

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS DE PLANTAS,
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Aspergillus flavus* y
Aspergillus parasiticus.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:

Químico Bacteriólogo Parasitólogo

PRESENTA

EDUARDO SANCHEZ GARCIA

SAN NICOLAS, N. L.

ABRIL DE 1999

TL
SB60
.M2
S26
1999
c.1



1080092563

211701

57

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Actividad inhibitoria de extractos de plantas, sobre el
crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*.**

TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener el Título Profesional de
Químico Bacteriólogo Parasitólogo**

PRESENTA

Eduardo Sánchez García

San Nicolás, N.L.

Abril de 1999

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

*Efecto de extractos de plantas, sobre el crecimiento de
Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus.*

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el Título Profesional de
Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

PRESENTA

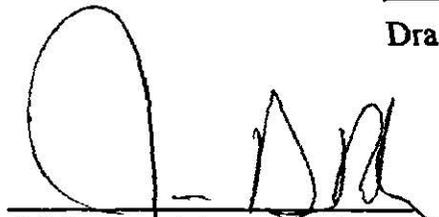
Eduardo Sánchez García

APROBADA

COMISIÓN DE TESIS


Dr. José Santos García Alvarado
PRESIDENTE


Dra. Norma Laura Heredia Rojas
SECRETARIO


M.C. Juan Adame Rodríguez
VOCAL

**Efecto inhibitorio de extractos de plantas, sobre
el crecimiento de
Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus*.**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas.

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la U.A.N.L.

DEDICATORIA

*A mis padres César Sánchez Quezada (+) y Rosalinda García de Sánchez.
con especial cariño a ti mamá. que con tu fuerza trasmitiste en mí un espíritu de lucha.
permitiéndome aprehender que todo es posible si uno se lo propone. espero te sientas
orgullosa de mí. como yo lo estoy de tí.*

*A Mirna E. Araza. por ser como eres. por estar siempre conmigo en los estudios.
en los momentos bellos de la vida. en los momentos difíciles.
por estar siempre conmigo en el amor.*

Toma mi mano y traspasemos las fronteras de la ciencia y de la vida.

*A mis hermanos Iliana. Alberto y César. quienes a pesar de sus ocupaciones
siempre tuvieron momentos agradables que compartir conmigo.*

*A toda la gran Familia García porque todo este tiempo me apoyaron
y porque este triunfo también es parte de ustedes.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAYCYT) de la U.A.N.L., por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

A mis asesores Dr. José Santos García Alvarado y Dra. Norma Laura Heredia Rojas por su asesoría, sus consejos, sus enseñanzas y su paciencia, al guiarme en la realización del presente trabajo.

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez, por su tiempo invertido en la revisión y mejoramiento de este trabajo.

A los maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas, quienes al transmitir sus conocimientos despertaron en mí la inquietud de incursionar en la investigación.

A la Q.B.P. Mirna Esthela Araiza Mendoza, por ayudarme a concluir este trabajo con éxito. Gracias por todo mi amor (T.Q.M. Atte. Edú).

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, que de alguna u otra forma me motivaron a continuar trabajando con empeño, para alcanzar esta meta.

Muy especialmente a Lucía Salazar a quien considero mi amiga desde la licenciatura, a Susana Lozano con quién he compartido trabajo y éxitos, y a mis nuevas amigas Sharlli y Ginebra por saberse ganar mi sincera amistad en tan poco tiempo.

A mis compañeros de generación, con quienes maduré como estudiante y como persona, les deseo suerte y espero que les vaya tan bien como a mí. Especialmente a las niñas Lucía Salazar, Beatriz Padrón, Miriam Hernández, Brenda de León, Karina Arellanos, Yesenia Silva y Norma Villarreal, y a los niños Andrés Calvillo, Hugo González, Víctor Velazquez, David Salazar, Jehú Hernández y Rubén Rodríguez.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Página de título.....	I
Comisión de tesis.....	II
Dedicatoria.....	IV
Agradecimientos.....	V
Índice.....	VI
Lista de tablas.....	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de abreviaturas.....	X
Resumen.....	1
Introducción.....	3
Antecedentes.....	5
Características fisicoquímicas de las aflatoxinas.....	7
Factores que favorecen la incidencia de la contaminación por el hongo.....	8
Ocurrencia de la aflatoxinas.....	10
Extractos de plantas contra aflatoxinas.....	11
Hipótesis.....	16
Objetivos.....	16
Metodología.....	17
Colecta de plantas.....	17
Plantas utilizadas.....	17
Obtención de los extractos.....	20

Determinación de la concentración de los extractos.....	22
Pruebas para demostrar la inhibición del crecimiento	22
CMI.....	23
Resultados.....	24
Ensayos preliminares.....	24
CMI.....	33
Discusión.....	35
Conclusiones.....	38
Literatura Citada.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Plantas utilizadas.

Tabla 2: Efecto de los extractos alcohólicos, sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mediante la técnica del pozo en agar.

Tabla 3: Efecto de los extractos alcohólicos, sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mediante la técnica del disco de papel filtro.

Tabla 4: Efecto de los extractos acuosos, sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mediante la técnica del pozo en agar.

Tabla 5: Efecto de los extractos acuosos, sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mediante la técnica del disco de papel filtro.

Tabla 6: Efecto de extractos obtenidos con agua-alcohol isopropílico-ácido clorhídrico sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, mediante la técnica del pozo en agar.

Tabla 7: Concentraciones Mínimas Inhibitorias resultantes.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Extractos seleccionados por su actividad inhibitoria.

Fig. 2: Comparación de las técnicas utilizadas para los ensayos preliminares.

Fig. 3: Comparación del efecto inhibitorio de los extractos acuosos y alcohólicos.

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetros
CMI	Concentraciones Mínimas Inhibitorias
°C	Grados centígrados
d	Días
Fig.	Figura
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
mg/ml	Miligramos por mililitro
µg/ml	Microgramos por mililitro
ml	Mililitros
µl	Microlitros
min	Minutos
mm	Milímetros
N	Normal
No.	Número
PDA	Agar papa dextrosa

pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
%	Por ciento

RESUMEN

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* son hongos filamentosos, contaminantes comunes de granos y cereales, que cuando se presentan condiciones apropiadas para su crecimiento son capaces de producir aflatoxinas. A estas toxinas se les han atribuido propiedades inmunotóxicas, carcinogénicas, además de provocar toxicidad aguda y crónica provocando daño al hígado, inducción tumoral y teratogénesis. También se ha reportado que pueden causar mortalidad y reducir la producción en animales de granja. Por lo que la presencia de estas toxinas en alimentos, representa un riesgo para la salud del hombre y de los animales que la consumen.

Las aflatoxinas más comúnmente encontradas en los alimentos son la B₁ y B₂, ambas producidas principalmente por *A. flavus*. Por su parte *A. parasiticus* produce dos aflatoxinas adicionales la G₁ y la G₂. De todas ellas la aflatoxina B₁ es la mas común y es considerada como el carcinógeno mas potente que ocurre naturalmente, pues se ha demostrado que esta causa daño hepático en la mayoría de las especies de animales experimentales. Además existen dos productos metabólicos de estas toxinas, conocidas como aflatoxina M₁ y M₂ las cuales son encontradas en leche.

La incidencia y severidad de la contaminación con aflatoxinas, es altamente dependiente de las condiciones del medio ambiente, ya que aquellas condiciones que generen estrés para la planta (altas temperaturas, químicos, etc.) favorecen la incidencia del hongo. Otro de los factores que facilitan la contaminación con aflatoxinas es el daño provocado en los granos por los insectos, antes de que este sea cosechado.

Se han utilizado un gran número de métodos de detoxificación para eliminar la presencia de estas toxinas en alimentos contaminados, mas sin embargo, ninguno es lo suficientemente

efectivo, para remover o inactivar aflatoxinas, sin dañar las propiedades del producto. Por lo que últimamente se han buscado alternativas para prevenir la presencia de estos hongos y la subsecuente contaminación de los alimentos con sus toxinas.

El territorio mexicano cuenta con una de las mayores diversidades vegetales a nivel mundial. Aprovechando esta riqueza florística en este trabajo, nos hemos dado a la tarea de buscar plantas del noreste de la República Mexicana, que pudieran tener la capacidad de inhibir el crecimiento de *A. flavus* y de *A. parasiticus*, encontrando que de todas las plantas estudiadas tres de estas presentaron efecto inhibitorio considerable contra los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Estas plantas son las siguientes: maguey cenizo (*Agave asperrima*), pintilla (*A. victoria*) y amole de castilla (*A. victoria*).

Los extractos de maguey cenizo resultaron ser los mas efectivos, presentando una CMI, con un rango de 1.0 mg/ml a 1.5 mg/ml (dependiendo del hongo probado), para la inflorescencia, y para el caso del quiote su CMI fue de 20 mg/ml.

Los extractos de inflorescencia de la pintilla tuvieron un rango inhibitorio de 2.5 mg/ml a 4.5 mg/ml. La inflorescencia del amole de castilla, que fue el menos efectivo, presentó inhibición a 20 mg/ml para ambos hongos.

INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los principales alimentos de la dieta del pueblo de México, de Centroamérica y de parte de Sudamérica (Peña, D.S., 1990; Rodríguez-del-bosque, L.A., 1996). Sin embargo un manejo inadecuado de las condiciones de cultivo, de cosecha, de almacenamiento o de mercadeo, puede favorecer que este maíz sufra daños y sea susceptible al ataque de microorganismos, los cuales pueden reducir su calidad nutritiva y comercial (Singh, H.N.P., 1993; Paster, N.M., *et al*, 1995). Entre los microorganismos que mas frecuentemente contaminan a este producto se encuentran los hongos filamentosos, algunos de ellos capaces de producir toxinas perjudiciales para el hombre y para los animales que lo consumen. Entre estos últimos destacan los del género *Aspergillus*, especialmente *A. flavus* y *A. parasiticus* los cuales son capaces de producir metabolitos tóxicos conocidos como aflatoxinas (Jarvis, B. 1971; Woloshuk, C.P., *et al*, 1996; Cotton, A., 1997).

La contaminación de alimentos y granos con este tipo de toxinas, es reconocido como un riesgo para la salud del ser humano (Guo, B.Z., 1994; Peña D.S., 1990; Chu F.S., 1991), ya que se ha encontrado que pueden producir transformaciones carcinogénicas, además pueden provocar toxicidad aguda y crónica, produciendo daño al hígado (cirrosis), inducción tumoral y teratogénesis. Además se ha reportado que pueden causar mortalidad o reducir la productividad en animales de granja (Cotty, P., *et al*, 1994; Guo, B.Z., 1994; Galvano, F.A., 1995; Cotton, A., 1997).

El riesgo potencial de las aflatoxinas sobre la salud del humano ha conducido a crear a nivel mundial programas de monitoreo de la toxina en varios productos, así como también llevar a cabo medidas reguladoras por casi todos los países, legislando la cantidad permitida de aflatoxinas

(Chu, F.S., 1991). En México la legislación es muy similar a la de los Estados Unidos de América, ya que el uso de maíz con mas de 20 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de aflatoxinas esta prohibido para el consumo humano (Rodriguez-del-Bosque, L.A., 1996).

Por lo tanto todo alimento que se encuentre contaminado con estas toxinas, por encima de los limites permisibles, es inhabilitado para su consumo. Esto ha originado que se produzcan cuantiosas pérdidas económicas ya que estos hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y frecuentemente invaden estos productos alimenticios (Payne, G.A., 1992)

Para tratar de eliminar los efectos tóxicos de las aflatoxinas, desde hace tiempo se han desarrollado métodos de detoxificación de los alimentos contaminados. Sin embargo a pesar de los numerosos métodos que se han probado, ninguno parece capaz de ser totalmente eficaz, sin dañar las características organolépticas de los alimentos tratados (Galvano, F., *et al*, 1995; Piva, G., 1995).

Una alternativa, que últimamente ha sido considerada es la de utilizar compuestos de origen natural, que tengan la habilidad de inhibir el crecimiento del hongo y/o la producción de aflatoxinas (March,C.I., 1991; Gould, G.W., 1995; Ayderie, B.I., *et al*, 1996). Por lo que en el presente trabajo analizamos la capacidad de plantas del noreste mexicano para inhibir el crecimiento del hongo y la producción de sus toxinas.

ANTECEDENTES

Cuando se presentan condiciones apropiadas para su crecimiento, algunos hongos son capaces de producir micotoxinas (El-Margay, S.S.M., 1995), las cuales son metabolitos tóxicos que pueden producir daños en la salud del hombre y de los animales que las consumen (Kuiper-Goodman, T., 1995).

Las micotoxinas incluyen un amplio espectro de sustancias químicas las cuales pueden afectar muchos órganos y tejidos, pero notablemente los mas afectados son el hígado, el riñón, el sistema nervioso, el sistema endocrino, y el sistema inmune (Jarvis, B., 1971; Kuiper-Goodman, T., 1995).

Dentro de las micotoxinas, unas de gran importancia son las aflatoxinas, que son producidas principalmente por especies de *Aspergillus*, destacando *A. flavus* y *A. parasiticus* (Bullerman, L.B., 1974; El-Gendy, S.M., 1981; Zaika, L.L., 1987; Zeringe, H. J., 1990; Reif, K., 1995; Dorner, J.W., 1997). Sin embargo, recientemente se ha mencionado que también *A. nomius* y *A. tamari* son capaces de producir estas toxinas (Goodrich-Tanrikulu, *et al*, 1995).

Las aflatoxinas (cuyo nombre proviene de *Aspergillus flavus* toxinas) (Ellis, W.O., *et al*, 1991; Holcomb, M., *et al*, 1992; Trial, F., *et al*, 1995) son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por un ruta metabólica policetida y a las cuales no se les ha encontrado función en el hongo que las produce (Payne, G.A., 1992).

A estas toxinas se les han atribuido propiedades hepatotóxicas, inmunotóxicas carcinogénicas y teratogénicas, además pueden causar mortalidad y reducir la productividad de animales de granja (Zeringe, H.J., *et al*, 1991; Kuiper-Goodman, T., 1995; Trial, F., *et al*, 1995). Estas toxinas son capaces de pasar inalteradas a través de los procesos metabólicos de los

animales y acumularse en los tejidos (Piva, G., 1995). Una característica muy importante de estas es que en el hombre tienen efectos inmunosupresores, lo que pudiera incrementar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Cusmano, V., 1990). Por lo tanto, la presencia de estas toxinas pudiera representar un problema muy serio para la salud, además de causar severas pérdidas económicas ya que puede afectar directamente la calidad de alimentos, granos y cereales (Chu, F.S., 1991; Guo, B.Z., 1994; Gourama, H., 1995).

Las aflatoxinas más comúnmente encontradas en los alimentos son la B₁ y B₂, ambas producidas principalmente por *A. flavus*. Por su parte, *A. parasiticus* produce dos aflatoxinas adicionales la G₁ y la G₂. De todas ellas la aflatoxina B₁ es la más común y es considerada como el carcinógeno más potente que ocurre naturalmente (Bullerman, L.B., 1976; Coulombe, *et al*, 1991; Zeringe, H.J., *et al*, 1991; Payne, G.A., 1992; Misaghi, I.J., *et al*, 1995). Esta causa daño hepático en la mayoría de las especies de animales experimentales (Lillehoj, E.B., *et al*, 1970)

Tanto *A. flavus* como *A. parasiticus* comúnmente crecen como saprófitos en plantas muertas, por lo que la infección de tejidos vivos en campo, solo ocurre cuando las plantas son dañadas por insectos o cuando son severamente "estresadas" por químicos o por altas temperaturas. Estas condiciones son comunes en regiones de alta incidencia de estos hongos (Payne, G.A., 1986; Widstrom, N.W., *et al* 1990; Woloshuk, *et al*, 1996). Por lo que estos microorganismos son frecuentemente encontrados como contaminantes de granos, pues se les ha reconocido como unos de los hongos más abundantes del grupo de los *Aspergillus* (Sorenson, W.G., 1966). Así que sus toxinas se han detectado en una amplia variedad de cultivos usados para el consumo humano y animal (Jarvis, B., 1971).

Un aspecto muy importante que se ha observado es que la contaminación de granos con hongos aflatoxigénicos y la subsecuente contaminación con sus toxinas, puede ocurrir en

cualquier etapa del crecimiento del cultivo, es decir, antes de la cosecha del grano, durante la post-cosecha o en el almacenaje. Esto sucede siempre y cuando las condiciones del medio donde se siembra, se seca o se almacena sean propicias para el crecimiento del hongo y por consiguiente para la producción de aflatoxinas (Ghosh, M., 1996). Se ha reportado que los productos con mas alto riesgo de contaminación con aflatoxinas son el maíz, cacahuate y la semilla de algodón (Jarvis, B., 1971; Payne, G.A., 1992).

CARACTERÍSTICAS FISICOQUIMICAS DE LAS AFLATOXINAS

Las aflatoxinas son químicamente derivados de difuranocumarinas. Existen 18 diferentes tipos de aflatoxinas (Ellis, W.O., *et al*, 1992), pero se han identificado cuatro como los mas importantes, estas son: B₁, B₂, y G₁, G₂, (Colley, P.J., *et al*, 1979; Zaika, L.L., *et al*, 1987; Ellis, W.O., *et al*, 1992; Holcomb, M., *et al*, 1992). Además existen dos productos metabólicos de estas toxinas, conocidas como aflatoxina M₁ y M₂ (de Milk en inglés) las cuales pueden ser encontradas en leche (Ellis, W.O., *et al*, 1992; Holcomb, M., *et al*, 1992). Estas toxinas son excretadas por vacas que consumen alimento contaminado con aflatoxinas (Zaika, L.L., *et al*, 1987).

La designación B de las aflatoxinas B₁ y B₂ proviene de la fluorescencia azul (Blue) que exhiben bajo la luz ultravioleta, mientras que la designación G se refiere a la fluorescencia verde-amarilla (Green), también bajo luz ultravioleta, y los subíndices 1 y 2 indican los patrones de separación de estos compuestos en cromatografía de capa fina (Ellis W.O. *et al*, 1992).

Estas toxinas tienen estructuras muy similares y forman un único grupo de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados que ocurren naturalmente. Son tan similares que se ha establecido que las aflatoxinas B₂ y G₂ son dihidroxi derivados de las B₁ y G₁, respectivamente.

Mientras que la aflatoxina M₁ y M₂, son producidas por hidroxilación de la aflatoxina B₁ y B₂, respectivamente (Zaika, L.L., *et al* 1987; Ellis W.O. *et al*, 1992).

De las propiedades mas importantes de la aflatoxinas destacan su termoestabilidad, ya que el punto de descomposición está por arriba de los 200 °C (Peña, D.S., *et al*, 1990).

FACTORES QUE FAVORECEN LA INCIDENCIA DE LA CONTAMINACIÓN POR EL HONGO

La incidencia y severidad de la contaminación con aflatoxinas, es altamente dependiente de las condiciones del medio ambiente. Se sabe que las mas altas tasas de contaminación con aflatoxinas, se han dado en temporadas, con temperaturas normalmente por arriba del promedio, y por debajo del promedio de lluvias (Jones, R.K., *et al*, 1981; Holmquist, G.U., *et al*, 1983; Payne, G.A., 1992).

Buscando factores que influenciaran la producción de aflatoxinas, Holmquist *et al* (1983), estudiaron el efecto de la temperatura, el pH, la actividad de agua así como de diferentes agentes antifúngicos, sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Ellos encontraron que la actividad de agua, influenciaba de manera importante el crecimiento de estos hongos (Jones, R.K., *et al*, 1981; Holmquist, G.U., *et al*, 1983). Además se demostró que la actividad de varios compuestos antifúngicos probados fue grandemente afectada por el pH del medio (Holmquist, G.U., *et al*, 1983).

En relación con esto, se realizó un estudio donde se monitorearon varios factores ambientales, para tratar de buscar una relación entre la producción de aflatoxinas y los factores climáticos. Se encontró que los periodos con un máximo y mínimo de temperaturas donde existiera un alto nivel de evaporación, fueron muy importantes para el desarrollo de las

aflatoxinas. Ellos también encontraron que el tiempo mas propicio para la contaminación del grano fue el periodo de los 20 a 60 días después de la etapa de crecimiento denominada llenado de grano (Jones, R.K., *et al*, 1981; Widstrom, N.W., *et al*, 1990).

Se sabe que las altas temperaturas (36-38 °C) favorecen la incidencia del hongo (Aldrich, S.R., *et al*, 1975), esto es probablemente debido a que dichas temperaturas no son favorables para el desarrollo de la planta, disminuyendo su crecimiento e incrementando su susceptibilidad (Widstrom, N.W., *et al*, 1990).

Otro de los factores que favorecen la contaminación con aflatoxinas es el daño provocado en los granos por los insectos, antes de que este sea cosechado (Lee, L.S., *et al*, 1980; Lillehoj, E.B., *et al*, 1980; Mcmillan, W.W., *et al*, 1985). Esta observación fue hecha desde la década de los años veinte, en donde se obserbaban zonas infectadas que coincidían con áreas de daño por insectos (Taubenhaus, J.J., 1920; Marsh, S.F., *et al*, 1984). De 1930 a 1959 observaciones similares fueron hechas por diferentes investigadores, sin embargo se determinó que también podía haber granos infectados, sin que presentaran un daño aparente por insectos (Payne, G.A., 1992)

Aún con esto, existe evidencia conclusiva donde los insectos han jugado un papel fundamental en la epidemiología de las aflatoxinas, ya que se ha demostrado que estos incrementan la contaminación con los hongos productores de aflatoxinas (Payne, G.A., 1989).

Los posibles mecanismos por los cuales los insectos pueden facilitar la infección de las mazorcas antes de la cosecha son: 1.- transporte del hongo a las mazorcas, 2.- movimiento del inóculo dentro de región del grano, 3.- diseminación del inóculo dentro de la misma mazorca y 4.- predisposición de granos para la infección, debido al daño al pericarpio (Fennel, D.I., 1977; Lillehoj, E.B., 1980).

Un último factor que se ha reportado que juega un papel importante en la infección por el hongo es la superficie lipídica de las semillas que son infectadas. En estas el crecimiento fúngico solo ocurre cuando los lípidos sobrepasan el 15% del total de aceites que presenta la semilla. Varios datos han concluido que debido a esto, *A. parasiticus* prolifera principalmente en la región del germen, cuya área es rica en estos lípidos (De Luca, C., *et al*, 1989).

OCURRENCIA DE LAS AFLATOXINAS

Uno de los primeros reportes acerca de estas sustancias surgió en Inglaterra en 1960, donde se presentó una gran mortalidad de pavos jóvenes debido a una nueva enfermedad a la que se le denominó “enfermedad X del pavo” (Sorenson, W.G., 1966; Zaika, L.L., *et al*, 1987; Ellis, W.O, *et al*, 1992; Holcomb, M., *et al*, 1992; Kuiper-Goodman, T., 1995) después se encontró que esta enfermedad no solo se presentó en estos animales, sino también en crías de patos y faisanes, los cuales también fueron afectados provocando una alta mortalidad (Goldbatt, L.A.1969; Eaton, D.L., *et al*, 1994).

Meses mas tarde se comenzó a asociar a estas enfermedades con una toxina de origen fúngico. Esta se encontraba, en altas concentraciones en granos que eran utilizados como alimento de las aves mencionadas anteriormente (Goldbatt, L.A., 1969; Finley, J.W., *et al* 1992; Eaton, D.L., *et al*, 1994). Para 1961 el hongo fue identificado como *A. flavus*, y a la toxina detectada se le dio el nombre de aflatoxina (Goldbatt, L.A.1969).

Hacia 1965 se conocían los efectos tóxicos de estas micotoxinas y se establecieron programas para tratar de controlar su presencia en alimentos (Nesheim, S. *et al*, 1995). Sin embargo a pesar de esto en 1967, se reportó el envenenamiento de 26 personas de dos comunidades granjeras de Taiwan, las cuales aparentaban un envenenamiento alimentario. Los

estudios *postmortem* indicaron que todos consumieron arroz contaminado con aflatoxina B₁ (Goldbatt, L.A. 1969).

Estudiando a estas toxinas Lillehoj (1970), demostró que tenían capacidad tóxica y carcinogénica en animales de laboratorio. En 1971 Anderson, H.W. *et al*, demostraron la contaminación precosecha de maíz con aflatoxinas siguiendo un exhaustivo programa de muestreo de prácticamente todas las áreas de producción de maíz de E.U.A. La mayor incidencia de aflatoxinas en maíz se encontró en las regiones mas calientes y mas húmedos.

De la misma manera en 1972, Shank y Wogan, indicaron que estas toxinas podían estar involucradas en la producción de cáncer de hígado en los humanos. Después en 1974, se presentó una epidemia de hepatitis en la India, donde se atribuyó como causa al consumo de maíz contaminado con aflatoxinas. Por todo lo anterior, Wismiewski *et al*, en 1992 manifestaron la urgencia de desarrollar nuevos métodos que fueran mas efectivos para el control de enfermedades post-cosecha.

EXTRACTOS DE PLANTAS CONTRA AFLATOXINAS

Se ha reportado a una gran cantidad de compuestos extraídos de plantas que tienen la habilidad de inhibir microorganismos (March, C.I., 1991; Aderiye, B.I., et al, 1996). De hecho Gould (1995) hizo mención de que existían reportes de mas de 1340 plantas que contenían compuestos, que tenían actividad contra una amplia variedad de bacterias, levaduras y hongos. Las propiedades antimicrobianas de las plantas se han conocido y usado desde hace mucho tiempo en la industria de alimentos. Recientemente estos compuestos naturales han tomado un gran auge, debido a la tendencia de usar los productos naturales, eliminando sustancias químicas

anteriormente utilizadas para la preservación de alimentos (March, C.I., 1991; Conner, D.E., 1993).

Bullerman *et al* (1977) demostraron que los aceites esenciales de la canela y del clavo (aldehído cinámico y eugenol, respectivamente) podían tener efecto inhibitorio contra el crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas. Tiempo después, en 1980, Hitokoto probó 29 especias en polvo, demostrando que algunas de ellas también tenían efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la producción de toxinas de tres especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus*. Al año siguiente, Shelef y en 1989 Beuchat y Golden, analizaron extractos de plantas, comúnmente utilizadas como agentes saborizantes y como preservativos, para inhibir el crecimiento fúngico. Todos ellos demostraron que algunas de estas efectivamente inhibían el crecimiento de los mismos.

Buchanan en 1981 demostró que el timol (aceite de tomillo) a concentraciones superiores de 500 µg/ml tenía la capacidad de inhibir completamente el crecimiento de *A. parasiticus*, mientras que a concentraciones mas bajas producía una inhibición transitoria del crecimiento. En ese estudio la inhibición de las aflatoxinas se dio a un grado menor que el crecimiento.

Continuando con la búsqueda de sustancias antifúngicas, de origen natural, en 1985, Gueldner mencionó que en la espiga del maíz se encontraban naturalmente compuestos volátiles, los cuales podían inhibir el crecimiento de *A. flavus*. Dos años mas tarde, Farag *et al*, determinaron los compuestos activos y su actividad contra *A. parasiticus*, de los aceites esenciales de las siguientes plantas: tomillo, comino, clavo, alcaravea, romero y salvia. Ellos encontraron que los principales compuestos activos fueron: timol, aldehído cinámico, eugenol, carvone, borneol y tujone. Una característica importante fue que todos los compuestos activos presentaron efecto inhibitorio tanto contra el crecimiento como contra la síntesis de aflatoxinas. Ellos determinaron

que la efectividad mayor fue mostrada por el tomillo, luego el comino, clavo, alcaravea, romero y finalmente el menos efectivo fue la salvia.

En otro trabajo similar, March (1991), probó la actividad antimicrobiana de 22 especies de plantas, contra 6 cepas bacterianas y 9 fúngicas que comúnmente contaminan alimentos y cultivos. Encontraron en algunas de ellas efecto fungicida y bactericida contra algunos de los microorganismos probados, incluyendo *A. parasiticus*. Otros investigadores (Singh *et al*), en 1993 probaron 11 extractos acuosos de plantas medicinales contra 5 cepas fúngicas, entre ellas *A. flavus*, encontrando que los extractos de *Azadirachta indica* y *Ocimum sanctum*, detuvieron el crecimiento fúngico en comparación con el control. Ellos sugirieron que este efecto inhibitorio se debía a la presencia de compuestos como terpenos, aceites esenciales, ciertos alcaloides, esteroides, gomas, resinas y fenoles, presentes en dichas plantas.

Patkar *et al* en 1993 probaron la inhibición del crecimiento y la producción de aflatoxinas por los aceites esenciales de canela, clavo, almendra y cardamomo. Ellos encontraron que la canela inhibía tanto el crecimiento como la síntesis de aflatoxinas, en tanto que la almendra y el cardamomo solo afectaron el crecimiento. Sin embargo, observaron que a bajas concentraciones, estos últimos aceites estimulaban la producción de aflatoxinas. Ellos finalmente sugirieron que los compuestos activos de la canela y del clavo pudieran ser utilizados potencialmente como preservativos de granos.

Estos resultados también concordaron con trabajos realizados por Sinha *et al* (1993), donde probaron diferentes concentraciones del aceite esencial de canela, donde se observó que a concentraciones superiores a 100 µg/ml se obtenía una reducción significativa de crecimiento y de producción de toxinas.

Otro grupo que estudió extractos de especias fue el de El-Maraghy (1995), demostrando que algunas de ellas poseían compuestos antimicrobianos, pudiendo utilizarse como conservadores. Ellos observaron una inhibición total de la síntesis de aflatoxinas. A este respecto Paster, *et al* en el mismo año determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) del crecimiento de *A. flavus* con los aceites esenciales de orégano y de tomillo. En este estudio, el aceite esencial de tomillo fue menos eficiente.

Otros investigadores continuaron probando plantas, como McCutcheon *et al* (1994), quienes analizaron 100 extractos en donde ellos encontraron que 81 presentaron alguna actividad antifúngica contra 9 especies de hongos, entre ellas *A. flavus*. Ese mismo año Prasad, *et al*, demostraron que el extracto de hojas de *Amorphophallus campanulatus* (OL), tenía un efecto inhibitorio tanto para el crecimiento como para la síntesis de aflatoxinas, por *A. flavus*. Ellos encontraron que a una concentración de 3 mg/ml se inhibía completamente la síntesis de aflatoxinas y el crecimiento del hongo se redujo considerablemente desde 4.5 mg/ml.

Cuando Kandil, (1994) estudió a la planta *Thymus capitatus*, estableció que el efecto inhibitorio encontrado fue debido a saponinas, resinas, flavonoides, aceites esenciales y aceites fijos presentes en esta planta. Otra planta probada por Masood *et al*, (1994) mostró eficiencia contra estos hongos. Ellos establecieron que la actividad mostrada en *Capsicum annum* fue debida a la capsantina y a la capsaicina. También demostraron que la primera inhibía completamente el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* a concentraciones que iban de 0.2 a 1.0 mg/ml. Sin embargo, este efecto se redujo a los 10 días de crecimiento. Cuando se estudió a la capsaicina también se encontró efecto inhibitorio solo que fue menor que el observado por el otro compuesto.

Por otro lado, Kirmizigül, (1996), demostró que extractos metanólicos de las flores de *Cephalaria transsylvanica* inhibían tanto a bacterias como a hongos, entre estos a *A. parasiticus*. También en ese año Aderiye, identificó cuatro compuestos diferentes extraídos de la cáscara de camote (*Dioscorea alata*) con actividad antifúngica, estos compuestos se caracterizaron como β -sitosterol.

Un año mas tarde, Bankole, demostró que el crecimiento de *A. flavus* disminuía progresivamente cuando se aumentaba la concentración de los aceites esenciales obtenidos de las hojas de *Morinda lucida* y de las hojas y semillas de *Azadirachta indica*. Además estos aceites podían reducir la síntesis de aflatoxinas en granos de maíz inoculado con el hongo. Ensayos similares fueron realizados por Montes-Belmont *et al*, (1997), donde determinaron el efecto de 11 aceites esenciales capaces de inhibir el crecimiento de *A. flavus* en maíz. Ellos encontraron que 7 de los 11 inhibieron totalmente al hongo.

Utilizando varios parámetros Lopez-Malo (1997) mencionó que la vainillina junto a otros factores como el pH y la temperatura de incubación, tenían un efecto inhibitorio sobre especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus* y *A. parasiticus*.

El territorio mexicano cuenta con una de las mayores diversidades vegetales a nivel mundial, ya que su clima, su tipo de suelo y la actividad orogénea. Se estima que en nuestro país existen mas de 30,000 especies de plantas (Lugo, E.E., 1992).

Aprovechando esta riqueza florística en el presente trabajo, nos hemos dado a la tarea de buscar plantas del noreste de la República Mexicana, que pudieran tener la capacidad de inhibir el crecimiento de *A. flavus* y de *A. parasiticus*.

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Los extractos de 48 plantas de la región Noreste de México tienen la capacidad de inhibir el crecimiento fúngico de *A. flavus* y de *A. parasiticus*.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar la eficacia de 48 plantas de la región, para inhibir el crecimiento del hongo.
- 2.- Determinar las concentraciones mínimas de los extractos activos que inhiban el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

METODOLOGÍA

* Colecta de plantas

Se obtuvieron 48 plantas, las cuales se colectaron en campo, donde crecen naturalmente, y en herberías o mercados, procurando que estas estuvieran completas (hojas, tallos, flores).

Las plantas fueron identificadas, etiquetadas y se mantuvieron en congelación, hasta su uso. Las plantas probadas se resumen en la siguiente tabla.

*Plantas utilizadas (Tabla 1)

Nombre Común	Nombre Científico	Parte de la Planta estudiada	Tipo de extractos
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Amole	<i>Yucca rostrata</i>	Raiz	Acuoso y alcohólico.
Amole de Castilla	<i>Agave bracteosa</i>	Inflorescencia, Quiote	Acuoso y alcohólico.
Barreta	<i>Helieta parvifolia</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Canelo	<i>Melia acedrach</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Cebolla	<i>Allium cepa L.</i>	Fruto	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Cenizo	<i>Atriplex canescens</i>	Hojas + Tallo	Acuoso, alcohólico, isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Chaya	<i>Myriocarpa langipes</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.

Chile	<i>Capsicum annum</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Cuachalalate	<i>Juliana adstringens</i> Schl.	Hojas + Tallo	Acuoso, alcohólico Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Epazote	<i>Chenopodium ambrosoides</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Eucalipto	<i>Eucaliptus globulus</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Geranio	<i>Geranium sp.</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Helecho	<i>Polypodium sp.</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Hierbabuena	<i>Menta piperita</i> L.	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Hierba del burro	<i>Sanecio filifolius</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Hierba del negro	<i>Lippia germinata</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Hojasén	<i>Flourensia cernva</i>	Hojas, Tallo	Acuoso y alcohólico.
Hoja de Jalapa	<i>Ipomoea simulans</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Jarilla	<i>Bacharis glutinosa</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Jojoba	<i>Simmondsia chinensis</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Lechuguilla	<i>Agave lechuguilla</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Laurel	<i>Listea glausescens</i> HBK	Hojas	Acuoso y

			alcohólico.
Manzanilla	<i>Matricaria rechluta</i> L.	Hojas + Tallo + Flor	Acuoso y alcohólico.
Maguey cenizo	<i>Agave asperrima</i>	Inflorescencia, Quiote	Acuoso, alcohólico, isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Menta	<i>Menta piperita</i> L.	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Mezquite maduro	<i>Prosopis glandulosa</i>	Fruto	Acuoso y alcohólico.
Mezquite verde	<i>Prosopis glandulosa</i>	Fruto	Acuoso y alcohólico.
Milagrosa	<i>Tripsacum lancolatum</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Ocotillo	<i>Fouqueria splendens</i>	Flor, Tallo	Acuoso y alcohólico.
Palma china	<i>Yucca filifera</i>	Semilla, Flor, Datiles	Acuoso y alcohólico.
Pintilla	<i>Agave victoria</i>	Inflorescencia, Quiote	Acuoso y alcohólico.
Pirul	<i>Schimus molle</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Poleo	<i>Mentha pulegium</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Romero	<i>Rosimarinus officinalis</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Sábila	<i>Aloe vera</i>	Flor, Hojas	Acuoso y alcohólico.
Sábila rayada	<i>Agave americana</i>	Quiote, inflorescencia.	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).

Salvia	<i>Hyptis albida</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Samandoque	<i>Hesperalae funifera</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Sauco	<i>Sambucus mexicana</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Semilla de Linaza	<i>Linum usitatissimum</i>	Semilla	Acuoso y alcohólico.
Sotol	<i>Dasglirium sp.</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Tata lencho	<i>Gymnosperma glutinosum</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.
Toronjil	<i>Cedronella mexicana</i> Benth	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Trébol	<i>Trifolium amabile</i>	Hojas + Tallo	Acuoso y alcohólico.
Trompillo	<i>Solanum eleagifolium</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Tuhci	<i>Sidalcea sp.</i>	Hojas + Tallo	Isopropanol-agua-HCl (1:1:1).
Verbena	<i>Verbena carolina</i>	Hojas	Acuoso y alcohólico.

*** Obtención de extractos alcohólicos y acuosos.**

Para la realización de los extractos se pesaron 20 g de la planta y se le añadió 100 ml de solvente (alcohol etílico 96% o amortiguador de fosfatos).

Posteriormente se trituró en una licuadora (Osterizer Clásica) por dos a tres min o hasta que la planta quedara en trozos pequeños.

El triturado se pasó a frascos de vidrio dejándolos reposar por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 3500 r.p.m. por 5-10 min para sedimentar la materia sólida y separarla del solvente. El sobrenadante se filtró, utilizando papel Whatman No. 3 para eliminar la partículas mas pequeñas de materia vegetal.

Posteriormente se realizó la concentración. Para el caso de los extractos alcohólicos estos fueron colocados en recipientes de boca ancha y posteriormente se pasaron a una estufa a no mas de 40 °C, a fin de evaporar totalmente el solvente.

Para el caso de los extractos en amortiguador de fosfatos, estos fueron congelados a -20 °C para concentrarlos por liofilización. Ambos extractos fueron reconstituidos en amortiguador de fosfatos y posteriormente se esterilizaron por filtración y se mantuvieron en congelación a -20° C hasta su uso.

Ambos tipos de extractos, se almacenaron en oscuridad, a fin de evitar una posible pérdida de actividad por fotosensibilidad.

*** Obtención de extractos realizados con agua-isopropanol-HCl.**

La muestra vegetal se secó en una estufa de circulación de aire forzado, a 30° C por 48 h. Posteriormente se pasó a un molino Wiley (malla 10). A esta muestra se le agregó la solución extractora, consistente en agua-alcohol isopropilico-ácido clorhidrico (0.1 N) en una proporción 1:1:1. Se dejó macerar por 48 h a 25-30 °C. Después de este tiempo, se pasaron a una estufa a 50° C, para evaporar el solvente. Posteriormente se reconstituyó en amortiguador de fosfatos, se esterilizaron por filtración y se almacenaron en oscuridad a -20° C, hasta su uso.

*** Determinación de la concentración de los extractos:**

La concentración de los extractos se determinó utilizando la técnica de diferencia en peso seco. Para esto se pesó un vial previamente tarado (P_1), al cual se le agregó un ml del extracto deseado, se pasó a una estufa a 50 °C hasta que se obtuvo el peso seco constante del vial (P_2). Una vez obtenidos estos pesos, se utilizó la fórmula $P_2 - P_1$ para obtener la diferencia en el peso, esto correspondió a la cantidad en mg/ml que se obtuvo del extracto de interés.

*** Pruebas para demostrar la Inhibición del Crecimiento:**

*** Ensayo preliminar**

Estos ensayos fueron realizados en placas Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA), utilizando la técnica del pozo en agar y la del disco de papel filtro.

En ambas técnicas, las placas de Petri fueron sembradas colocando 100µl de una suspensión de esporas (1×10^4 esporas/ml), y después se distribuyó sobre la superficie utilizando un asa de Driglasky.

Para la técnica de pozo en agar se realizaron perforaciones de 6 mm de diámetro. En este orificio se colocó una cantidad determinada de extracto, equivalente a una concentración de extracto de entre 100-250 mg/ml, cuidando de que este no rebase la orilla del pozo, para evitar que se derrame. Se hicieron un máximo de 8-10 pozos por caja petri, procurando que estuvieran bien distribuidos. Además se colocó en un pozo Actinomicina-D (control positivo) y en otro pozo, solo el solvente en el cual están preparados los extractos (control negativo).

Para la técnica de papel filtro, se recortaron trozos circulares de 5 mm de diámetro, los cuales se sumergieron de 3-5 veces en cada uno de los extractos, procurando que se evaporara el solvente del papel entre cada una de las inmersiones. Estos discos, se colocaron uniformemente

sobre las placa, colocando un control positivo con antifúngico y uno negativo con el solvente utilizado.

Las placas se incubaron hasta 7 días, tomando como resultado positivo la aparición de un halo de inhibición del crecimiento, ya sea alrededor del orificio o del papel filtro, según la técnica utilizada, además de ausencia de crecimiento sobre el circulo de papel.

Los extractos fueron probados periódicamente en placa, por las técnicas antes mencionadas para comprobar que su efecto inhibitorio se mantuviera constante.

*** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)**

Una vez obtenidos los extractos que poseían actividad antifúngica, fueron determinadas las CMI en caldo Czapek (Difco).

Para esto se utilizaron las concentraciones exactas del extracto a probar, obtenidas por la tecnica de diferencia en peso seco, explicada anteriormente.

Una vez conociendo la concentración del extracto, se inocularon tubos que contenían 0.8 ml de caldo Czapek, con 0.2 ml de una suspensión de esporas ajustadas a 2×10^4 esporas/ml. A cada uno de estos tubos, se les agregó una cantidad de extracto, correspondiente a una concentración determinada del mismo, utilizando rangos de concentraciones amplios, para después acortar estos rangos con variaciones de 1 mg, hasta obtener la concentración mínima exacta en la cual se presentó inhibición del crecimiento.

RESULTADOS

* Ensayos preliminares:

De todos los extractos probados, los que presentaron mayor efecto inhibitorio fueron la inflorescencia y el qurote de *Agave asperrima*, la inflorescencia de *A. victoria* y la inflorescencia de *A. bracteosa* (Fig. 1). Esta inhibición pudo observarse tanto utilizando la técnica del pozo en agar como en la técnica del papel filtro (Tabla 2 y 3).

Se observó que muchos de los extractos solo presentaron una inhibición parcial contra las cepas fúngicas probadas. Este efecto se caracterizaba principalmente, por un crecimiento modesto del hongo en las áreas donde el extracto era colocado. Esto fue mas observable en la técnica del papel filtro, ya que en este caso, el hongo tuvo la capacidad de crecer sobre el papel, pero lo hacía con menos intensidad que en el control. Los extractos reportados como no efectivos fueron los que en las dos técnicas probadas, mostraron un crecimiento fúngico similar al de los controles.

Cuando se compararon las dos técnicas, la que presentaba mayor claridad en los resultados fue la del pozo en agar (Fig. 2).

Tabla 2.- Efecto de extractos alcohólicos sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Estos ensayos se realizaron mediante la técnica del pozo en agar.

Nombre Común	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Semilla de <i>Yuca</i>	+	+
Flor de <i>Yuca</i>	+	+
Hierba del burro	+	+
Milagrosa	+	+
Flor de Ocotillo	+	+
Ocotillo	+	+
Hojasén	+	+

Epazote	-	-
Flor de Sábila	-	-
Trébol	-	-
Laurel	-	-
Eucalipto	-	-
Cenizo	-	-
Poleo	+	+
Yerbabuena	-	-
Helecho	-	-
Víbora	-	-
Canelo	-	-
Manzanilla	-	-
Chile	-	-
Sábila	-	-
Geranio	-	-
Romero	-	-
Hoja de Jalapa	-	-
Semilla de Linaza	+	+
Mezquite verde	-	-
Mezquite Maduro	-	-
Dátiles de yuca	+	+
Chaya	-	-
Menta	-	-
Barreta	+	+
Amole	+	+
Maguey cenizo, quiote	++	++
Maguey cenizo, inflorescencia	++++	++++
Pintilla, inflorescencia	++++	+++
Pintilla, quiote	+	+
Amole de Castilla, inflorescencia	+++	+++
Amole de Castilla, quiote	+	+
Lechuguilla	-	-
Samandoque	-	-
Jarilla	-	-
Pál fuate	-	-
Sotol	-	-
Pirul	-	-
Laurel	-	-
Toronjil	-	-
Cuachalalate	-	-

-: No se presentó inhibición.

+· halo de inhibición menor de 0.2 cm.

++: halo de inhibición entre 0.2-0.5 cm.

+++ : halo de inhibición entre 0.5-1.0 cm.

++++: halo de inhibición entre 1.0-1.5 cm.

Nota.- Los halos de inhibición se miden a partir del borde del pozo hasta el límite de la inhibición.

Tabla 3.- Efecto de extractos alcohólicos sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Estos ensayos se realizaron mediante la técnica del disco de papel filtro.

EXTRACTO	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Semilla de Yuca	+	+
Flor de Yuca	+	+
Hierba del burro	+	+
Milagrosa	+	+
Flor de Ocotillo	+	+
Ocotillo	+	+
Hojasén	+	+
Epazote	-	-
Flor de Sábila	-	-
Trébol	-	-
Laurel	-	-
Eucalipto	-	-
Cenizo	-	-
Poleo	+	+
Yerbabuena	-	-
Helecho	-	-
Víbora	-	-
Canelo	-	-
Manzanilla	-	-
Chile	-	-
Sábila	-	-
Geranio	-	-
Romero	-	-
Hoja de Jalapa	+	+
Semilla de Linaza	+	+
Mezquite verde	-	-
Mezquite Maduro	-	-
Dátiles de yuca	+	+
Chaya	-	-
Menta	-	-

Barreta	+	+
Amole	+	+
Magüey cenizo, <i>quiote</i>	++	++
Magüey cenizo, <i>inflorescencia</i>	++++	+++
Pintilla, <i>inflorescencia</i>	++++	++++
Pintilla, <i>quiote</i>	+	+
Amole de Castilla, <i>inflorescencia</i>	+++	+++
Amole de Castilla, <i>quiote</i>	+	+
Lechuguilla	-	-
Samandoque	-	-
Jarilla	-	-
Pál fuele	-	-
Sotol	-	-
Pirul	-	-
Laurel	-	-
Toronjil	-	-
Cuachalalate	-	-

-: No se presentó inhibición.

+: halo de inhibición menor de 0.2 cm.

++: halo de inhibición entre 0.2-0.5 cm.

+++ : halo de inhibición entre 0.5-1 cm.

++++: halo de inhibición entre 1.0-1.5 cm.

Nota.- Los halos de inhibición se miden a partir del borde del disco hasta el límite de la inhibición.

Se observó un efecto similar en los extractos acuosos en comparación con los extractos alcohólicos. Solo que en algunos casos el efecto fue menor al de los alcohólicos (Tablas 4 y 5).

Los extractos acuosos que presentaron mayor actividad fueron igualmente los de los agaves, solo que un poco menos efectivos en comparación con los obtenidos con el otro solvente (Fig. 3).

Tabla 4.- Efecto de extractos acuosos sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos ensayos se realizaron mediante la técnica del pozo en agar.

Nombre Común	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Semilla de <i>Yuca</i>	+	+
Flor de <i>Yuca</i>	+	+
Hierba del Burro	-	-
Milagrosa	-	-
Flor de Ocotillo	+	+
Ocotillo	+	+
Hojasén	-	-
Epazote	-	-
Flor de Sábila	-	-
Trébol	-	-
Laurel	-	-
Eucalipto	-	-
Cenizo	-	-
Poleo	+	+
Yerbabuena	-	-
Helecho	-	-
Víbora	-	-
Canelo	-	-
Manzanilla	-	-
Chile	-	-
Sábila	-	-
Geranio	-	-
Romero	-	-
Hoja de Jalapa	-	-
Semilla de Linaza	+	+
Mezquite Verde	-	-
Mezquite Maduro	-	-
Dátiles de Yuca	-	-
Chaya	-	-
Menta	-	-
Barreta	+	+
Amole	+	+
Maguey cenizo, <i>quiote</i>	++	++
Maguey cenizo, <i>inflorescencia</i>	+++	++
Pintilla, <i>inflorescencia</i>	+++	+++
Pintilla, <i>quiote</i>	+	+
Amole de Castilla, <i>inflorescencia</i>	++	++

Amole de Castilla, <i>quiote</i>	+	+
Lechuguilla	-	-
Samandoque	-	-
Jarilla	-	-
Pál fueite	-	-
Sotol	-	-
Pirul	-	-
Laurel	-	-
Toronjil	-	-
Cuachalalate	-	-

-: No se presentó inhibición.

+: halo de inhibición menor de 0.2 cm.

++: halo de inhibición entre 0.2-0.5 cm.

+++: halo de inhibición entre 0.5-1 cm.

++++: halo de inhibición entre 1.0-1.5 cm.

Nota.- Los halos de inhibición se miden a partir del borde del pozo hasta el límite de la inhibición.

Tabla 5.- Efecto de extractos acuosos sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos ensayos se realizaron mediante la técnica del disco de papel filtro.

Nombre Común	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Semilla de <i>Yuca</i>	-	-
Flor de <i>Yuca</i>	-	-
Hierba del Burro	-	-
Milagrosa	-	-
Flor de Ocotillo	-	-
Ocotillo	-	-
Hojasén	-	-
Epazote	-	-
Flor de Sábila	-	-
Trébol	-	-
Laurel	-	-
Eucalipto	-	-
Cenizo	-	-
Poleo	-	-
Yerbabuena	-	-
Helecho	-	-

Víbora	-	-
Canelo	-	-
Manzanilla	-	-
Chile	-	-
Sábila	-	-
Geranio	-	-
Romero	-	-
Hoja de Jalapa	-	-
Semilla de Linaza	-	-
Mezquite Verde	-	-
Mezquite Maduro	-	-
Dátiles de Yuca	-	-
Chaya	-	-
Menta	-	-
Barreta	+	+
Amole	+	+
Magüey cenizo, <i>quióte</i>	++	++
Magüey cenizo, <i>inflorescencia</i>	+++	++
Pintilla, <i>inflorescencia</i>	+++	+++
Pintilla, <i>quióte</i>	+	+
Amole de Castilla, <i>inflorescencia</i>	++	++
Amole de Castilla, <i>quióte</i>	+	+
Lechuguilla	-	-
Samandoque	-	-
Jarilla	-	-
Pál fueite	-	-
Sotol	-	-
Pirul	-	-
Laurel	-	-
Toronjil	-	-
Cuachalalate	-	-

-: No se presentó inhibición.

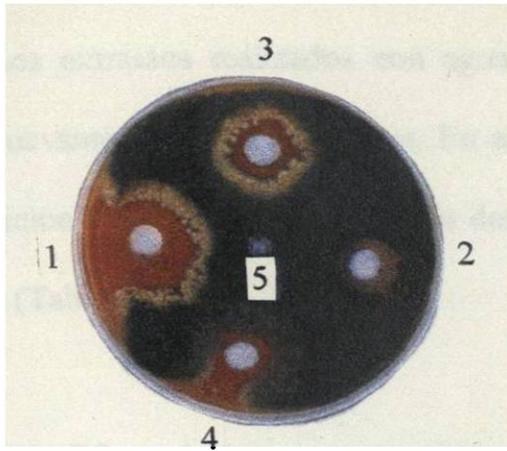
+: halo de inhibición menor de 0.2 cm.

++: halo de inhibición entre 0.2-0.5 cm.

+++ : halo de inhibición entre 0.5-1 cm.

++++: halo de inhibición entre 1.0-1.5 cm.

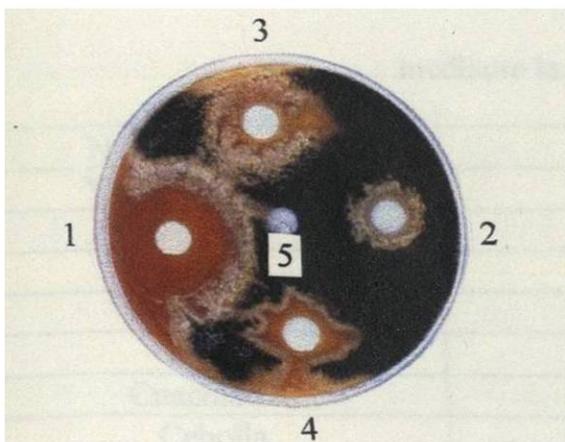
Nota.- Los halos de inhibición se miden a partir del borde del disco hasta el límite de la inhibición.



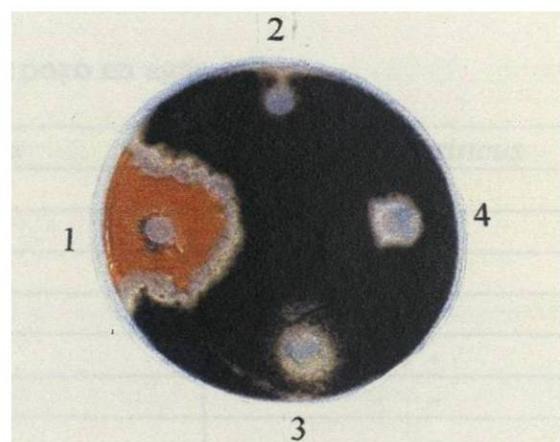
Claves:

- 1) *Agave asperrima* (inflorescencia).
- 2) *Agave asperrima* (quiate).
- 3) *Agave victoria* (inflorescencia).
- 4) *Agave bracteosa* (inflorescencia).
- 5) Control.

Fig. 1.- Extractos seleccionados por su actividad inhibitoria

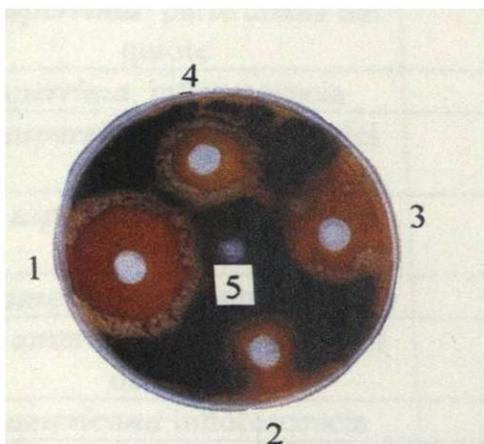


a) Técnica del pozo en agar.

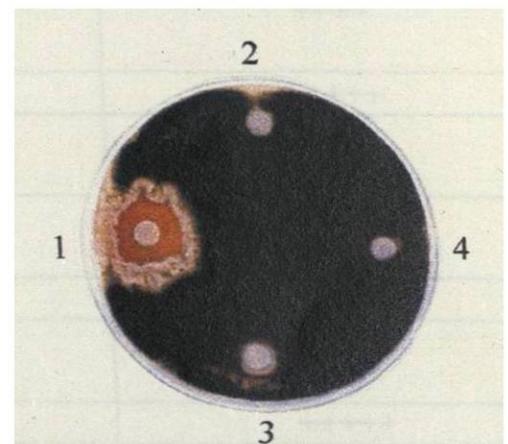


b) Técnica del disco de papel filtro

Fig. 2.- Comparación de la técnicas utilizadas para los ensayos preliminares



a) Extractos alcohólicos



b) Extractos acuosos

Fig. 3.- Comparación del efecto inhibitorio de los extractos acuosos y alcohólicos.

Los extractos realizados con agua-isopropanol-HCl que presentaron mayor inhibición fueron nuevamente los de los agaves. En este caso fueron *Agave asperrima* y *Agave americana*. La inhibición fue algo mayor a la de los demás extractos realizados con etanol y amortiguador de fosfatos (Tabla 6).

Tabla 6.- Efecto de extractos obtenidos con agua-alcohol isopropilico-ac. clorhídrico sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos ensayos se realizaron mediante la técnica del pozo en agar.

Nombre Común	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Yerba del Negro	-	-
Jojoba	-	-
Alfalfa	-	-
Salvia	-	-
Sauco	-	-
Cuachalate	-	-
Cebolla	-	-
Cenizo	-	-
Tuchi	-	-
Trompillo	-	-
<i>Sphaeralcia angustifolia</i>	-	-
<i>A. asperrima</i> : parte media del quote	++++	++++
<i>A. asperrima</i> : inflorescencia	+++++	+++++
<i>A. asperrima</i> : parte basal del quote	++++	++++
<i>A. asperrima</i> : parte superior del quote	++++	++++
<i>A. americana</i> : plántula	++++	++++
<i>A. americana</i> : parte superior del quote	++++	++++
<i>A. americana</i> : inflorescencia	+++++	+++++
<i>A. americana</i> : parte basal del quote	++++	++++

-: No se presentó inhibición.

+: halo de inhibición menor de 0.2 cm.

- ++: halo de inhibición entre 0.2-0.5 cm.
 +++: halo de inhibición entre 0.5-1 cm.
 ++++: halo de inhibición entre 1.0-1.5 cm.
 +++++: halo de inhibición mayor a 1.5 cm.

*** Concentraciones Mínimas Inhibitorias**

Se realizó un análisis de la efectividad de las plantas probadas y los extractos seleccionados para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), fueron los Agaves, ya que en forma general, fueron los que presentaron mayor efecto inhibitorio, en ambas técnicas utilizadas y con los dos solventes. Así como con los extractos refluados.

Los extractos fueron: quiote e inflorescencia del maguey cenizo (*A. asperrima*), la inflorescencia de la Pintilla (*A. victoria*), y la inflorescencia del Amole de Castilla (*A. bracteosa*).

Las CMI resultantes se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.- CMI resultantes

Planta utilizada	<i>A. flavus</i> (mg/ml)	<i>A. parasiticus</i> (mg/ml)
Maguey cenizo (<i>Agave asperrima</i> , quiote)	19±1*	18±2
Maguey cenizo (<i>Agave asperrima</i> , inflorescencia)	1.5±0.5	1±0.5
Pintilla (<i>Agave victoria</i> , inflorescencia)	4±1	2.5±1.5
Amole de Castilla (<i>Agave bracteosa</i> , inflorescencia)	20±2	19±1

* Desviación estandar de la media.

Los resultados de la CMI mostraron que la inflorescencia de *A. asperrima* fue el extracto mas efectivo ya que con una concentración de 1-1.5 mg/ml se inhibía completamente el crecimiento de ambos hongos. Por su parte *A. victoria* presentó una CMI con un rango de 2.5-4

mg/ml. Los menos efectivos fueron el quíote de *A. asperrima* y la inflorescencia de *A. bracteosa* ya que ambos requirieron de una concentración de 20 mg/ml para inhibir el crecimiento del hongo.

DISCUSIÓN

Existe una gran cantidad de plantas que pudieran tener uso potencial como agentes antimicrobianos (Gould, G.W. 1995). Durante los últimos 30 años muchos investigadores se han dado a la tarea de analizar plantas para encontrar este tipo de compuestos y aplicarlos en diversos casos, ya sea como agentes terapéuticos o en la industria de los alimentos (Guerrat, R.L. 1990).

La región noreste de México cuenta con una gran diversidad de plantas, algunas de las cuales poseen compuestos que tienen la capacidad de inhibir microorganismos. Así, en investigaciones recientes se han reportado compuestos naturales extraídos de plantas del desierto Chihuahuense, con capacidad de inhibir bacterias, hongos y levaduras (Verastegui, Ma. de los A., 1995 y Sánchez, C.A., 1997).

Durante los pasados 5 años se ha incrementado el interés en la identificación de sustancias que ocurren naturalmente, las cuales inhiben el crecimiento y/o la producción de aflatoxinas. (Buchanan R.L. 1981). Por lo que en el presente estudio se analizó la capacidad de extractos de plantas de la región para inhibir el crecimiento de *A. flavus* y de *A. parasiticus*.

Nuestros resultados indican que el extracto mas efectivo fue el de la inflorescencia del maguey cenizo (*A. asperima*), ya que presentó la CMI mas baja para ambos hongos, pues para *A. flavus* fue de 1.5 mg/ml y para *A. parasiticus* fue de 1.0 mg/ml, seguido por la inflorescencia de la Pintilla (*Agave victoria*), cuya CMI para *A. flavus* fue de 4 mg/ml y para *A. parasiticus* de 2.5 mg/ml. Con respecto a los extractos de la inflorescencia del amole de castilla (*A. bracteosa*) y del quiote del maguey cenizo (*A. asperima*), ambos presentaron una CMI de 20 mg/ml, para ambos hongos.

Para dos de las tres plantas utilizadas las CMI mas bajas se presentaron en la inflorescencia. Esto es comprensible, ya que con frecuencia el período de floración de la planta coincide con un incremento en la concentración de los compuestos que pudieran tener efecto inhibitorio (Fernández, F.M., 1996), ya que el efecto de una inhibición total o parcial del crecimiento del microorganismo por parte del extracto, dependerá en gran medida de la concentración a la que se encuentre el compuesto activo (Malo, L., 1977; Thomson, W.A., 1980). Otro factor importante es la temporada de lluvia ya que esta ocasiona la disolución de compuestos de la planta provocando una menor concentración de los mismos, por lo tanto un menor efecto (Fernández, F.M., 1996).

Con respecto a los ensayos de inhibición preliminares, las técnicas utilizadas presentaron ligeras diferencias, ya que los halos de inhibición en la técnica del pozo en agar resultaron ser un poco mas extensos que los de la técnica del papel filtro. Esto es probablemente debido a que se presenta una mejor difusión del extracto en la técnica del pozo en agar, pues en la del papel filtro se tenía que secar el extracto antes de poner el disco en la placa de petri.

Muchos métodos de difusión y dilución han sido utilizados para estudiar la actividad de plantas medicinales a los cuales se les han realizado un gran número de modificaciones para obtener mejores resultados. Cabe señalar que es difícil utilizar estos métodos para estandarizar un procedimiento para el estudio de plantas como antimicrobianos, ya que algunos factores como la composición del medio de cultivo, microorganismo probado, método de extracción, pH, solubilidad de la muestra en el medio de cultivo, etc. pueden influir de manera importante en los resultados (Rios, J.L. 1988).

Debido al efecto que presentaron los extractos de agaves, podemos proponer que estos extractos con actividad fungicida, sean estudiados mas a fondo para determinar su potencialidad

de uso en la preservación de alimentos durante su almacenaje, evitando la contaminación y controlando microorganismos causantes de enfermedades de plantas en cultivos de valor (March, C.I., 1991). Estos estudios posteriores, deberán determinar si el efecto de los extractos en medio de cultivo es comparable al efecto de los extractos en granos, ya que los niveles de antimicrobianos necesarios para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos algunas veces suele ser mas alto que aquellos determinados en medios de cultivo (Gould, G.W. 1995).

Las propiedades antimicrobianas de los extractos de plantas usados como agentes antimicrobianos en alimentos ha sido reconocido por siglos, además la reciente demanda de mínimo proceso en alimentos ha incrementado la exploración de estos antimicrobianos para utilizarlos en alimentos (Conner, D.E., 1993).

Por supuesto los sistemas naturales no tienen una especial demanda solo por ser naturales, pero ellos son un argumento fuerte de que si un sistema es efectivo y seguro, y completa una necesidad tecnológica real, entonces las aplicaciones potenciales podrían ser exploradas. En este respecto, podemos predecir que los sistemas naturales, particularmente en combinación con aditivos o combinación sinérgica con otros factores y técnicas, incrementará su papel en un futuro (Gould, G.W. 1995). Es claro que en la naturaleza existen, un enorme número de antimicrobianos muy efectivos. Como quiera que sea es también claro que pocos de ellos han sido desarrollados para el uso en alimentos (Gould, G.W. 1995.)

Por último, las plantas que no presentaron actividad contra estos hongos, podrían tenerla, si se hacen extracciones con otros solventes, ya que la cantidad y los tipos de compuestos extraídos con los solventes utilizados, pueden ser muy diferentes si se extraen con solventes diferentes o con mezclas de estos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos muestran que:

De las 48 plantas probadas se demostró que tres de estas presentaron un efecto inhibitorio claramente observable contra los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

El tipo de solvente utilizado no fue un factor determinante en el efecto inhibitorio. No así la técnica utilizada, ya que la del pozo en agar, presentó halos de inhibición mas extensos que la del papel filtro.

Los extractos de maguey cenizo (*Agave asperrima*) resultaron ser los mas efectivos, ya que presentaron la menor CMI, que tuvo un rango de 1.0 mg/ml a 1.5 mg/ml para la inflorescencia, y para el caso del quiote su CMI fue de 20 mg/ml.

Con una actividad menor, le siguieron los extractos de inflorescencia de la pintilla (*A. victoria*) con un rango de CMI de 2.5 mg/ml a 4.5 mg/ml. La inflorescencia del amole de castilla (*A. bracteosa*) presentó una inhibición de 20 mg/ml para ambos hongos.

LITERATURA CITADA

Aderiye, B.I., S.K. Ogundana, S.A. Adesanya and M.F. Roberts. 1996. Antifungal properties of Yam (*Dioscorea alata*) peel extract. *Folia Microbiol.* 41(5): 407-412.

Ahmed, I.A., A.W.K. Ahmed and R.K. Robinson. 1997. Suceptibility of date fruits (*Phoenix dactylifera*) to aflatoxin production. *J. Sci. Food Agric.* 74: 64-68

Aldrich, S.R., W.O. Scott and E.R. Long. 1975. Modern corn production, Ia edition., A & L Publications, Champagne, IL

Anderson, H.W., E.W. Nehring and W.E. Wichser. 1975. Aflatoxin contamination of corn in the field. *J. Agric. Food Chem.* 2:775-782.

Balchin, M.L. and S.G. Denis. 1996. Antimicrobial effects of hidrophilic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae). *Appl. Microbiol.* 23: 205-207.

Bankole, S.A., 1997. Effect of essential oils two nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B₁ production in maize grain by a toxigenic *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 190-192.

Buchanan, R.L. and A.J. Shepherd. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by Thymol. *J. of Food Science.* 46:976-977.

Bullerman, L.B. 1976. Significance of micotoxins in food safety and human health. *J. Food Safety* 2:47-58.

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 Science*. 42: 1107-1109.

De Luca, C., M. Picardo, R. Castoria, A.A. Fabbri, C. Fanelli and S. Passi. 1989. Surface lipids of seeds both *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *J. Toxicol* 8(1&2): 339-348.

Chu, F.S., 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenetic potential and preventive measures. *Mutation research* 259:291-309.

Colley, P.J. and G.E. Neal. 1979. The analysis of aflatoxins by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 93: 409-418.

Cotty, P.J., P. Bayman, D.S. Egel and K.S. Elias. 1994. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. IN Powell, K.A., A. Renwick and J.F. Peberdy (Ed.). *The genus Aspergillus from taxonomy and genetics to industrial application*. Plenum press. New York, N.Y. pp 1-29.

Conner, D.E., Naturally Occurring Compounds 1993. Second Edition in Michael Davidson and Alfred Larry Branen Antimicrobials in Food Marcel Dekker, Inc. New York Auburn University, Auburn, Alabama.

Dorner, J.W. and R.J. Cole. 1997. A method for determining kernel moisture content and aflatoxin concentrations in peneauts. JAOAC 74(3): 285-288

Eaton, D.L. and J.D. Groopman. 1994. The Toxicology of Aflatoxins. Academic Press, New York. pp 383-426.

El-Maraghy, S.S.M. 1995. Effect of some spices as preservatives for storage of lentil (*Lens esculenta* L.) seeds. Folia Microbiol. 40(5): 490-492

Farag, R.S., Z.Y. Daw and S.H. Abo-Raya. 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. J. Food Sci. 54(1): 74-76.

Fennel, D.I., E.B. Lillehoj and W.F. Kwolek 1975. *Aspergillus flavus* and other fungi associated with insect-damage field corn. Cereal Chem. 52, 314.

Finley, J.W., S.F. Robinson and D.J. Armstrong. 1992. Food Safety Assessment. American Chemical Society, Washington, D.C. pp 261-275.

Galvano, F., A. Pietri, T. Bertuzzi, G. Fusconi, M. Galvano, A. Piva and G. Piva. 1995. Reduction of carryover of aflatoxin from cow feed to milk by addition of activated carbons. *J. Food Protec.* 59(5):551-554.

Galvano, F., A. Pietri, B. Fallico, T. Bertuzzi, S. Scire, M. Galvano and R. Maggiore. 1995. Activated carbons: in vitro affinity to physicochemical parameters. *Journal of Food Protection* 59(5):545-550.

Ghosh, M. and K. Ulaganathan. 1996. Mature seeds of *Sorghum* contain proteins toxic to aflatoxin-producing *Aspergillus flavus*. *J. Stored Prod.* 32(4): 339-343.

Goldbatt, L.A. 1969. Aflatoxin. Academic Press, New York. pp1-40

Goodrich-Tanrikulu, M., N.E. Mahoney and S.B. Rodriguez. 1995. The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 141:2831-2837.

Gould, G.W. 1995. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Protect.* 82-86

Gourama, H. and L.B. Bullerman. 1987. Effect of oleuropein on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Department of Food Science and Technology University of Nebraska, Lincoln.

Gueldner, R.C., D.M. Wilson and A.R. Heidt. 1985. Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. J. Agric. Food Chem. 33:411-413.

Guerrat, R.L., J.M., Huges, N.L. Lima and J. Crane. 1990. Diarrhea in development and developing countries: Magnitude special settings and etiologies Rev. Inf. Dis. 12: 41-50.

Guo, B.Z., J.S. Russin, T.E. Cleveland, R.L. Brown and N.W. Widstrom. 1994. Wax and cutin layers in maize kernels associated with resistance to aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. J. Food Protec. 58(3):296-300.

Hitokoto, H., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakay and I. Ueno. 1978. Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxigenic fungi. Mycopathologia 66(3): 161-167

Hitokoto, H., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakay and H. Kurata. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Appl. and Environ. Microbiol. 812-822.

Holcomb, M., O.M. Wilson, M.W. Trucksess and H.C. Thompson Jr. 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. J. Cromatography 624:341-352

Holmquist, G.U., H.W. Walker and H.M. Stahr. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. J. Food Sci. 48: 778-782.

Jarvis, B. 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. J. Appl. Bact. 34(1): 199-213.

Jones, R.K., H.E. Dunacan and P.B. Hamilton. 1981. Planting date, and irrigation effects on infection and aflatoxin production by *Aspaergillus flavus* in field corn. Phytopathology 71:810-816.

Kandil, O., N.M. Radwan, A.B. Hassan, A.M.M. Amer, H.A. El-Banna and W.M.M. Amer. 1994. Extracts and fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. Journal of Ethnopharmacology 44: 19-24.

Kirmizigül, S., H. Anil, F. Uçar and K. Akdemir. 1996. Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoid glycosides. Phytotherapy Research 10:274-276.

Lee, L.S., E.B. Lillehoj and W.F. Kwolek. 1980. Aflatoxin distribution in individual corn kernels from intact ears. Cereal Chem. 57,340.

Lillehoj, E.B., W.F. Kwolek, E.S. Horner, N.W. Widstrom, L.M. Josephson, A.O. Franz and E.A. Catalano. 1980. Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *A.flavus* inoculum and insect damage. Cereal Chem. 57, 255.

Lugo, E.E. 1992. Introducción al estudio de las plantas medicinales, la interacción del medio con la cultura. Universidad Autónoma de Chapingo (Tesis).

Malo, L.A., S.M. Alzamora and A. Argáiz. 1997. Effect of vanillin concentration, pH, and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. Food Microbiol 14: 117-124

March, C., I. Sanz, and E.P. Yuféra. 1991. Antimicrobial activities on mediterranean plants. Zentralbl. Microbiol. 146:291-295

Marsh, S.F. and G.A. Payne. 1984. Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. Phytopathology 74:1284-1289.

Masood, A., J.V.V. Dogra and A.K. Jha. 1994. The influence of colouring and pungent agents of red Chilli (*Capsicum annum*) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Letters in Applied Microbiology. 18, 184-186.

McCutcheon, A.R., S.M. Ellis, R.E.W. Hancock and G.H.N. Towers. 1994. Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. Journal of Ethnopharmacology 44:157-169

McMillan, W.W., D.M. Wilson and N.W. Widstrom. 1985. Aflatoxin contamination of preharvest corn in Georgia: a six-year study of insect damage and visible *Aspergillus flavus*,

J. Environ. Qual. 14:200.

Montes-Belmont, R., and M. Carvajal. 1997. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. Journal of Food Protection. 61(5):616-619.

Nesheim, S. and G.L. Wood. 1995. Regulatory aspects of mycotoxins in soybean and soybean products. JAOCS 72(12):1421-1423.

Norton, R.A. and P.F. Dowd. 1996. Effect of steryl cinnamic acid derivatives from corn bran on *Aspergillus flavus*, corn earworm larvae, and driedfruit beetle larvae and adults. J. Agric. Food Chem. 44: 2412-2416.

Paster, N., M. Menasherov, U. Ravid and B. Juven. 1995. Antifungal activity of oregano and Thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. 58(1): 81-85.

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*. 17:49-51.

Payne, G.A., D.K. Cassel, and C.R. Adkins. 1986. Reduction of aflatoxin contamination in corn by irrigation and barbecho. Phytopathology 76, 679.

Payne, G.A., E.J. Kamprath and C.R. Adkins. 1989 Increased aflatoxin in nitrogen-stressed corn. Plant Dis. 73, 556

Payne, G.A., 1992 Aflatoxin in maize Critical Reviewus. Plant Sciences 10(5):423-440

Peña D.S. y M. del C. Durán de Bazúa 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. Vol XVI núm. 94 pp 61-70. (Ciencia y Desarrollo)

Piva, G., F. Galvano, A. Pietri and A. Piva. 1995. Detoxification methods of aflatoxins. A review. Nutrition Research 15(5): 767-776.

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

Rambo, G.W., J. Tuite and R.W. Caldwell. 1974 *Aspergillus flavus* and aflatoxin in preharvest corn from Indiana in 1971 and 1972. Cereal Chem. 51, 848.

Rief, K. and W. Metzger. 1995. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plant extracts. Journal of Chromatography. 692: 131-136.

Rios, J.L., M.C. Recio and A. Villar. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. of Ethnopharmacology 23:127-149.

Rustom, I.Y.S. 1996. Aflatoxin in food and feed: Ocurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry 59(1): 57-67.

Sánchez, G.C. 1997. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento de, la esporulación y la producción de toxinas de *Clostridium perfringans* tipo A. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. (TESIS).

Santos F.A., G.M.A. Cunha, G.S.B. Viana, V.S.N. Rao, A.N. Manoel and E.R. Silveira. 1997. Antibacterial activity of essential oils from *Psidium* and *Pilocarpus* species of plants. *Phytotherapy research* 11: 67-69.

Singh, H.N.P., M.M. Prasad and K.K. Sinha. 1993. Efficacy of leaf extracts of some medicinal plants against disease development in banana. *Letters in Applied Microbiology* 17:269-271.

Sinha, K.K. 1987. Aflatoxin contamination of maize in flooded areas of Bhagalpur, India. *Applied and Environmental Microbiology* 53(6): 1391-1393.

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*.

Sorenson, W.G., C.W. Hesseltine and O.L. Shotwell 1966. Effect of the temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*.

Taubenhaus, J.J. 1920. A study of the black and yellow molds in ear corn, TEX, Agric. Exp. St. Bull. 290,3.

Thomson, W.A., 1980. 1a Edición. Guía practica ilustrada de las plantas medicinales. Editorial BLUME. pags. 11 y 151-159.

Thompson, D.P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. Microbol. 81(1):151-153.

Trail, F., N. Mahanti and J. Linz. 1995, Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Mycobiology 141: 755-765.

Verastegui, M.M. 1995. Análisis de efecto antifúngico de 20 extractos de plantas. Facultad de Ciencias Bilógicas. U.A.N.L. (TESIS).

Weidenborner, M., H. Hindorf., H.Ch. Jha and P. Tsotsonos. 1990. Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. Phytochem. 29(4):1103-1105.

Widstrom, N. W., W.W. McMillan, R.W. Beaver and D.M. Wilson. 1990. Weather-associated changes in aflatoxin contamination of preharvest maize. J. Prod. Agric. 3, 196.

Wilson, D.M., M.E. Walker, and G.J. Gascho. 1989. Some effects of mineral nutrition on aflatoxin conmtamination of corn and peneaut in *Soilborne Plant Pathogens: Management whit Macro- and Microelements*, Engelliard, A.W., Ed., APS Press, St.Paul MN,217

Woloshuk, C.P., J.R. Cavcaletto and T.E. Cleveland. 1996. Inducers of aflatoxin biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 87(2):164-169.

Zaika, L.L. and R.L. Buchanan. 1987. Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxin. *J. Food. Protect.* 50(8): 691-708.

Zeringue, H.J. and S.P. McCormick. 1989. Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus* incubated in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. *Toxicon*. 28:445-448.

