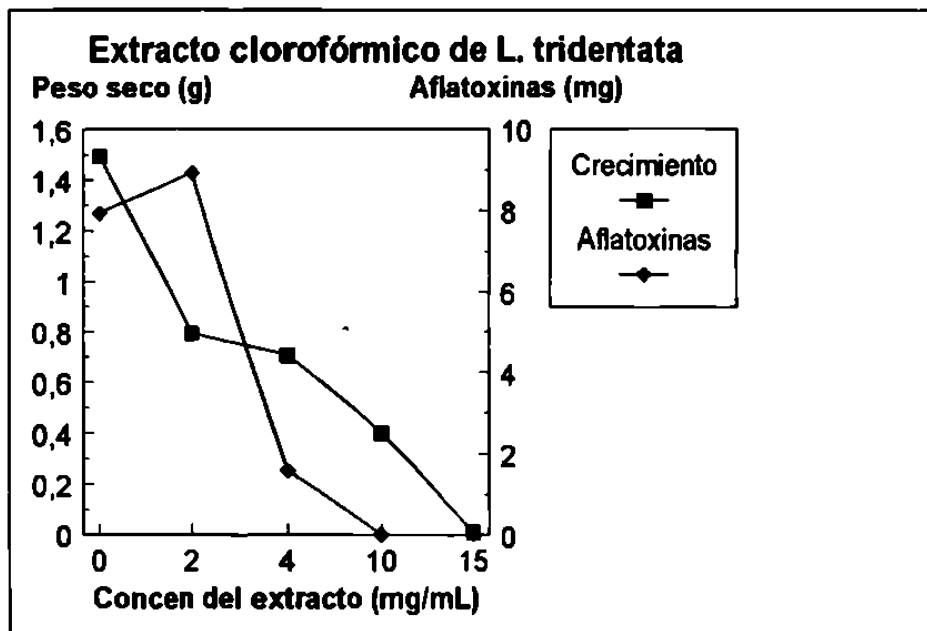


Fig. 59 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1273 en medio SMKY

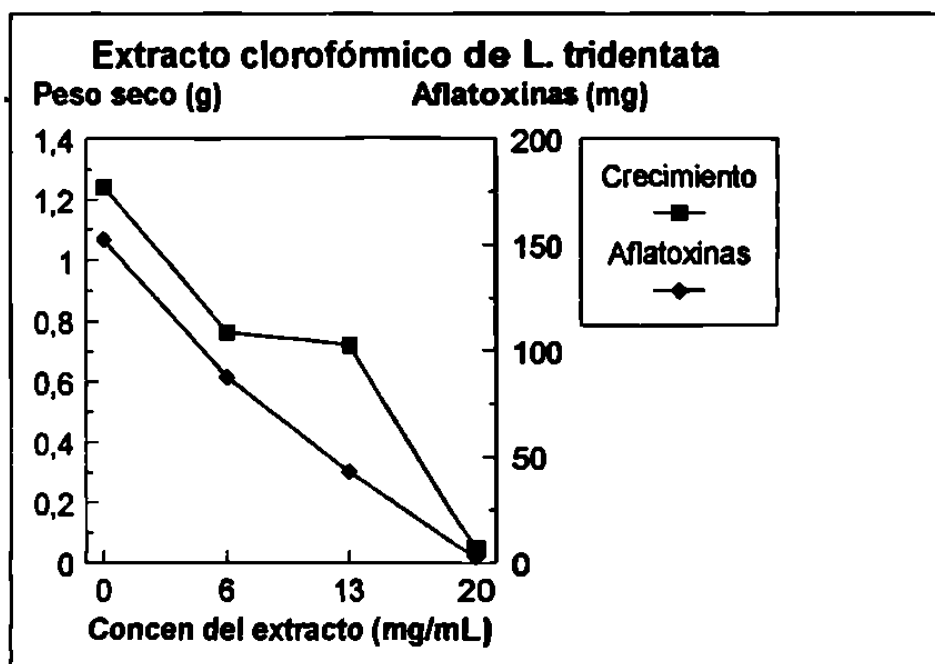


Fig. 60 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus* cepa 1299 en medio SMKY

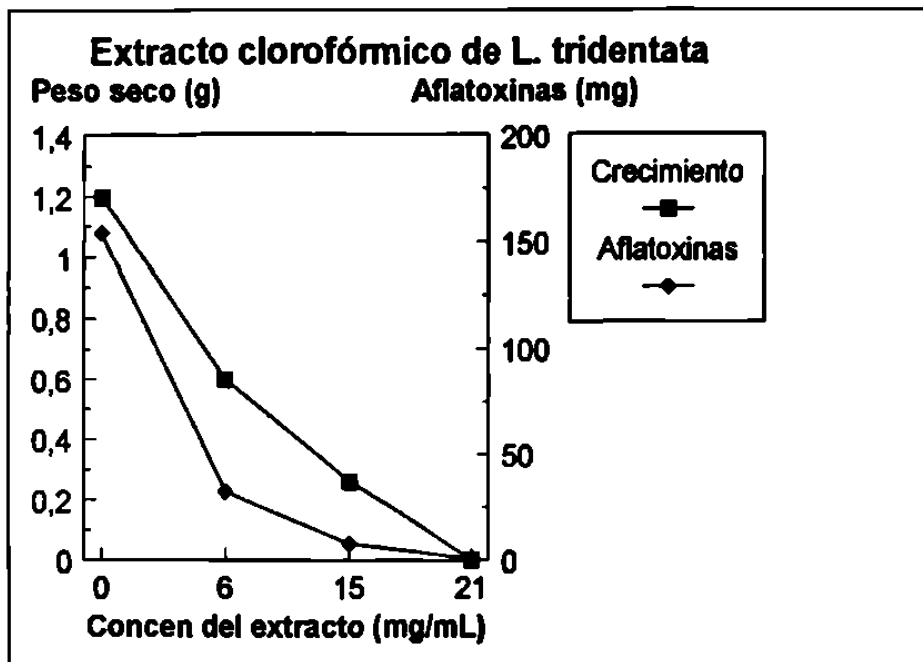


Fig. 61 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa Su-1 en medio SMKY

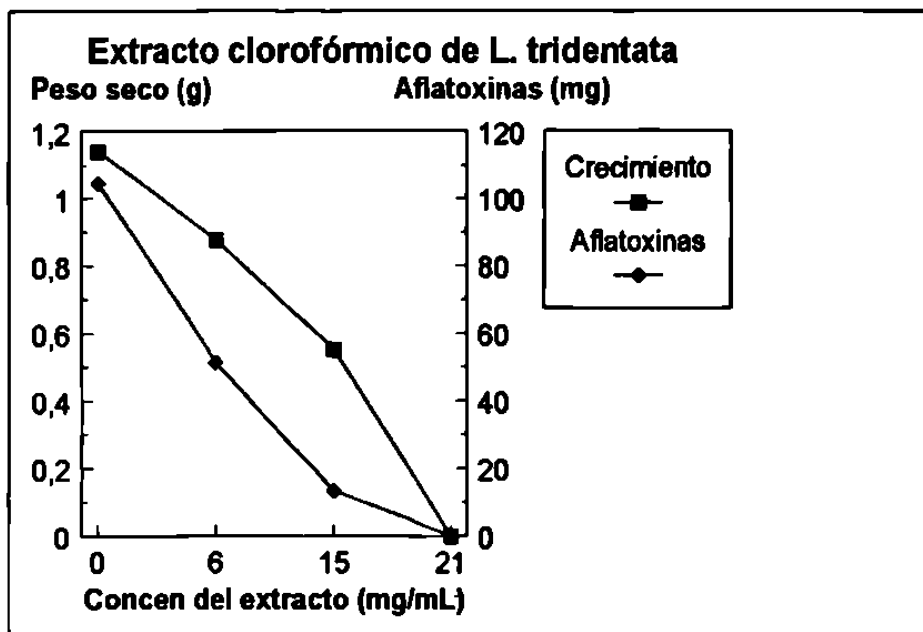


Fig. 62 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* cepa 148 en medio SMKY

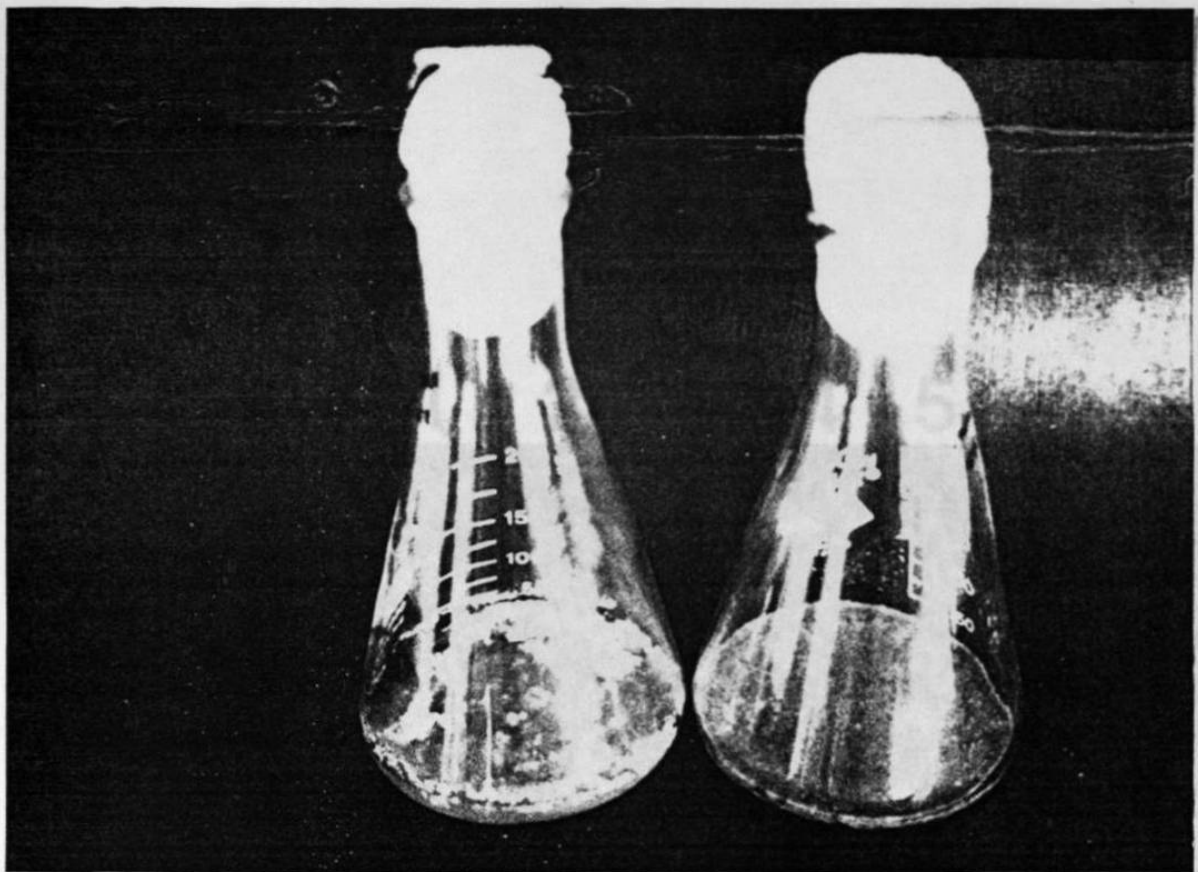


Fig. 63 Efecto del extracto metanólico de *Y. schidigera* sobre el crecimiento de *A. flavus* en medio SMKY

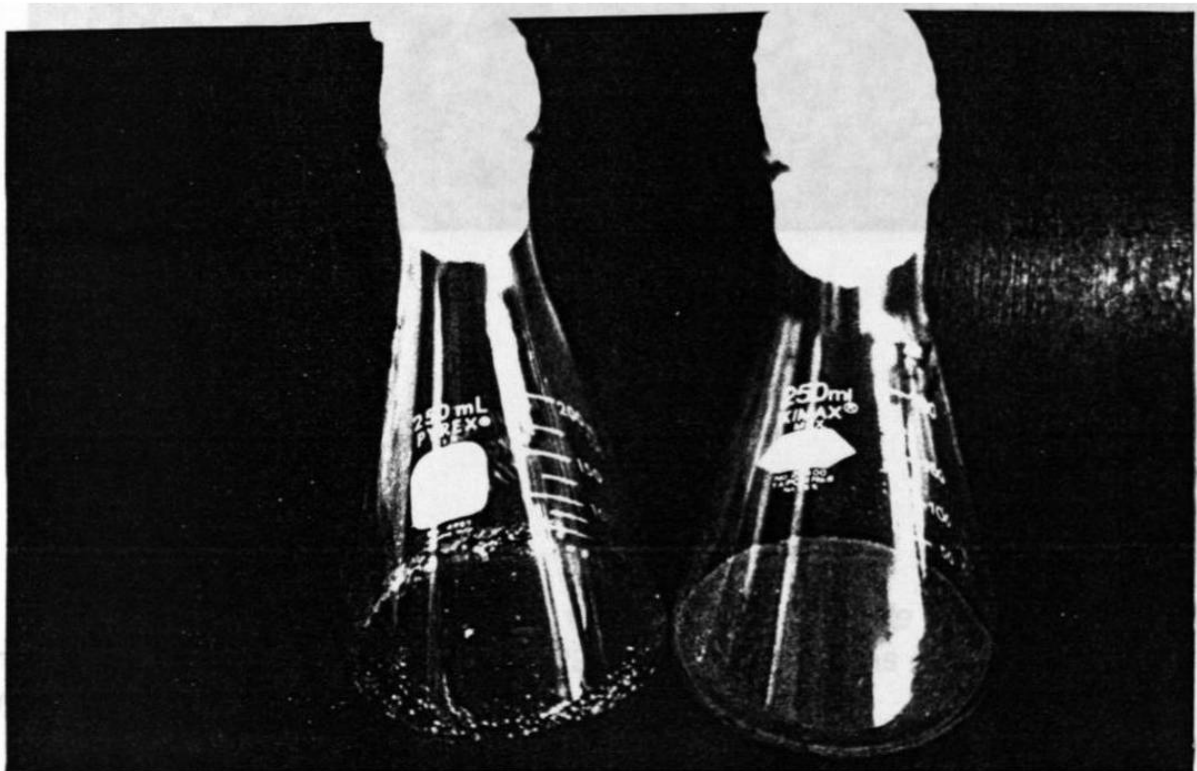


Fig. 64 Efecto del extracto clorofórmico de *L. tridentata* sobre el crecimiento de *A. flavus* en medio SMKY

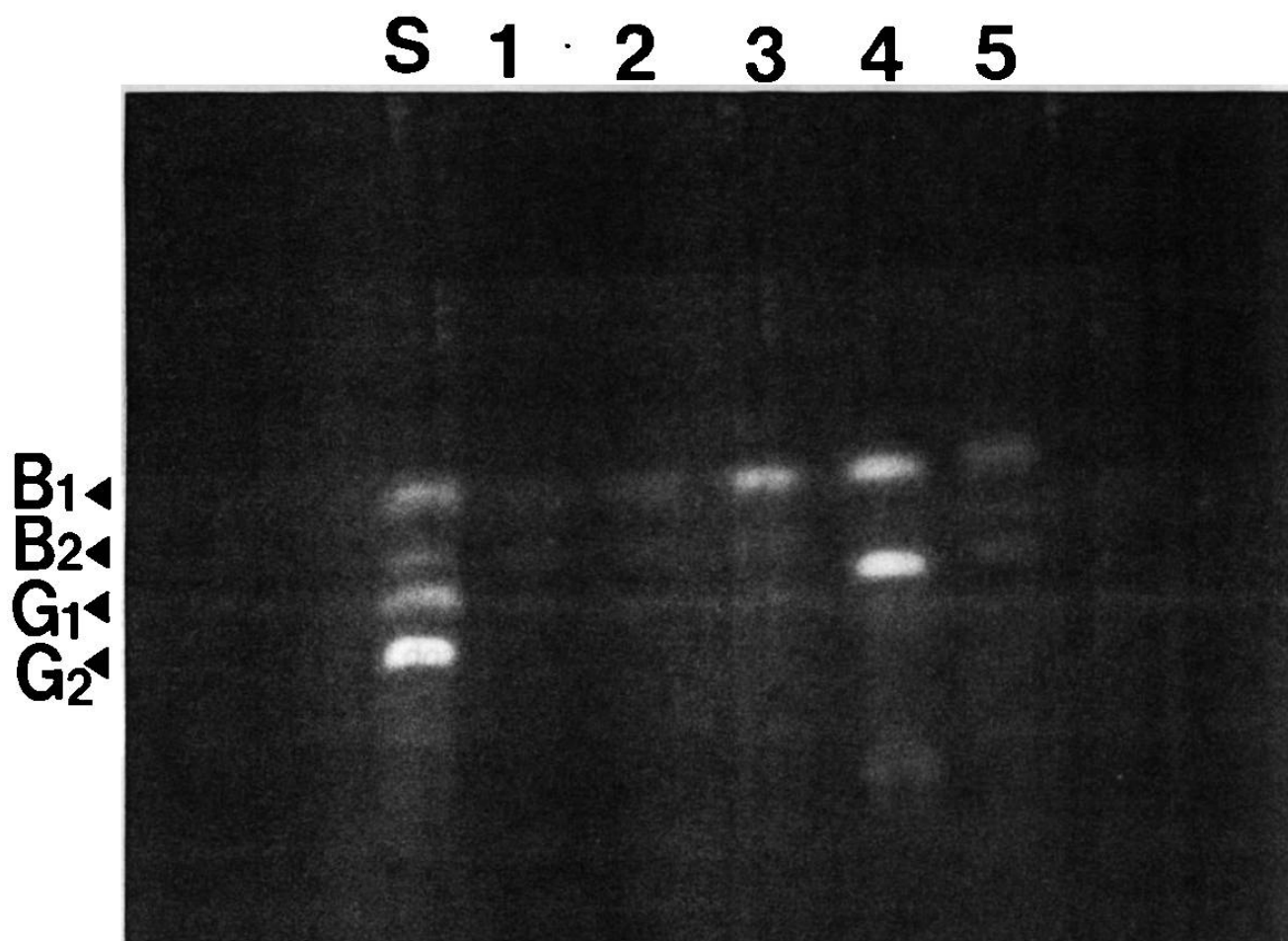


Fig. 65 Cromatografía en capa fina con muestras de aflatoxinas de cultivos controles de las cepas 1059, 1273 y 1299 de *A. flavus* y las cepas Su-1 y 148 de *A. parasiticus*.

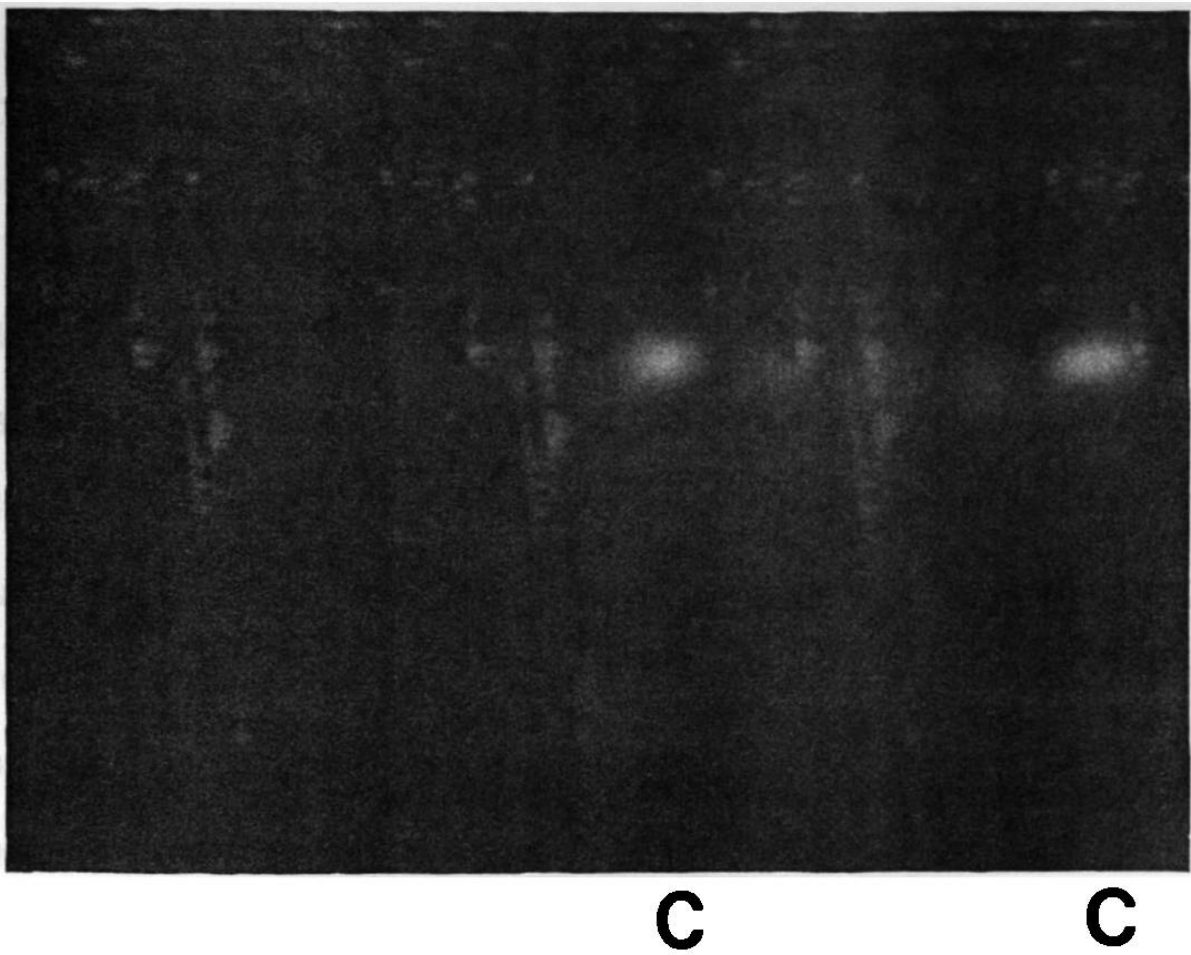


Fig. 66 Cromatografía en capa fina de muestras de aflatoxinas de cultivos de *A. flavus* tratados con diferentes dosis del extracto metanólico de *Y. schidigera*

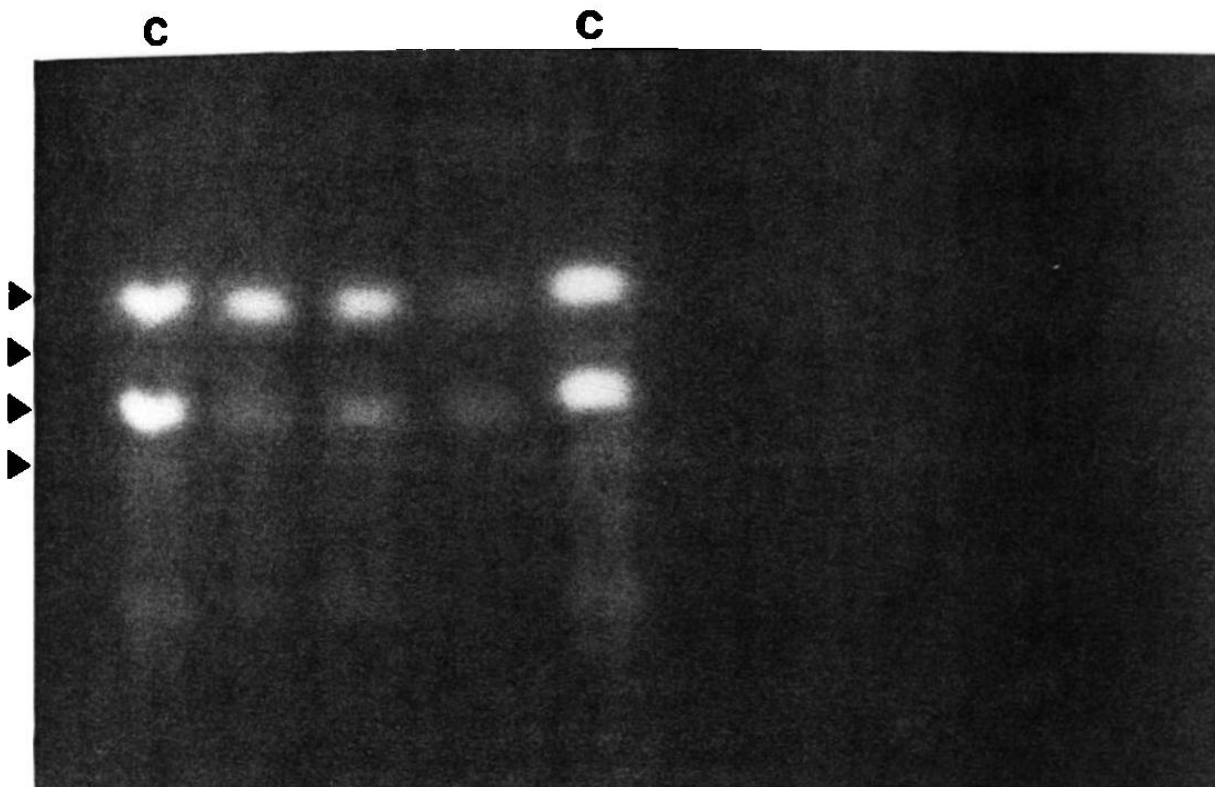


Fig. 67 Cromatografía en capa fina con muestras de aflatoxinas de cultivos de *A. parasiticus* tratados con diferentes dosis del extracto clorofórmico de *L. tridentata*

EFFECTO ESPOROCIDA DE EXTRACTOS

Los experimentos nos mostraron que el contacto del extracto metanólico de *Y. schidigera* con esporas de la cepa 1299 de *A. flavus* y de las dos cepas de *A. parasiticus* originó, al cabo de 13 días la incapacidad de germinación de las esporas. En el caso del extracto clorofórmico de esa misma planta, el mismo efecto ocurrió pero al quinto día. En cambio el extracto metanólico resuspendido en agua no originó pérdida en la viabilidad hasta el 13 d de exposición. Los extractos de *L. tridentata* fueron disminuyendo paulatinamente la capacidad de germinar de las esporas, aunque no totalmente, en todas las cepas analizadas (Tablas 18-23).

Extra cto	Concen (mg/mL)	Dia						
		1	3	5	7	9	11	13
Contr ol		***	***	***	***	***	***	***
YsMe	150	***	***	***	***	***	***	***
YsMe -Aq	130	***	***	***	***	***	***	***
YsClf- Ace	5	**	*	-	-	-	-	-
YsClf- Ace	10	**	*	-	-	-	-	-
GobM e	35	***	***	***	***	***	***	**
GobCl f-Ace	5	***	***	***	***	***	**	*
GobCl f-Ace	10	***	***	***	***	***	**	*

Tabla 18 Efecto de la exposición de extractos por diferente tiempo de germinación de esporas de *A. flavus* cepa 1059. (Nota: *** Abundante ** Moderado * Poco -Nulo) Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona.

Extracto	Concen (mg/mL)	Dia						
		1	3	5	7	9	11	13
Control		***	***	***	***	***	***	***
YsMe	160	***	***	***	***	***	***	***
YsMe-Aq	120	***	***	***	***	***	***	***
YsClf-Ace	5	**	*	-	-	-	-	-
YsClf-Ace	10	**	*	-	-	-	-	-
GobMe	24	***	***	***	***	***	**	**
GobClf-Ace	5	***	***	***	***	***	**	*
GobClf-Ace	10	***	***	***	***	***	**	*

Tabla 19 Efecto de la exposición de extractos por diferente tiempo de germinación de esporas de *A. flavus* cepa 1273. (Nota:*** Abundante ** Moderado * Poco -Nulo) Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona.

Extractos	Concen (mg/mL)	Dia						
		1	3	5	7	9	11	13
Control		***	***	***	***	***	***	***
YsMe	155	***	***	***	***	**	*	-
YsMe-Aq	230	***	***	***	***	***	**	*
YsClf-Ace	5	***	**	-	-	-	-	-
YsClf-Ace	10	**	*	-	-	-	-	-
GobMe	31	***	***	***	***	***	***	**
GobClf-Ace	5	***	***	***	***	***	***	**
GobClf-Ace	10	***	***	***	***	***	***	**

Tabla 20 Efecto de la exposición de extractos por diferente tiempo de germinación de esporas de *A. flavus* cepa 1299. (Nota: *** Abundante ** Moderado * Poco -Nulo) Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona.

Extractos	Concen (mg/mL)	Dia						
		1	3	5	7	9	11	13
Control		***	***	***	***	***	***	***
YsMe	150	***	***	***	***	*	-	-
YsMe-Aq	270	***	***	***	***	***	**	**
YsClf-Ace	5	***	**	-	-	-	-	-
YsClf-Ace	10	**	*	-	-	-	-	-
GobMe	50	***	***	***	***	***	***	***
GobClf-Ace	5	***	***	***	***	***	***	**
GobClf-Ace	10	***	***	***	***	***	***	**

Tabla 21 Efecto de la exposición de extractos por diferente tiempo de germinación de esporas de *A. parasiticus* cepa Su-1 (Nota: *** Abundante ** Moderado * Poco - Nulo) Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobemadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona:

Extracto	Concen (mg/mL)	Dia						
		1	3	5	7	9	11	13
Control		***	***	***	***	***	***	***
YsMe	155	***	***	***	***	**	*	-
YsMe-Aq	260	***	***	***	***	***	***	***
YsClf-Ace	5	**	*	-	-	-	-	-
YsClf-Ace	10	**	*	-	-	-	-	-
GobMe	30	***	***	***	***	***	**	*
GobClf-Ace	5	***	***	***	***	***	**	*
GobClf-Ace	10	***	***	***	***	***	**	*

Tabla 22 Efecto de la exposición de extractos por diferente tiempo de germinación de esporas de *A. parasiticus* cepa 148. (Nota: *** Abundante ** Moderado * Poco - Nulo) Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona.

Cepa	Concentración (mg/mL)	Dia		
		1	2	3
A. f. 1059	Control	***	***	***
A. f. 1059	5	**	*	-
A. f. 1059	15	-	-	-
A. f. 1059	20	-	-	-
A. f. 1273	Control	***	***	***
A. f. 1273	5	**	*	-
A. f. 1273	15	-	-	-
A. f. 1273	20	-	-	-
A. f. 1299	Control	***	***	***
A. f. 1299	5	**	*	-
A. f. 1299	15	-	-	-
A. f. 1299	20	-	-	-
A. p. Su-1	Control	***	***	***
A. p. Su-1	5	**	*	-
A. p. Su-1	15	-	-	-
A. p. Su-1	20	-	-	-

Tabla 23 Viabilidad de esporas de las cepas con diferentes concentraciones del extracto clorofórmico de *Y. schidigera*. Nota: YsMe: Extracto metanólico de *Y. schidigera*, YsMe-Aq: Extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, YsAq: Extracto acuoso de *Y. schidigera*, YsClf-Ace: Extracto clorofórmico de *Y. schidigera* resuspendido en acetona, GobMe: Extracto metanólico de *L. tridentata* (gobernadora), GobClf-Ace: Extracto clorofórmico de *L. tridentata* resuspendido en acetona.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE *L. tridentata* y *Y. schidigera*

Los diferentes sistemas de solventes utilizados para la purificación del compuesto activo de los extractos nos mostraron diferente bandeo según el extracto, los resultados se muestran en la tabla 24, en donde las bandas se refieren por su Rf.

Sist. eluente	YsClf	YsMe	Gobclf	GobMe
Cloroformo	0.93-1.0	0	0.13, 0.28, 0.37 0.44, 0.49, 0.55	0, 0.53, 0.59 0.64, 0.67
Clf-Me 1:1	0.53-1.0	0.83-0.97	0.72-1.0	0.49, 0.67-1.0
Clf-Ace-Me 1:1:1	0.49-0.79	0.36-0.61	0.76-0.97	0.91-0.97
Clf-Ace-Me 2:1:1	0.18, 0.41, 0.71, 0.93	0-0.14	0.76-1.0	0.86-1.0
Clf-Ace-Me 3:1:1	0.34, 0.68-0.96	0-0.14, 1.0	0.66-1.0	0.82-0.96
Clf-Ace-Me 1:1:2	0.65-0.91	0.65-0.91	0.65-1.0	0.91-1.0
Clf-Ace-Me 1:1:3	0.63-0.94	0.67-0.94	0.81-1.0	0.94-1.0
Benceno	0	0	0, 0.13, 0.2 0.22, 0.22, 0.26, 0.35	0, 0.17, 0.21 0.2
Ben-Me 1:1	0-0.27, 0.47-0.8	0.47-0.67	0.74-1.0	0.62, 0.88-1.0
Ben-Ace-Me 1:1:1	0-0.13, 0.51-0.96	0.45-0.66 0.89-0.96	0.68-0.90 0.96-1.0	0.86-1.0
Ben-Ace-Me 2:1:1	0.36, 0.61, 0.83-0.96	0-0.13, 0.77-0.90	0.61, 0.70, 0.77-0.96	0.1, 0.24, 0.83, 0.92
Ben-Ace-Me 3:1:1	0-0.4, 0.53, 0.73, 0.93	0-0.86	0.08, 0.16, 0.24 0.48, 0.67, 0.83 0.88, 0.94, 0.99	0.08, 0.16, 0.68, 0.75 0.83, 0.88 0.94, 0.98
Ben-Ace-Me 1:1:2	0-0.26 0.73-0.93	0.66-0.93	0.76-1.0	0.93-1.0
Ben-Ace-Me 1:1:3	0.57-0.86	0.28-0.78	0.57-1.0	0.78-1.0

Tabla 24 Efectividad de los sistemas de eluente utilizados para la purificación de los compuestos activos de los extractos metanólico y clorofórmico de *Y. schidigera* y *L. tridentata*

El sistema de eluente que nos brindó la mejor resolución de bandas para los extractos de gobernadora fue el Benceno:Acetona:Metanol 3:1:1, el cual nos mostró el siguiente perfil al observarlo en la luz UV:

Extracto clorofórmico		Extracto metanólico	
Rf	Color a luz UV	Rf	Color a luz UV
0.99	Guinda	0.98	Rojo
0.94	Rojo	0.94	Azul
0.88	Morado-café	0.88	Morado-café
0.83	Verde	0.83	Verde
0.67	Verde claro	0.75	Verde
0.48	Rojo	0.68	Verde claro
0.24	Rojo	0.16	Verde
0.16	Verde	0.08	Azul
0.08	Azul		

Tabla 25 Perfil de bandas de los extractos de gobernadora utilizando como eluente el sistema Benceno-Acetona-Metanol 3:1:1

Todas las bandas obtenidas de todos los extractos fueron probadas para determinar su actividad antifúngica contra *A. flavus* y *A. parasiticus*.

En el caso de los extractos de gobernadora, la banda que contenía el compuesto activo resultó ser la banda morado-café con un Rf de 0.88 en el sistema de eluente Ben-Ace-Me 3:1:1. Esta fracción se purificó en dos ocasiones en cromatografía en capa fina, en una utilizando el mismo eluente y en la última utilizando sólo cloroformo. Con ello se obtuvo el compuesto activo que presentó las siguientes características físicas:

Granos irregulares color café a café verdoso, soluble en etanol, metanol y cloroformo, con un punto de fusión de 82 a 87°C. Al someterlo al espectro de luz UV,

las longitudes de onda que nos mostraron absorción fueron: 240-226 y 290- 270 nm, por lo que se propone que el compuesto activo de la gobernadora sea el ácido guaiarético.

Por la complejidad de la fracción en cuanto a sus constituyentes, al extracto metanólico de *Y. schidigera*, se le realizó una extracción para obtener la fracción con saponinas. Una vez fraccionado el extracto (una fracción con saponinas y otra sin saponinas), se les realizó la prueba para determinar cuál era la fracción con propiedades antifúngicas, la cual resultó ser la fracción con saponinas. Por lo que se analizaron otros sistemas de eluentes para esta fracción y para el extracto clorofórmico de la misma planta. Los resultados se muestran en la tabla 26.

Sist. eluente	YsClf	Fracción con saponinas (YsMe)
BuOH-MeOH 1:1	0.36-0.74, 0.90-1.0	0.15, 0.25, 0.37, 0.5-0.75
BuOH-MeOH 2:1	0.38-0.55, 0.55-0.76 0.76-0.89, 0.89-1.0	0.2-0.38, 0.62-0.81
BuOH-MeOH 4:1	0.68-1.0	0.72-1.0
BuOH-MeOH 10:1	0.83-1.0	0.94-1.0

Tabla 26 Sistemas de eluentes utilizados para la cromatografía del extracto clorofórmico y de la fracción con saponinas de *Y. schidigera*

A cada una de las bandas se les hizo el análisis para determinar sus propiedades antifúngicas, en el cual, las bandas con Rf de 0.55-0.76 y 0.89-1.0 del extracto clorofórmico de *Y. schidigera* presentaron inhibición del crecimiento de las cepas utilizadas así como también las bandas con Rf de 0.15 y 0.5-0.75 de la fracción butanólica conteniendo saponinas de esta misma planta.

DISCUSION

En nuestra investigación, determinamos la actividad antifúngica de 28 plantas utilizando los extractos obtenidos con diferentes solventes con polaridad ascendente, las plantas que presentaron esta actividad fueron: *Y. schidigera* en su fracción acuosa, metanólica y clorofórmica, y *L. tridentata* utilizando los extractos metanólico y clorofórmico.

Las cepas de *A. flavus* 1059 y 1273, presentaron una producción de aflatoxinas menor a la cepa de *A. flavus* 1299 y las dos cepas de *A. parasiticus*.

ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ANTI-FÚNGICA DE LOS EXTRACTOS

Una de las plantas suculentas más representativas de la flora de nuestro país son las del género *Yucca*, perteneciente a la familia de las liliáceas, que en zonas áridas del norte llegan a ser especies dominantes (Matuda y Piña, 1980).

Y. schidigera crece en los desiertos del suroeste de Estados Unidos y en Baja California México. Su presencia domina el paisaje de los desiertos y alcanza una altura de 3 a 4 m al cabo de 15 - 20 años (Headon *et al*, 1992).

Los extractos o preparaciones de *Y. schidigera* se utilizan en la industria refresquera como agentes saborizantes y espumantes; en la industria de cosméticos, por sus propiedades tensoactivas, y en la industria de la alimentación animal, por las mejoras en la productividad de los animales, debido a un incremento en la calidad de

la atmósfera en los edificios donde se encuentran confinados, al disminuir las concentraciones de amoníaco y ácido sulfhídrico.

Y. schidigera se caracteriza por contener una alta concentración de saponinas esteroidales entre las que destacan la sarsasaponina, la esmilagenina y la hecogenina (Kaneda et al, 1987). Los extractos de esta plantas han tenido varios usos. Se han realizado investigaciones en las que utilizan el extracto de esta planta en microorganismos del rumen para aumentar la productividad fermentativa de estos animales. (Wallace et al, 1993). Por la polaridad de las saponinas, la extracción con agua y metanol nos permite obtener a este grupo de compuestos en las fracciones acuosa y metanólica. El efecto antifúngico de estos extractos fue notable, ya que la esporulación de *Aspergillus* se vió inhibida con aproximadamente el 50% de la CMI, en ambos medios de cultivo. Sin embargo, esas CMI fueron altas comparandolas con los demás extractos probados, variando de 80 a 130 mg/mL en medio PDA y de 135 a 275 mg/mL en medio SMKY.

La CMI del extracto acuoso de *Y. schidigera* fue menor a la de los extractos metanólicos, estando en un rango de 50 a 59 mg/mL en medio PDA y de 85 a 92 mg/mL en medio SMKY. Estos rango son estrechos lo que indica que el efecto inhibitorio en todas las cepas de las dos especies probadas fue muy similar, por otro lado, el efecto colonial fue el mismo que el presentado con los extractos metanólicos, es decir, produjo una inhibición de la esporulación y el crecimiento micelial fue plumoso y con desarrollo aéreo mayor que el control.

El extracto clorofórmico de *Y. schidigera*, fue el que presentó una CMI más baja, estando en un rango de 21 a 28 mg/mL en medio PDA y de 12 a 14 mg/mL en SMKY,

la diferencia en las CMI entre los dos medios se puede deber a que el extracto clorofórmico presenta compuestos medianamente polares, por lo que la disponibilidad del mismo en un medio sólido es menor que en el líquido considerando que el hongo, en medio sólido crece sólo en la superficie.

El efecto de los extractos de *Y. schidigera* sobre la producción de aflatoxinas fue variable. El extracto metanólico, disminuyó en una unidad logarítmica la producción específica desde la concentración más baja utilizada en las cepas menos productoras de aflatoxinas (1059 y 1273), en cambio en las cepas más productoras de aflatoxinas como la 1299 de *A. flavus* y las dos de *A. parasiticus*, hubo una disminución paulatina de la productividad específica; este efecto parece ser dependiente de la cepa.

Las diferentes concentraciones del extracto acuoso tuvieron un efecto muy severo en todas las cepas disminuyendo una y hasta dos unidades logarítmicas en la productividad específica de aflatoxinas como en el caso de las cepas de *A. parasiticus*. En el caso del extracto clorofórmico se mostraron diversos grados de inhibición de la productividad específica. Sin embargo en la cepa 1273 las concentraciones menores del extracto presentaron una estimulación en la producción de aflatoxinas. Este fenómeno se ha reportado anteriormente por Masood y Ranjan (1990), Ansari *et al* (1991) y Bilgrami (1992). Se sugiere que el incremento en la síntesis de aflatoxinas puede presentarse cuando las esporas y/o micelio se encuentran bajo un estrés subletal causado ya sea por compuestos orgánicos (Masood y Ranjan, 1990) o bien por la acción de extractos de plantas (Ansari *et al*, 1991)

El género *Larrea* se compone de 4 especies sudamericanas y una norteamericana, perteneciente a la familia Zygophyllaceae, se distribuída en zonas

áridas y semiáridas. Las especies *L. cuneifolia* (tetraploide $n = 26$), y *L. ameghioi* (diploide $n = 13$) son específicas de Argentina, *L. nitida* (diploide $n = 13$) se encuentra tanto en Chile como en Argentina, *L. divaricata* (diploide $n = 13$) se encuentra principalmente en Argentina y Chile, con algunas pocas poblaciones aisladas en Perú y Bolivia. La quinta especie, *L. tridentata* se encuentra sólo en norteamérica, diploide ($n = 13$) en el desierto chihuahuense, tetraploide ($n = 26$) en la zona más árida del desierto sonorense y hexaploide ($n = 39$) en el desierto de Mojave (Mabry y Bohnstedt, 1981)

De las muchas plantas de las zonas áridas, las especies de gobernadora son las más químicamente diversas. Este género produce ceras complejas, cientos de compuestos volátiles, saponinas y otros-triterpenos, una gran cantidad de fenoles incluyendo muchas agliconas y glicósidos flavonoides y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Mabry y Bohnstedt, 1981)

La extracción con solventes orgánicos permite obtener fracciones con diferentes compuestos que componen su resina. Hurtado *et al* (1981), reporta que la resina de *L. tridentata* tiene propiedades fungicidas contra organismos de importancia fitopatológica como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Pythium spp.* En este trabajo se demostró que esta actividad también se presenta contra hongos saprófitos deteriorantes de alimentos y productores de micotoxinas como *A. flavus* y *A. parasiticus*.

La inhibición del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* con los extractos de *L. tridentata* se obtuvo completamente a concentraciones relativamente bajas, teniendo que en medio PDA, éstas se encontraron en un rango de 7 a 16 mg/mL, siendo el

extracto clorofórmico más efectivo. En general, las cepas de *A. parasiticus* necesitaron una mayor concentración del extracto, aunque estadísticamente no se encontró una diferencia significativa entre las cepas. Las concentraciones mínimas necesarias para la inhibición total del hongo en medio SMKY fueron más altas que las observadas en el medio PDA, estando en un rango de 10 a 50 mg/mL. El efecto de los extractos en concentraciones menores a la mínima inhibitoria, fue de una disminución del crecimiento micelial, así como un desarrollo fragmentado sin formar anillo en el matraz mientras que la esporulación no se vio afectada.

Con respecto a la productividad específica de aflatoxinas por las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, los efectos causados por los extractos metanólico y clorofórmico de *L. tridentata* fueron diversos. En las cepas de *A. parasiticus*, los dos extractos disminuyeron paulatinamente la productividad específica de aflatoxinas, en las cepas 1059 y 1299 de *A. flavus*, estos extractos inhibieron en una unidad logarítmica la productividad específica, en cambio, en la cepa 1273, el efecto del extracto clorofórmico fue de mantener la misma productividad específica, al disminuir de igual manera el crecimiento y la producción de aflatoxinas, sin embargo, el extracto metanólico hizo que la productividad específica se viera estimulada en las concentraciones más bajas (2,4,8 mg/mL), mientras que en las concentraciones mayores (12 y 14 mg/mL), se observó una disminución drástica de la misma.

EJECTO ESPOROCIDA DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS

El extracto metanólico de *Y. schidigera* resuspendido en agua, aparentemente no causó alguna afección a las esporas, y permitió un 100% de germinación, esto mismo se observó cuando trabajamos con el extracto metanólico de esta planta, resuspendido en metanol en las cepas 1059 y 1273 de *A. flavus*, no así con la cepa 1299 de esta especie y las dos cepas de *A. parasiticus* en las cuales se perdió totalmente la capacidad de germinación al cabo de 13 días. Este comportamiento se puede deber a que la susceptibilidad de las esporas no es generalizada para cepas de una misma especie o entre especies de un mismo género.

Los extractos de *L. tridentata* mostraron una pérdida gradual de la germinación de las esporas al paso del tiempo, siendo que a los 13 días, se perdió entre un 50 y un 75%.

Con el extracto clorofórmico de *Y. schidigera*, se perdió la capacidad germinativa a los 3 días de mantenimiento del extracto con las esporas. Esto motivó a determinar la concentración capaz de inhibir la germinación de esporas a las 24 h. Ya que la concentración mínima del extracto que inhibía el crecimiento fue calculada de entre 12 y 15 mg/mL en medio SMKY, utilizamos las concentraciones de 5, 15 y 20 mg/mL del extracto, observando que una concentración de 15 mg/mL fue capaz de inhibir la germinación de esporas a las 24 h de contacto.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

A los extractos metanólico y acuoso de *Y. schidigera*, se les realizó una técnica de extracción de saponinas con butanol (Headon et al, 1992). Se determinó la actividad antifúngica las dos fracciones obtenidas, siendo la fracción butanólica (saponinas) la que mantenía la propiedad antifúngica. Esto concuerda con estudios realizados con microorganismos del rumen, en donde la fracción del extracto de *Y. schidigera* que tenía la actividad antibacterial contra microorganismos del rumen era la que contenía precisamente a las saponinas (Wallace et al, 1993). La acción antifúngica de saponinas se atribuye a su capacidad de formar complejos con los esteroides de membrana resultando en una pérdida de la integridad de la membrana de los hongos (Bowyer et al en 1995). Por lo que las saponinas obtenidas de *Y. schidigera* podrían tener esta misma acción en contra de *A. flavus* y *A. parasticius*.

Al analizar las propiedades antifúngicas de los extractos clorofórmico y metanólico de *L. tridentata*, obtuvimos una mayor inhibición con el extracto clorofórmico. Cuando se aislaron los compuestos activos de cada extracto, encontramos similitudes entre los, ya que presentaban el mismo R_f , las mismas características de color en luz y luz UV, y al correrlas en un mismo punto finalmente aparecía una sola mancha, sin embargo, éste se encontraba en mayor proporción en el extracto clorofórmico. Esto nos lleva a pensar primero que es el mismo compuesto y que la naturaleza del compuesto debe ser de polaridad intermedia, ya que fue más efectiva su extracción utilizando cloroformo como solvente.

Hurtado *et al*, al intentar aislar los componentes de la resina de *L. tridentata* responsables de la actividad antifúngica, obtuvo varios lignanos y flavonoides. El compuesto que aislamos con actividad antifúngica, por sus características físicas, punto de fusión y absorbancia en espectrómetro de luz UV, cae dentro del grupo de los lignanos, por lo que creemos que se trata de algún derivado de NDGA, ya que el rango de absorción de lignanos es de 230-240 nm y 280-290 nm, mientras que el compuesto aislado presentó un rango de absorbancia de 226-240 nm y 270-290 nm. Al realizar los análisis espectroscópicos de infrarrojo, obtuvimos la confirmación de que el compuesto activo de *L. tridentata* con propiedades antifúngicas era el ácido guaiarético.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, llegamos a las siguientes conclusiones:

Los extractos de *Y. schidigera* y *L. tridentata* obtenidos con diferentes solventes presentaron actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas 1059, 1273 y 1299 de *A. flavus* y las Su-1 y 148 de *A. parasiticus* en los dos medios usados.

De los extractos de *Y. schidigera* obtenidos, el clorofórmico fue el mas efectivo al inhibir el crecimiento de las cepas analizadas, mientras que el metanólico fue el menos activo.

Los extractos de *L. tridentata* fueron en general los antifúngicos más efectivos en comparación con los de *Y. schidigera*, siendo el más efectivo el clorofórmico.

Los extractos de las dos plantas tuvieron diversos efectos en cuanto a la productividad específica de aflatoxinas, pero en la mayoría de los casos, las concentraciones más bajas usadas provocaron una disminución de una unidad logarítmica.

Las CMI de los extractos de *L. tridentata* fueron capaces de disminuir la germinación de las esporas de las cepas utilizadas en más de 50%, así mismo el extracto metanólico de *Y. schidigera* inhibió la germinación de las esporas al cabo de 13 días, en las cepas altamente productoras de aflatoxinas. La CMI del extracto

clorofórmico de *Y. schidigera* inhibió la germinación total de las esporas en 3 días en todas las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* usadas.

El extracto clorofórmico de *Y. schidigera* a una concentración mayor a la CMI fue capaz de inhibir la germinación de las esporas por 24 h en todas las cepas utilizadas.

La fracción acuosa y metanólica de los extractos de *Y. schidigera* con actividad antifúngica es la que contiene saponinas.

Los compuestos activos de los diferentes extractos de *L. tridentata* presentan propiedades físicas y espectrométricas similares al ácido guaiarético.

BIBLIOGRAFIA

- Amin M., F. Kurosaki and A. Nishi. 1988. Carrot phytoalexyn alters the membrane permeability of *Candida albicans* and multilamellar liposomes. *J. Gen. Microbiol.* **134**:241-246
- Ansari A.A. and A. K. Shrivastava. 1991. The effect of eucaliptus oil in growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**:75-77.
- Azzouz M. A. and L. B. Bullerman. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. *J. Food Protec.* **45**:1298-1301.
- Babic I., C. Nguyen, M.J. Amiot and S. Aubert. 1994. Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast. *J. Appl. Bacteriol.* **76**:135-141.
- Badii F. and M. O. Moss. 1988. The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**:37-39
- Bailey G. S., R.L. Price, D.L. Park and J.D. Hendricks. 1994. Effect of ammoniation of aflatoxin B1 contaminated cottonseed feedstock on the aflatoxin M1 content of cows' milk and hepatocarcinogenicity in the trout bioassay. *Food Chem. Toxicol.* **32**:707-715.

- Betto P., C. G. Casino, R. G. Gabriele, G. Grandolini and F. Menichini. 1988. Estudio sistemático de los componentes menores de la *Artemisia arborescens* L. (Compositae). Rev. Latinam. Quím. 19:40-42.
- Bilgrami K. S., K. K. Sinha and A. K. Sinha. 1992. Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol & onion & garlic extracts. Indian J. Med. Res. 96:171-175.
- Boundra H., J. Lebars, P. Lebars and J. Dupuy. 1994. Time of *Aspergillus flavus* and aflatoxin formation ripening of figs. Mycopathol. 127:29-33.
- Bowyer P., B. R. Clarke, P. Lunness, M. J. Daniels and A. E. Osbourn. 1995. Host range of plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. Science. 267:371-374
- Bragulat M. R., M. L. Abarca, M. T. Bruguera and F. J. Cabañes. 1991. Dyes As Fungal Inhibitors: effect on colony diameter. Appl. Environ. Microbiol. 57:2777-2780
- Brantner A. and E. Grein. 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. J. Ethnopharmacol. 44:35-40.
- Brousslis A. M., G. E. Ferraro, C. M. vanBaren, C. V. Muschetti and J. D. Coussio. 1988. Compuestos polifenolicos aislados de *Conyza bonariensis* (Compositae). Rev. Latinam. Quím. 19:141-143
- Bulleman L. B. 1974. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. J. Food Sci. 39:1163-1165

- Bullerman L. B., F. Y. Lieu and S. A. Seier. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* **42**:1107-1109
- Cáceres A, A. Alvarez, A. Ovando and B. Samayoa. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **31**:193-208.
- Cáceres A, O. Cano, B. Samayoa and L. Aguilar. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders, screening of 84 plants against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* **30**:35-73
- Cáceres A, E. Jauregui, D. Herrera and H. Logemann. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections 1. Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. *J. Ethnopharmacol.* **33**:277-283.
- Camis E. L., G. H. Towers and J. C. Mitchel. 1985. Natural plant chemicals. *Phytochem.* **14**:89-91.
- Carson C. F. and T. V. Riley. 1993. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**:49-55.
- Carvajal, M. 1995. Programa Federal de Control de Aflatoxinas en México. Curso Pre Congreso de Investigaciones Biomédicas. Patogenicidad de las Aflatoxinas. U.A.N.L.
- Conn K. L., L. M. Browne, J. P. Tewari and W. A. Ayer. 1994. Resistance to *Rhizoctonia solani* and presence of antimicrobial compounds in *Camelina sativa* roots. *J. Plant Biochem. Biotech.* **3**:125-130.

- Conner D. E. and L. R. Beuchat. 1984. Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.* **49**:429-434
- Chatterjee D. 1989. An effective formulation for mould- and aflatoxin-free storage of corn. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**:25-28
- Chung K. T., W. R. Thomasson and C. D. Wu-Yuan. 1990. Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes* by plant extracts. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:498-503
- Davison M. and Branen A. L. 1993. *Antimicrobials in Foods*. Segunda edición, Editorial Marcel Dekker, Inc.
- De Luca C., M. Picardo, R. Castoria, A. A. Fabbri, C. Fanelli and S. Passi. 1989. Superficial lipids of seeds support both *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *J. Toxicol.- Toxin Rev.* **8**(1,2):339-248
- Delaha E. C. and V. F. Garagusi. 1985. Inhibition of mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). *Antimicrob. Agent Chemo.* **27**:485-486
- Desai M. S. and S. K. Ghosh. 1989. Aflatoxin related occupational hazards among rice mill workers. *J. Toxicol.- Toxin Rev.* **8**(1,2):81-87
- De Wit J. C., S. Notermans, N. Gorin and E. H. Kampelmacher. 1978. Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *J. Food Protec.* **42**:222-224.

- Dominguez X. A. H. Sánchez, G. Espinosa, C. B. Morton, N. H. Gonzales and R. M. Puentes. 1991. Isoflavonoides bioactivos de la corteza del K'anaw te (*Piscidia piscipula*). *Rev. Latinam. Quím.* **22**(3):94-95.
- Downum K. R., S. Villegas, E. Rodriguez and D. J. Keil. 1989. Plant photosensitizers: A survey of their occurrence in arid and semiarid plants from North America. *J. Chem. Ecol.* **15**:345-355
- Eberhardt T. L. and R. A. Young. 1994. Conifer seed cone proanthocyanidin polymers: Characterization by C-13 NMR spectroscopy and determination of antifungal activities. *J. Agric. Food Chem.* **42**:1704-1708.
- El-Gammal A. and R. M Mansour. 1986. Antimicrobial activity of some flavonoid compounds. *Zentrabl. Mikrobiol.* **141**:561-565
- Elias R., A. M. Diaz, E. Vidal-Ollivier, and G. Balansard 1991. Triterpenoid saponins from the leaves of *Hedera helix*. *J. Nat. Prod.* **54**:98-103
- Eisebakhy N. A., A. M. Asaad, R. M. Abdallah, S. M. Toaima, M. S. Abdelkader and F. R. Stermitz. 1994. Antimicrobial isoflavans from *Astragalus* species. *Phytochem.* **36**:1387-2389.
- Evron R., M. Guizie, U. Zehavi and I. Polachech. 1990. Activity of compound G2 isolated from alfalfa roots in experimental dermatophyte infection. *Antimicrob. Agen. Chemother.* **34**:1600-1601.
- Farag R. S., Z. Y. Daw, and S. H. Abo-rya. 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.* **54**:74-76

- Farnsworth N. 1982. Sobre la preparación de extractos de plantas para su evaluación farmacológica. *Med. Trad.* 11:27-33
- Ginesta-Peris E., F. J. García-Breijo and E. Primo-Yúfera. 1994. Antimicrobial activity of xanthatin from *Xanthium spinosum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 18:206-208.
- Gollapudi S. R., H. Telikepalli, H. B. jampani, Y. W. Mirhom, S. D Drake, K. R. Bhattiprolu, D. Vandervele, and L. A. Mitscher. 1994. Alectosarmentin, a new antimicrobial dibenzofuraniod lactol from the lichen, *Alectoria sarmentosa*. *J. Nat. Prod.* 57:934-938.
- Goldblatt L. A., 1969. Aflatoxin: scientific background, control and implications. Academic Press. New York y London.
- Gray, F. A, W. F. Faw and J. L. Buotwell. 1982. The 1977 Corn-aflatoxin epiphytotic in Alabama. *Plant Disease.* 66:221-222.
- Guerrero C., G. Campos and J. Taboada. 1988. Estudio químico de *Eupatorium brevipes* y algunas actividades biológicas de la brevipenina. *Rev. Latinam. Quím.* 19:147-149.
- Guzmán, D. 1994. Influencia del genotipo de maíz en la expresión genética de síntesis de aflatoxina por *Aspergillus flavus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.
- Headon D. R., K. Buggle, A. Nelson and G. Killen. 1992. Glicofracciones de la planta de yucca y su aplicación en el control de amoniaco in *Biotechnología de la nutrición animal*. Vol. 3. Apligén S.A. de C.V. México

- Hurtado L., R. Hernández, F. Hernández and S. Fernández. 1981. Fungi-Toxic compounds in the *Larrea* Resin. Campos E., T.J. Mabry y S. Fernandez (ed) *Larrea*. 2da edición CONACYT, México.
- Igólfsdóttir K., S. F. Bloomfield and P. J. Hylands. 1985. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **28**:289-292
- Jassen A. M., J. J. C. Scheffer and A. Baerheim. 1986 Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986. literature review aspects of the test methods. *Planta Medica.* **49**:150-153
- Jimenez F. and Valle P. 1981. Curative fungicides field evaluation in Campos E., T.J. Mabry y S. Fernandez (ed)-*Larrea*. 2da edición CONACYT, México.
- Johnson M. G. and Vaughin R. H. 1969. Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Appl. Microbiol.* **7**:903-905.
- Johri T. S. and V. R. Sadagopan. 1989. Aflatoxin occurrence in feedstuffs and its effect on poultry production. *J. Toxicol. - Toxin Rev.* **8** (1,2):281-287
- Juan-López M., Carvajal M. and Ituarte B. 1995. Supervising Programme of Aflatoxins in Mexican Corn. *Food Additives and Contaminants.* **12**: 297-312
- Kaneda N., H. Nakanishi and J. Staba. 1987. Steroidal constituents of *Yucca schidigera* plants and tissue cultures. *Phytochem.* **26**:1425-1429.
- Kobayashi A., Y. Koguchi, H. Kanzaki, S.I. Kajiyama and K. Kawazu. 1994. A new type of antimicrobial phenolics produced by plant peroxidase and its

- possible role in the chemical defense systems against plant pathogens. *J. Bioscienc.* **49**:411-414.
- Kumar S. and G. Prasad. 1992. Efficacy of medicinal plant (*Andrographis peniculata*) extract on aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**:131-132.
- Kumar S. and A. K. Roy. 1993. Occurrence of aflatoxin in some liver curative herbal medicines. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**:112-114
- Linton C. J. and S. L. Wright. 1993. Volatile organic compounds: microbiological aspects and some technological implications. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:1-12.
- Lopes L. M., V. S. Bolzani and L.M. Trevisan 1988. Lignans from brazilian Aristolochiaceae. *Rev. Latinam. Quím.* **19**:113-117.
- Mabry T.J., D.R. DiFeo, M. Sakakibara, C.F. Bohnstedt and D. Siegler. 1977 The Natural Products Chemistry of *Larrea*, in Downen Hutchinson and Ross (ed) *Creosote Bush. Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts.* Pennsylvania E. U. A.
- Mabry T. J. and C. F. Bohnstedt. 1981 *Larrea: A Chemical Resource*, in Campos E., T.J. Mabry y S. Fernandez (ed) *Larrea*. 2da edición CONACYT, México.
- Mahoney N. E. and Rodriguez S. B. 1996. Aflatoxin variability in pistachios. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(4):1197-1202
- March C., I. Sanz and E. Primo. 1991. Antimicrobial activities on mediterranean plants. *Zentralbl. Mikrobiol.* **146**:291-295.

- Martino V., S. Caula, S. Villar, G. Farrar and J. Coussio. 1988. Compuestos polifenólicos aislados de *Achyrocline tomentosa* Rusby (Compositae). *Rev. Latinam. Quím.* **19**:111-113
- Massod A. and K. S. Ranjan. 1990. The influence of fungitoxicants on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**:197-201.
- Matuda E. and L.I. Piña, 1980. Las plantas mexicanas del género *Yucca*. Serie Fernando de Alva Ixtlilxochitl. México
- Mendelson R. and Balik M. 1995. The Value of Undiscovered Pharmaceuticals in Tropical Forests. *Econom. Bot.* **49**:223-228
- Meyer M. and W. Karasov. 1989. Antiherbivore Chemistry of *Larrea tridentata*: Effects on Woodrat (*Neotoma lepida*) Feeding and Nutrition
- Mitscher L. A., R.P. Leu , M. S. Bathala, W. Wu and J.L. Beal. 1972. Antimicrobial agents from higher plants I. Introduction, rationale and methology. *Planta Medica* **35**:157-166.
- Moore G. S. and R. D. Atkins 1977. The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia* **69**: 341-348
- Morris A., L. Khettry and E. W. Seitz. 1978. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **56**:595-605

- Naccha Torres L., 1995. Toxicidad de las aflatoxinas. Curso pre Congreso de Investigaciones biomédicas. Patogenicidad de Aflatoxinas. U.A.N.L.
- Nguyen-the C. and B. M. Lund. 1992. An investigation of the antibacterial effect of carrot on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **73**:23-30
- Nicoletti M., M. Serafini and J. de Albuquerque. 1988. A new diterpene from *Echinolena inflexa*. *Rev. Latinam. Quím.* **19**:13-14.
- Ohashi K., H. Kojima, T. Tanikawa, Y. Okumura, K. Kawazoe, N. Tatara, H. Shibuya and I. Kitagawa. 1994. Indonesian medicinal plants. Chemical structures of gonganosides A, B and C, three new quinovic acid glycosides from the bark of *Bhesa paniculata*. *Chem. Pharmac. Bulletin* **42**:1596-1600.
- Ouf S.A., F.K.A. Hady, M.H. Elgamal, and K.H. Shaker. 1994. Isolation of antifungal compounds from some *Zygophyllum* species and their bioassay against two soil-borne plant pathogens. *Folia Microbiol.* **39**:215-221.
- Patkar K. L., C.M. Usha, H.S. Shetty, N. Paster and J. Lacey. 1993. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**:49-51.
- Pattalung P.N., W. Thongtheeraparp, P. Wiriyachita, and W.C. Taylor. 1994. Xanthones of *Garcinia cowa*. *Planta Medica.* **60**:365-368.
- Peña, S. and Durán M de C. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo.* **14**:61-73
- Pfaller M.A., M.J. Bale, B. Buschelman, and P. Rhomberg. 1994. Antifungal activity of a new triazole, DO870, compared with four other antifungal agents

tested against clinical isolates of *Candida* and *Torulopsis glabrata*. *Diagnos. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:75-80.

Polacheck I., U. Zehavi, M. Maim, M. Levy and R. Evroni 1986. Activity of compound G2 isolated from alfalfa roots against medically important yeast. *Antimicrob. Agent. Chemother.* **30**: 290-294

Prasad G. S.S. Sahay and A. Masood. 1994. Inhibition in aflatoxin biosynthesis by the extract of *Amorphophallus campanulatus* (OL) and calcium oxalate. *Lett. App. Microbiol.* **18**:203-205

Prieta J., M.A. Moreno, S. Diaz, G. Suarez and L. Dominguez . 1994. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. *J. Agricul. Food Chem.* **42**:1701-1703

Raisuddin S. 1989. Toxic responses to aflatoxins in developing host. *J. Toxicol.- Toxin Rev.* **12**(2):175-201

Ray P.K., K. P. Singh, Raisuddin and A. K. Prasad. 1991. Immunological responses to aflatoxins and other chemical carcinogens. *J. Toxicol.- Toxin Rev.* **10**(1):63-85

Recio M. C. and J. L. Rios. 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in literature 1978-1988. *Phytother. Res.* **3**(4):117-125.

Reyes Méndez C. 1995. Control de aflatoxinas en el maíz en Tamaulipas. Curso Pre Congreso de Investigación biomédica. Patogenicidad de Aflatoxinas.

- Rheeder J. P., E. W. Sydenham, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, G.S. Shepard, M. Schlecheter, S. Stockenstrom, D.E. Cronje and J.H. Viuljoen. 1994. Ear-rot fungi and mycotoxins in South African corn of the 1989 crop exported to Taiwan. *Mycopathologia* **127**:35-41.
- Rios J. L. Recio M. C. and A. Villar 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area. *J. Ethnopharmacol.* **21**: 139-152.
- Rodriguez H., L. B. Esquivel, A.A. Sánchez, C. Sánchez, J. Cárdenas and T.P. Ramamoorthy. 1989. Diterpenos abietánicos de salvas mexicanas. *Rev. Latinam. Quím.* **20**:105-110.
- Rodriguez S. 1994. Inhibition of aflatoxin production by surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:106-110
- Ross P. F., P. E. Nelson, J. L. Richard, G. D. Osweiler, L. G. Rice, R. D. Plattner and T. M. Wilson. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine Leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3225-3226
- Rovalo M. et al. 1983. La barreta o barreto *Helietta parvifolia*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa Veracruz.
- Saleem Z. M. and A. I. Delaimy. 1982. Inhibition of *Bacillus cereus* by garlic extracts. *J. Food Protec.* **45**:1007-1009
- Schoeder H. W., R. A. Boller and H. Hein. 1968. Reduction in aflatoxin contamination of rice by milling procedures. *Anal. Biochem.* **4**:574-580

- Silverstein R. M., G. C. Bassler and T. C. Morrill. 1991. Spectrometric identification of organic compounds. 5ta edición. John Wiley and Sons inc. Canada.
- Singh H. N., M.M. Prasad and K. K. Sinha. 1993. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. Lett. Appl. Microbiol. 17:269-271.
- Sinha K.K., A.K. Sinha and G. Prasad. 1993. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 16:114-117
- Suzhen L., R.R. Marquardt, A.A. Frohlich, H. Xiao and J. R. Clarke. 1994. The development of quantitative ELISA for aflatoxin B1 in ground peanuts using antibodies isolated from the yolk of a laying hen. J.Food Protec. 57:1022-1024.
- Timmermann B. N. 1977. Practical Uses of *Larrea*. The natural products chemistry of *Larrea*, IN Downen Hutchinson and Ross. Creosote Bush. Biology and Chemistry of *Larrea* in New World Deserts. Pennsylvania E.U.A
- Timmermann B. N. 1981. *Larrea*: Potential uses. IN Campos E., T.J. Mabry y S. Fernandez (ed) *Larrea*. 2da edición CONACYT, México.
- Toda M. S. Okubo, R. Hiyoshi and T. Shimamura. 1989. The bactericidal activity of tea and coffee. Lett. Appl. Microbiol. 8:123-125.

- Torres E. 1995. Historia e importancia de las aflatoxinas. Curso pre Congreso Investigación biomédica. Patogenicidad de Aflatoxinas. U.A.N.L.
- Tranter H. S., S. C. Tassou and G. J. Nychas. 1993. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol. 74:253-259.
- Tuncel G. and C. Nergiz. 1993. Antimicrobial effect of some olive phenols in a laboratory medium. Lett. Appl. Microbiol. 17:300-302.
- Yahl R., S. A. Watson, R. J. Smith and R. Barabolok. 1971. Laboratory wet-milling of corn containing high levels of aflatoxin and a survey of commercial wet-milling products. Am. Ass. Cereal Chem. 48:385-391
- Yashphe J., R. Segal, A. Breuer, and G. Erdrech-Naftali 1978. Antibacterial activity of *Artemisia herba-alba*. J. Pharm. Sci. 68:924-925.
- Ulloa-Sosa M. and H. W. Schoeder. 1969. Note on aflatoxin decomposition in the process of making tortillas from corn. Am. Ass. Cereal Chem. 46:397-400
- Van Hoof L., D.A. Vaden and A. J. Vlietinok. 1980. Screening of poplar trees for antibacterial, antifungal and antiviral activity. Biologia Plantarum. 22:265-273
- Verastegui Montemayor M. A. 1995. Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas. Tesis de Maestría. UANL. Nuevo Leon, México

Wallace R.J., Arthaud L. and C. J. Newbold, 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on Ruminant Ammonia Concentrations and Ruminant Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1762-1767

Zehavi U., O. Ziv-Fecht, M. Levy, M. Naim, R. Evron and I. Polancheck. 1993. Synthesis and antifungal activity of medicagenic acid saponins on plants pathogens: modification of saccharide moiety and the 23 substitution. *Carboh. Res.* **244**:161-169

Zeringue H.J. and D. Bhatnagar. 1994. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3543-3547

