

FIGURA 8.

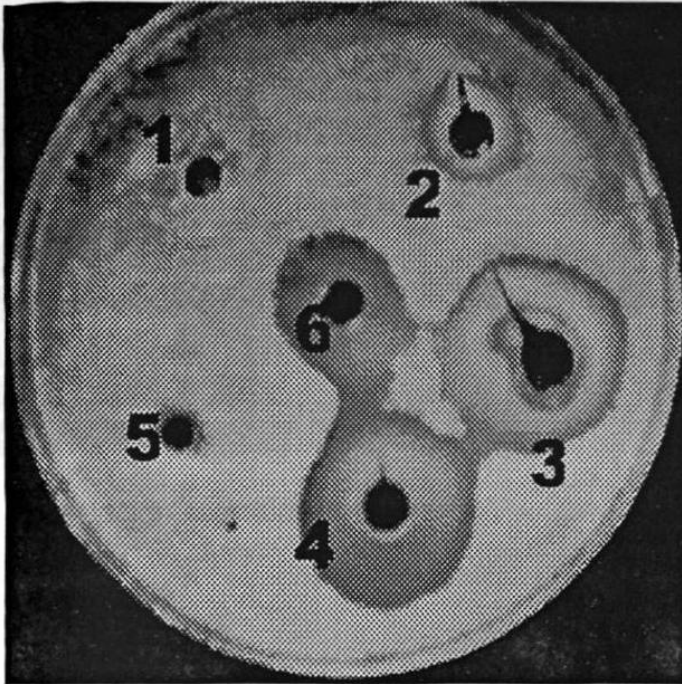
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE EXTRACTOS DE *L. TRIDENTATA*. EL EXTRACTO PURO FUE SEPARADO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA UTILIZANDO COMO ELUENTE CLOROFORMO:METANOL Y POSTERIORMENTE METANOL ABSOLUTO (REVELADAS CON SALES DE DIAZONIO).

Utilizando estas fracciones se realizó un ensayo para ubicar en cual de ellas se encontraba la actividad biológica. La fracción uno, era de consistencia aceitosa de color amarillo, mostró una inhibición temporal, solo por 4 días. Sin embargo, la actividad biológica, que permaneció por más de 7 días, se encontró en las fracciones 2, 3 y 4 (Figura 9), en donde se encuentra el NDGA. Estas fracciones mostraron halos de inhibición semejantes al control de NDGA utilizado (Tabla 18).

Se determinó la concentración que se utilizó en cada pozo, de cada una de las fracciones que se probaron (Tabla 17).

Tabla 17. CONCENTRACIÓN DE FRACCIONES EXTRAÍDAS EN COLUMNA CROMATOGRÁFICA (mg/75 μ l, APLICADAS EN UNA PRUEBA DE POSO EN AGAR.

Numero de pozo	Contenido	Concentración en 75 μ l
1	Fracción 1 (aceitosa NO NADG)	9.4
2	Fracción 2 (posee NDGA)	117.9
3	Fracción 3 (posee NDGA)	28.7
4	Fracción 4 (posee NDGA)	24.6
5	Fracción 8 (extraída con metanol, NO NADG)	3.6
6	Control (NADG)	0.8



Pozo	Fracción
1	Fracción 1
2	Fracción 2
3	Fracción 3
4	Fracción 4
5	Fracción 8
6	Control NDGA.

FIGURA 9.

HALOS INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE FRACCIONES EXTRAÍDAS DE *L. tridentata*
SOBRE *Aspergillus flavus* 1273.

Tabla 18. MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR FRACCIONES EXTRAÍDAS DE *L. tridentata* SOBRE CEPAS DE *Aspergillus*.

Cepas	Numero de fracción (mm)						Extracto crudo
	1	2	3	4	5	6	
<i>A. flavus</i> 1273	7 ± 0.7*	19 ± 1.4	27.5 ± 27.5	18 ± 0	0	13.5 ± 2.1	13 ± 0
<i>A. flavus</i> 1299	5.5 ± 0.7	10.5 ± 2.1	21.5 ± 3.5	16.5 ± 0.7	0	11 ± 1.4	11 ± 1.3
<i>A. flavus</i> 1059	5.5 ± 0.7	19.5 ± 6.3	16 ± 2.8	17.5 ± 2.1	0	13 ± 1.4	13.5 ± 2
<i>A. parasiticus</i> 148	6 ± 0	11.5 ± 0.7	21 ± 1	15.5 ± 2.1	0	11 ± 1.4	9.8 ± 1
<i>A. parasiticus</i> Sv-1	6.5 ± 0.7	13 ± 2.8	20 ± 2.8	14 ± 0	0	10.5 ± 0.7	10.5 ± 1.4

*Desviación estándar de la media.

Una vez que se ubicaron las fracciones que contenían la actividad inhibitoria y que coincidieron en contener presumiblemente el NDGA, se seleccionó aquella que por TLC mostró contener menos compuestos (visualizado por menor número de bandas). La fracción 3 fue sometida a TLC, usando como eluente cloroformo:metanol (9:1), se reveló con sales de diazonio. A estas placas se les realizó la bioautografía. Encontramos que la banda que mostró la actividad biológica correspondía a una banda revelada con sales de diazonio, la cual presumiblemente correspondía a NDGA (Figura 10 y 11). Estos resultados se presentaron al probar todas las cepas.

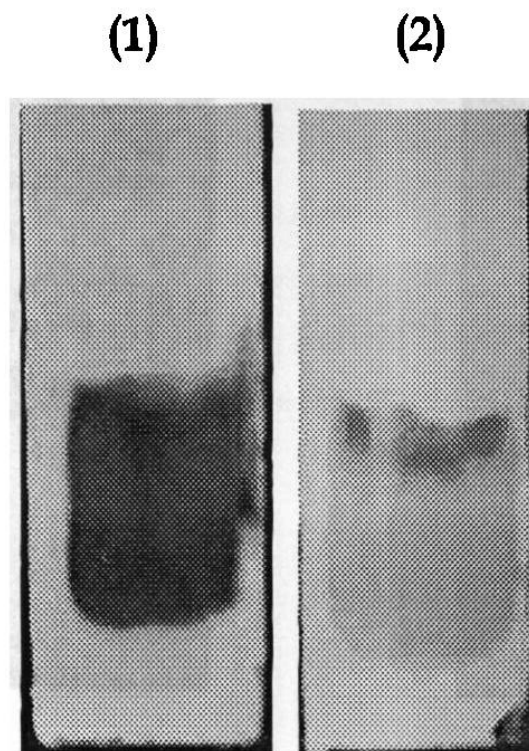


FIGURA 10.
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA FRACCIÓN 3, REVELADA CON (1) Y SIN
(2) SALES DE DIAZONIO.

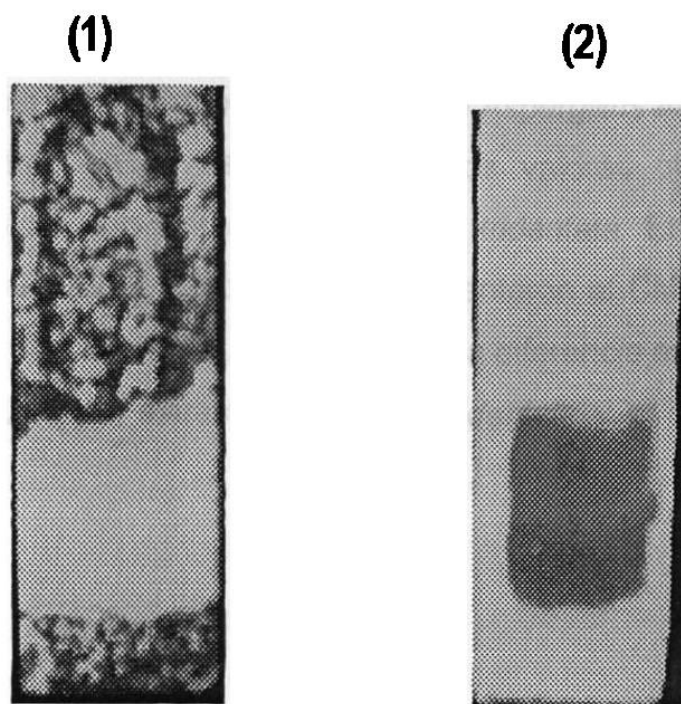


FIGURA 11.

BIOAUTOGRAFÍA DE UNA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE LA FRACCIÓN 3 DE EXTRACTO DE *L. tridentata*. (1) SITIO DONDE SE ENCUENTRA LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE *A. flavus* 1059. (2) VISUALIZACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO REVELADO CON SALES DE DIAZONIO.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ÁCIDO NORDIHDROGUAIARÉTICO (NDGA).

Se utilizó un estándar de 10 mg/ml de NDGA. Los resultados se muestran en la tabla 21. La menor CMI utilizando el NDGA fue *Aspergillus flavus* 1299, y la mayor CMI se presentó en *A. flavus* 1273, estos valores obviamente son diferentes a los obtenidos con extracto crudo de *L. tridentata*. En este caso las cepas a *A. flavus* 1299 y 1273 fueron las que presentaron el CMI más alto y *A. parasiticus* Sv-1 fue el de CMI menor. Se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre la CMI del extracto de *Larrea tridentata* y el obtenido por el NDGA puro.

Tabla 19. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO SOBRE CEPAS DE *Aspergillus* POR NDGA Y EL EXTRACTO CRUDO DE *L. tridentata*.

CMI ($\mu\text{g/ml}$)					
<i>Aspergillus flavus</i>					
1273		1299		1059	
NDGA	Extracto	NDGA	Extracto	NDGA	Extracto
0.6 \pm 0.01*	2.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0	2.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.01	2.1 \pm 0.2
<i>Aspergillus parasiticus</i>					
Sv-1			148		
NDGA	Extracto	NDGA	Extracto	NDGA	Extracto
0.5 \pm 0.02*	2.03 \pm 0.15	0.5 \pm 0.01			2.16 \pm 0.28

*Desviación estándar de la media.

DISCUSIONES.

A la fecha se tienen reportes de una gran cantidad de compuestos extraídos de plantas, los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Marchs, C. I., 1991; Aderige, B. I. *et al*, 1996), los cuales pudieran representar una fuente potencial de antimicrobianos. En la actualidad se han aislado compuestos que se han usado en la preservación de alimentos o como antibacterianos, antifúngicos, etc.

En México se tiene conocimiento del uso empírico de aproximadamente 7000 plantas; sin embargo, los reportes publicados hacen referencia casi exclusivamente al uso tradicional, mientras que la evidencia científica que valide tales usos es muy escasa. Se conoce que aproximadamente un 5% de las plantas mexicanas han sido sometidas a investigación que demuestren su actividad biológica, aunque en algunos casos, los bioensayos se realizan a nivel de extractos crudos, sin llegar al aislamiento de los principios activos puros (Martínez., 1996)

Ya desde hace tiempo se ha demostrado que algunos extractos de plantas de la zona norte de la República Mexicana presentaban efectos inhibitorios del crecimiento y la producción de aflatoxinas de hongos del género *Aspergillus* (Lozano., 1997). En este trabajo nos enfocamos a determinar el efecto de extractos de *Larrea tridentata* sobre el crecimiento y la síntesis de toxinas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Esta planta ha sido reportada que posee una gran variedad de compuestos químicos como, Aluminio, beta-caroteno, calcio, carbohidratos (60%), cloro, cobalto, grasas (3%), fibras (10%), hierro, magnesio, NDGA (ácido nordihidroguaiarético), fósforo, potasio, proteínas (10%), selenio, silicón, sodio, sulfuro y vitamina C (<http://www.ibiblio.org/london/alternative-healthcare/Southwest-School-ofBotanical-Medicine/Abstracts/Larrea-AB.txt>). Desde hace tiempo se sabe que la planta posee actividad antifúngica, contra algunas especies de *Fusarium oxosporum*, *Pytium* spp. y *Rhizoctonia solani*, también propiedades de insecticida, como agente terapéutico y anticancerígeno (Coville. 1893). Debido a que las micotoxinas sintetizadas por el género *Aspergillus* son

potentes carcinogénicos, hepatotóxicos y teratogénicos, y se encuentran invadiendo la mayoría de los productos agrícolas son consideradas un problema que puede ocasionar daños en la salud del hombre y los animales, además son considerados venenos inevitables en el alimento y no es posible predecir su presencia o prevenir enteramente su ocurrencia en los ingredientes alimenticios, antes de la cosecha y durante su almacenamiento y procesamiento (Avalos, V. M. 2001). Por tal motivo surgió nuestra inquietud por analizar el efecto de esta planta en el crecimiento y la síntesis de toxinas de *Aspergillus*.

En la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se utilizó caldo Czapec-Dox y A&M (Mateles y Adye). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de un medio a otro, observándose un mayor CMI en caldo Czapec-Dox. Pensamos que esto pudiera deberse a que el Czapec-Dox es un medio enriquecido para el crecimiento del hongo, y ha sido utilizado para determinar la morfología colonial ya que favorece su crecimiento (Guthrie, W. D. et al. 1982; Richard, J. L. et al. 1991). En contraste el medio A&M es utilizado para la producción de aflatoxinas (Wheeler, H. M. et al. 1995). Esto se comprobó en nuestro trabajo, debido a que no se detectó la presencia de aflatoxinas en este medio.

El medio A&M posee nutrientes que son básicos en la estimulación de la síntesis de aflatoxinas, como el sulfato de zinc, y es cual no se encuentra en el medio Czapec-Dox, ya que se ha reportado a este metal como cofactor necesario para el crecimiento celular y la formación de aflatoxinas (Davis, N. D. et al. 1965; Ehrlich Bennett, et al. 1979; K. et al. 1984; Niehaus, et al. 1984). Se ha reportado que la máxima producción de aflatoxinas por *A. flavus* se da en un medio que contiene 0.8 mg de zinc por litro (Lee, et al. 1966) Sin embargo, el requerimiento mínimo de este cofactor para la producción de aflatoxinas es 0.4 µg/ml (Mateles and Adye 1965). Un incremento en el contenido de zinc en el medio de 0 a 10 µg/ml da por resultado un aumento de 30 a 1000 veces en la producción de aflatoxinas, pero a 25 µg de zinc por ml disminuye la producción (Marsh, et al. 1975). Por otro lado, se ha establecido que el medio Czapec-Dox contiene

nutrientes diferentes del A&M, tal como el nitrato de sodio y el cloruro de potasio, tales sales quizá estimulen al sobre-crecimiento del hongo.

También se encontró que la CMI en maíz, fue aproximadamente 9 veces más elevada que en medio A&M, esto pudiera ser debido a que se ha reportado que el maíz es un sustrato satisfactorio para el crecimiento y producción de aflatoxinas por *Aspergillus* (Trenk, L. H. *et al.* 1970), o bien a que la homogeneidad en la distribución del inhibidor no es apropiada.

Para la determinación de aflatoxinas en maíz y medio A&M se realizaron curvas de calibración con aflatoxinas estándar de B₁, B₂, G₁ y G₂, y se determinaron los límites de confianza para el tiempo de retención en cada estándar; AFG1 de 3 ± 0.1 , AFG2 de 6.2 ± 0.04 , AFB1 de 5.2 ± 0.6 , AFB2 de 8.5 ± 0.3 , a fin de que aquellos picos del cromatograma que cayeran dentro de estos límites fueron consideradas como tal. Cabe mencionar que los límites de detección para aflatoxinas en HPLC es de 1 ppb (ng/ml) para la aflatoxina G1 y 0.5 ppb (ng/ml) para las otras (www.daltonics.bruker.com).

Los trabajos publicados sobre el combate de hongos aflatoxigénicos con productos naturales en su mayoría utilizan aceites esenciales (Ansari y Shrivastava, 1991; Picman *et al.*, 1992; Sinha *et al.*, 1993) y muchos de éstos son efectivos inhibidores del crecimiento, algunos contiene aldehído cinámico y eugenol. Kumar y Prasad (1992) trabajaron con extractos de plantas medicinales y registraron que uno de los extractos de *Andrographis peniculata* planta original de la India, presentó una máxima inhibición del 71.5% en el crecimiento micelial de *A. flavus*, porcentaje mayor que el obtenido por Bilgrami *et al.*, (1992) al utilizar extractos de ajo y cebolla para inhibir el crecimiento de *A. flavus* al observar que la máxima inhibición de micelio fue del 62% con el extracto de ajo, sin embargo, en 1998 en Sonora se realizó un trabajo con extracto de *Larrea tridentata*, y *Proboscidea parviflora*, y observaron que extracto extraídos con diclorometano de *L. tridentata* inhibieron un 86% el crecimiento micelial, y el otro inhibió solo el 19%, el efecto para *L. tridentata* en este estudio fue similar al reportado por Faraga *et al.*, (1989) al utilizar aceites esenciales de diferentes especies de plantas para el control de este hongo, los aceites de tomillo, comino, clavo y canela fueron los

aceites que inhibieron el crecimiento micelial del hongo entre 80 y 90%. Podemos considerar nuestro trabajo con mejor potencial de inhibición con referente al reportado en Sonora, ya que ellos utilizaron 500 μg del extracto en 50 ml de medio (ppm), esto quizá debido al tipo de extractor que utilizaron o al medio de cultivo utilizado, ya que nosotros encontramos una inhibición de 2 a 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En este trabajo reportamos diferencias estadísticamente significativas en las producción de aflatoxinas en medio A&M entre las 5 cepas de *Aspergillus*, y entre el control de cada cepa y el porcentaje de la CMI utilizado, sin embargo, todas las cepas sintetizaron toxinas hasta el 25% de la CMI y el crecimiento del hongo se vió afectado hasta el 50% de la CMI en donde se dió una reducción aproximada del 50% del peso seco del micelio comparado con el control, en tanto que al 75% no se observó crecimiento. En nuestros ensayos la cepa más sensible fué *A. flavus* 1059 ya que solo produjo aflatoxinas en el control, y la cepa que mas sintetizó aflatoxinas fue *A. flavus* 1299. Se tiene reportes de inhibición de la producción de aflatoxinas por extractos de plantas por ejemplo los reportado por Bilgrami, *et al.*, (1992), al informar que extractos acuosos de cebolla inhibieron la producción de aflatoxinas en *A. flavus* en un 60%, porcentaje similar a los obtenidos con diclorometano de *B. glutinosam*, *Ch. ambrosiodes* y *L. tridentata*, los cuales inhiben 64% y 43% para el hongo (Vargas-Arispuro, *et al.*, 1998). Cabe mencionar que no todos los extracto actúan como inhibidores de la síntesis de aflatoxinas, ya que existen extractos que detienen la producción en los primeros días de desarrollo, pero después llegan a sintetizar el doble, comparado con la cepa utilizada como control (sin extracto), por ejemplo los realizados por Ansari y Shivastava (1991) al observar que el aceite eucalipto (*Eucalyptus maculata*) Baker, inhibía la producción de aflatoxinas en *A. flavus* hasta el sexto día, pero en los días siguientes se incrementó la producción que superó la concentración del control, por lo que fue considerado como promotor de la producción de aflatoxinas para este hongo. También se tiene reportes del efecto de *Ch. ambrosiodes* y *B. glutinosam* en *A. parasiticus* en donde se reportan inhibiciones del 100% y 98% respectivamente (Vargas-Arispuro, *et al.*, 1998). Sin embargo, existen extractos que reducen el crecimiento micelial pero activan la formación de aflatoxinas como

el observado por Patkay *et al.*, (1993) al observar que el aceite de canela y cardamo reducían el crecimiento micelial de *A. parasiticus* en 50% y estimulaban la producción de aflatoxinas, resultado similares con *P. parviflora* y *E. eriantha* contra el mismo hongo.

Cuando analizamos la producción de aflatoxinas en maíz también hubo diferencias significativas. Las cepas que produjeron aflatoxinas hasta el 75% de la CMI fueron *A. flavus* 1273, 1059 y *A. parasiticus* 148, siendo la más resistente *A. flavus* 1059, ya que solo redujo su producción de aflatoxinas al 90%, en *A. flavus* 1273 al 99.59% y *A. parasiticus* 148, 96.4%. Los más sensibles fueron *A. flavus* 1299 y *A. parasiticus* Sv-1, esto debido a que el maíz no posee substratos que son requeridos por algunas cepas como el caso de *A. flavus* 1059, la cual no tuvo una buena síntesis de aflatoxinas en medio A&M. Se realizó la cuantificación de aflatoxinas en maíz sin inocular y no se detectó la presencia de aflatoxinas.

En la literatura se reportó que los genotipos de maíz exhiben diferentes niveles de susceptibilidad para el ataque de hongos y la producción de aflatoxinas comunes en almacenamiento, como *A. flavus*, esto sugiere la posibilidad de una respuesta similar en el caso de la producción de aflatoxinas (Cantone, F. A. *et al.*, 1983; Moreno-Martinez, E. *et al.*, 1978). Priyadarshini, *et al.*, observo diferencias en la respuesta de variedades de maíz en el crecimiento fúngico y la acumulación de aflatoxinas, estas diferencias han sido asociadas con sus características cualitativas de los genotipos (Priyadarshini, E. *et al.*, 1978). Zuber *et al.*, demostró que la aflatoxina B₁ fue producida en bajas concentraciones en híbridos de maíz y en altas concentraciones en cruza de maíz de la variedad OH-545 con híbridos (Zuber, M. S., *et al.*, 1978). LaPrade y Manwiller (1999) inocularon 9 híbridos de temporada corta con suspensión de esporas de *A. flavus* a través de la cáscara, y la concentración de aflatoxinas varió de 88 a 145 µg/kg y las diferencias entre los híbridos fueron significantes, también evaluaron 27 híbridos de temporada larga y encontraron que la diferencia en la concentración de aflatoxinas fue de 0 a 46 µg/kg, siendo significantes. Por lo tanto, el híbrido H-437 cae dentro de los híbridos de maíces susceptibles, en cuanto al crecimiento y la acumulación de

aflatoxinas por las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que se utilizaron en este trabajo.

Sin embargo, hay que señalar que los resultados no son consistentes y hay contradicciones en cuanto a la respuesta de los genotipos en la producción de aflatoxinas, existiendo variaciones de año a año y de localidad a localidad, lo cual no permite hacer recomendaciones sobre el uso de determinados híbridos. Además, de que en campo intervienen una serie de factores que al interactuar hacen que este problema biológico sea muy complejo. En este fenómeno están involucrados los genotipos del maíz y del hongo, y el medio ambiente. Este último con todas las implicaciones posibles; cambios climáticos, edáficos, la relación entre las enfermedades, los insectos y los hongos; y por supuesto, la relación hospedero-patógeno, de la cual poco se sabe.

Cuando analizamos el extracto de *L. tridentata*, determinamos que es un solo compuesto el responsable de la actividad biológica, y establecimos que este es un compuesto polar, y una vez ubicado que el NDGA confería la actividad antifúngica al extracto de la gobernadora, se realizó la CMI utilizando una solución estándar del compuesto (10mg/ml). Se pensó que por utilizar el NDGA como tal, se tendría una CMI significativamente menor que al utilizar el extracto de *Larrea tridentata*, pero se encontró que la CMI fue el 25% de la determinada con el extracto, esto quizá por la presencia de otros compuestos, ya que se realizaron pruebas químicas de algunas otras fracciones y se encontraron flavonoides por la reacción química de Shinoda, la cual es positiva al dar una coloración roja cuando reaccionar el ácido clorhídrico y limaduras de magnesio con los flavonoides (<http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/secprod/se00008.htm> (ligninasbiosíntesis), por lo que se sugiere que están en conjunto el NDGA, y los demás compuestos para dar esa CMI en el extracto (Tabla 21).

CONCLUSIONES.

* *Larrea tridentata* inhibe el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* tanto *in vitro* como en condiciones simuladas a almacén.

*El compuesto responsable de la actividad antifúngica muestra características similares al ácido nordihidroguaiarético (NDGA).

LITERATURA CONSULTADA

1. Ainhsworth, G. C., and P. K. C. Austwick. 1973. Fungal diseases of animals, 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, U. K.
2. Allameh, A. 1997. Comparison of the effect of low and high dose dietary butylated hydroxytoluene on microsome-mediated aflatoxin B₁-DNA binding. *Cancer Lett.* 114:217-220.
3. Andriole, V. T. 1993. Infections with *Aspergillus* Species. *Clin infect. Dis* 17 (Suppl2) S481-S486
4. Athukoralage, P. S., H. M. Herath., S. A. Deraniyagala., R. L. Wijesundera and P. A. Weerasinghe. 2001. Antifungal constituent from *Gordonia dessanayakei*. *Fitoterapia.* 72(5):565-567.
5. Badria, F. A., S. Li, and W. T. Shifer. 1996. Fumonisin as potential cause of kidney disease. *J. Toxicol.* 15(3): 273-292.
6. Beuchat, L. R. and Golden D. A. 1989. Antimicrobials Occurring Naturally in foods. *Food Thechnology, Symposium IFT.* pp 791-795.
7. Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., et al. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem Soc. Chem Commun.* 1988: 743-745
8. Bilgrami, K. S., K. K. Sinha and Sinha A. K. 1992. inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extract. *J. Med Res.* 96: 171-175.
9. Borris, R. P. 1996. Natural products rescarch:perspectives from a major pharmaccutical company. *J. Ethnopharmacol.* 51:29-38.
10. Breinholt, V., J. Hendricks , C. Pereira., D. Arbogast, and G. Bailey. 1995. Dietary clorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Cancer Res.* 55:57-62
11. Bullerman, L. B. 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.* 42:65-86.

12. Cannell, J. P. 1998. Natural products isolation. 1st Ed. Humana press Inc. Totowa, New Jersey. Pp 209-246.
13. Caterrall, F., E. Copeland., M. N. Clifford and C. Joannes. 1998. contribution of theafulvins to antimutagenicity of black tea: their mechanisms of action. *Mutagenesis* 13:631-636
14. Cavin, C., D. Holzhäuser., A. Constable., A. C. Huggett, and B. Schifter. 1998. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B₁-induced genotoxicity through a dual mechanism. *Carcinogenesis*. 19: 1369-1375.
15. Cawood, M. E., Gelderblom, W. C. A., Vleggaar, R., Behrend, Y., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O. 1991. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *J. Agric. Food. Chem.* 39: 1958-1962.
16. Chen, Z.-Y., R. L. Brown, A. R. Lax., B. Z. Guo., T. E. Cleaveland and J. S. Russin. 1998. Resistance to *Aspergillus flavus* in corn kernels is associated with a 14 kD protein. *Phytopathol.* 79:808-814.
17. Chen, Z. Y., R. L. Brown., T. E. Cleveland., K. F. Damann and J. S. Russin. 2001. Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production. *J. Food Prot.* 64(11):1785-1792.
18. Coelho, M. 1996. Optimum vitamin supplementation needed for turkey performance and profitability. *Feedstuffs*. 68:13-21.
19. Cordero, M. J., D. Raventós, and B. S. Segundo. 1992. Induction of PR protein in germinating maize seeds infected with the fungus *Fusarium moniliforme*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 41: 189-200.
20. 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.
21. Dashwood, R., T. Negishi, H. Hayatsu., V. Breinholt, J. Hendricks, and G. Bailey. 1998. Chemopreventive properties of chlorophylls toward aflatoxin B₁: a

- review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutant. Res.* 399:245-514.
22. Davidson, J. D. and B. M. Ortiz. 1983. The antibacterial properties of Aztec wound remedy. *J. Ethnomopharmacol.* 8(2):149-161.
23. Dupuis, D. and B. Johori. 1972. Cinnamyphenols as inhibitors of Fungal Growth. *J. Can. Microbiol.* 18: 929-933.
24. Ellis, W. O., J. P. Smith, and B. K. Simpson. 1991. Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *J. Food Sci. Nutr.* 30(3): 403-439.
25. el-Mofty, M. M., S. A. Sark, A. Essawy, H. S. Abdel Gawad. 1994. Preventive action of garlic on aflatoxin B₁-induced carcinogenesis in the toad *Bufo regularis*. *Nutr. Cancer* 21(11):95-100.
26. Fan, J. J. and Chen J. H. 1999. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by Welsh onion extracts. *J. Food Prot.* 62(4):414-417.
27. Firozi, P. F., V. S. Aboobaker, and R. K. Battacharya. 1996. Action of curcumin on the cytochrome P450-system catalyzing the activation of aflatoxin B₁. *Chem. Biol. Interact.* 100:41-51.
28. Heredia, N.L., J.S. García-Alvarado y R. G. Labbé. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxin production and protein synthesis by *Clostridium perfringens* type A following heat shock. *J. Food Prot* 61:201-204.
29. Hesseltine, C. W. 1965. A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycologia.* 57: 149-197.
30. Hitokoto, H. S., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Kurata. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ, Microbiol.* 39:818-822.
31. Hoult, J. R, and M. Payá. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* 27: 713-722.

32. Huang, Z., D. G. White, and G. A. Payn 1997. Corn seed proteins inhibitory to *Aspergillus flavus* and aflatoxins biosynthesis. *Phytopatol.* 87: 622-627.
33. Im, S. H., M. W. Bolt., R. K. Stewart and T. E. Massey. 1996. Modulation of aflatoxin B₁ biotransformation by beta-naphthoflavone in isolated rabbit lung cell. *Arch. Toxicol.* 71:72-79.
34. Jayaprakazha G. K., P. S. Negi, C. Anandharamakrishnan and K. K. Sakariah. 2001. Chemical composition of turmeric oil—a byproduct from turmeric oleoresin industry and its inhibitory activity against different fungi. *Z. Naturforsch.* 56(1-2):40-44.
35. Juan-Lopéz, M., M. Carvajal and B. Ituarte. 1995. Supervising programme of aflatoxins in Mexican corna Food Add. and Contaminants. 12:297-312.
36. Kim J. G., Y. M. Lee, P. G. Kim, W. S. Roh and H. Shintani. 2000. Reduction of aflatoxins by Korean soybean paste and its effect on cytotoxicity and reproductive toxicity—part 1. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by Korean soybean paste (Doen-jang) and identification of the active component. *J. Food Prot.* 63(9):1295-1298.
37. Kim, B. R, D. H. Kim, R. Park, K. B. Kwon, D. G. Ryu, Y. C. Kim, N. Y. Kim, S. Jeong, B. K. Kang and K. S. Kim. 2001. Effect of an extract of the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on aflatoxin B₁ oxidizing cytochrome P450 enzymes. *Planta Med.* 67(5):396-399.
38. Liu, J., C. F. Yang., S. Wasser, H. M. Shen, C. E. Tan and C. N. Ong. 2001. Protection of salvia miltiorrhiza against aflatoxin-B₁-induced hepatocarcinogenesis in Fische 344 rats dual mechanisms involved. *Life Sci.* 69(3):309-326.
39. Mahmoud A. L. 1999. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extracts of some Egyptian plants. *Lett Appl Microbiol.* 29(5):334-336.
40. Manson, M. M., H. W. Ball, M. N. Barreto, H. L. Clark, D. J. Judah, G. Williamson, and G. E. Neat. 1997. Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phases I and II drug

- metabolizing enzymes and aflatoxins metabolism. *Carcinogenesis* 18:1729-1738.
41. Moreno-Martínez, E. 1996. Aflatoxin in Maize: Ascenario in Mexico. *Memorias del Congreso Internacional Modulation of Chemical Toxicity and Risk Assessment*. Tucson, Arizona. p. 10.
 42. Moore, G. S. and R. D. Atkins. 1997. The fungicidal and Fungistatic effects of an aqueous Garlic extract and Medically Important Yeast-like Fungi. *Mycol.* 69:341-348.
 43. Micheli, P. A., 1729. "Nova Plantarum Genera". Florentiae 13-20.
 44. Mistry, K. J., M. Krishna and R. K. Battacharya. 1997. Modulation of aflatoxin B1 activated protein kinase C by phenolic compounds. *Cancer Lett.* 121:99-104
 45. Nelson, P. E. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *J. Rev. Phytopathol.* 31: 233-52.
 46. Nwankwo, J. O., J. G. Tahnteng and G. O. Emerole. 2000. Inhibition of aflatoxin B1 genotoxicity in human liver-derived. HepG2 cell by kolaviro biflavonoids and molecular mechanisms of action. *Eur J. Cancer Prev.* 9(5):351-361
 47. Paster, N., B. J. Juven and H. Harshemsesh. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. *J. Appl Bacteriol.* 64 (4): 293-297.
 48. Okotie-Eboh, G. O., L. E. Kubena, A. D. Chinnah and C. A. Bayles. 1997. Effects of beta-carotene and canthaxanthin on aflatoxicosis in broilers. *Poult. Sci.* 76: 1337-1341.
 49. Paster, N., B.J. Juven and H. Harshemesh. 1988. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plants tissue constituets. *J. Appl Bacteriol.* 64(4):293-297.
 50. Plattner, R. D., D. Wesleder, D. D. Shackelford, R. Peterson and R. G. Powler, 1992. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathol.* 117:23-28.
 51. Peña, S. D. y M. C. Duran. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo.* 16 (94): 61-73.

52. Moerman, D. E. 1996. An analysis of the food plants and drugs plants of native North American, *J. Ethnopharmacol.* 52:165-169.
53. Leah, R., H. Tommerup., I. Svendsen and J. Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins antifungal properties. *J. Biol. Chem.* 266(3): 1564-1573.
54. George, D. E., K. E. Anderson, and A. W. Hsie. 1998. Coumarin chomoprotection aganis aflatoxin B₁-induced in mutagen activation and protection with chicke embryo and rat liver S9. *Environ. Mol. Mutagen.* 32:64-74.
55. Gourama, H. and L. B. Bullerman. 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds: A review. *J. Food Prot.* 58(12): 1395-1404.
56. Gembeh, S. V., R. L. Brown., C. Grimm and T. E. Cleveland. 2001. identification of chemical components or corn kernel pericarp wax associated with resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *J. Agric Food Chem.* 49(10):4635-4641.
57. Gou, B. Z., Z.- Y. Chen, R. L. Brown, A. R. Lax, T. E. Cleveland, J. S. Russin, A. D. Mehta, C. P. Selitrennikoff, and N. W. Wildstrom. 1997. Germination induces accumulation of specific proteins and antifungal activities in corn kernels. *Phytopatol.* 87(11): 1174-1178.
58. Guo, B. Z., R. L Brown, A. R. Lax, T. E. Cleveland, J. S. Russin and N. W. Widstrom. 1998. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resitant and susceptible to *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* 61(1): 98-102.
59. Guo, B. Z., R. L Brown, A. R. Lax, T. E. Cleveland, J. S. Russin., and N. W. Widstrom. 1999. Distribution of antifungal proteins in Maize kernel tissues using immunochemistry. *J. Food Prot.* 62(3): 295-299.
60. Le Bon, A. M., C. Roy, C. Roy, C. Dupont and M. Suschetet. 1997. In vivo antigenotoxic effects of dietary allyl sulfides in the rat. *Cancer Lett.* 114:131-134.

61. Lugo, E. E. 1992. Introducción al Estudio de las plantas Medicinales, la Interacción del Medio con la cultura Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo; México.
62. Lurent, D., N. Platzer, F. Koheler, M. P. Sauviat and F. Pellegrin. 1989. Macrofusine and micromoniline, two new mycotoxin isolated from corn infested by *Fusarium moniliforme* Sheld. Microbiol. Alim. Nutr. 7:9-16.
63. Raj, H. G., K. Gupta, V. Rohil, M. Bose, G. Biswas, S. K. Singh, S. C. Jain, V. S. Parmar, C. E. Olsen and J. Wengel. 1998. Aflatoxin B₁-induced micronuclei and cell cycle alteration in lung and bone marrow cell and their modulation by *Piper argyrophyllum* extract. Teratogen. Carcin. Mutat. 18:249-261
64. Rippon, W. J. 1990. Tratado de micología medica. 3a. Ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. Pp 668-669
65. Roberts, W. K., B. E. Laue and C. P. Selitrennikoff. 1988. Antifungal proteins from plants. Ann. N. Acad. Sci. 544: 141-151.
66. Rauscher, R., R. Edenharder, and K. L. Platt. 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mut. Res. 413: 129-142.
67. Reen, R. K., F. J. Wiebel and J. Singh. 1997. Piperine inhibits aflatoxin B₁-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. J. Ethnopharmacol. 58:165-173.
68. Rios, J. L., M. C. Recio and A. Villar. 1989. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Entomoph. 23:127-149.
69. Sabbioni, G. 1990. Chemical and physical properties of the major serum albumin adduct of aflatoxina B1 and their implication for the quantification in biological samples. Chem Biol. Interact. 75:1-10
70. Sharma, R. P. 1993. Inmunotoxicity of micotoxins. J. Dairy Science. 76: 892-897.
71. Skrinjar, M., J. L. Rasic and V. Stojicic. 1996. Lowering of ochratoxin A level in milk by yogurt bacteria and bifidobacteria. Folia Microbiol 41:26-28.

72. Shi, C. Y., S. C. Chua, H. P. Lee and C. N. Ong. 1994. Inhibition of aflatoxin B₁-DNA binding and adduct formation by selenium in rats. *Cancer Lett.* 82:203-208.
73. Singh, H. N., M. M. Prasad and K. K. Sinha. 1993. Efficacy of leaf extracts of some medical plants against disease development in Banana. *Let. Appl. Microbiol.* 17: 269-271.
74. Sultanova, H., T. Makhomoor, Z. A. Abilov, Z. Parween, V. B. Omurkamzinova, A. ur-Rahman and M. I. Choudhary. 2001. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *J. Ethnopharmacol.* 78(2-3): 201-205.
75. Sweeney, J. M. and A. D. W. Dobson. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *J. Food Microbiol.* 43:141-158.
76. Tan R. X., H. Lu, J. L. Wolfender, T. T. Yu, W. F. Zheng, L. Yang, S. Gafener and K. Hostettmann. 1999. Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Med.* 65(1):64-67.
77. Takahashi, N., U. Harttig, D. E. Williams, and G. S. Bailey. 1996. The model Ah-receptor against beta-naphthoflavone inhibits aflatoxin B₁-DNA binding *in vivo* in rainbow trout at dietary levels that do not induce CYP1A enzymes. *Carcinogenesis* 17: 79-87.
78. Tantaoui-Elarika, A. and L. Beraoud. 1994. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oil of selected plant materials. *Env. Path. Toxicol. Oncol.* 31(1):67-72.
79. Vargas-Arispu, I., S. Araujo-Bernal, M. A. Martinez, -Telléz y M. Ortega-Nieblas. 1997. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y la producción de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Rev. Mex. Fitopat.* 15(2):91-95.
80. Verástegui, A. A. Sánchez, N. Heredia and J. García. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. *J. Ethnopharmacol.* 52: 175-177.
81. Vigers, A. J., W. K. Roberts and C. P. Selitrennikoff. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:315-323.

82. Webster, R. P., M. D. Gawde, and R. K. Bhattacharya. 1996. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Lett.* 98: 129-135.
83. Williams, G. M. and M. J. Iatropoulos. 1996. Inhibition of the hepatocarcinogenicity of aflatoxin B₁ in rats by low levels of the phenolic antioxidants butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Cancer Lett.* 104:49-53.
84. Wilson, C., J. Solar, A. El Ghaouth and M. Wisniewski. 1997. Rapid Evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 81(2): 204-210.
85. Zohori, A., A. Khayria and S. Saber. 1995. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L) oil. *Microbiol. Res.* 150: 167-172.
86. (<http://www.ibiblio.org/london/alternative-healthcare/Southwest-School-ofBotanical-Medicine/Abstracts/Larrea-AB.txt>)
87. (http://nutritionfocus.com/nutrition_suplementation/herbs/Chaparral.html#11)
88. (http://wwwbccancer.bc.ca/pg_g_05.asp?PageID=1677&ParentID=2)



DONATIVO

