

T
533

90911

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa abierta al tiempo

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE CUATRO ESPECIES DE PLANTAS SOBRE
Aspergillus flavus Link”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

M. en C. Norma Cecilia Cárdenas Ortega

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez

ASESOR

Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera

México, D.F.

2005

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA SE ENCUENTRA EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y CUENTA CON APOYO BAJO EL CONVENIO PFP-20-93.

MI TOTAL AGRADECIMIENTO AL CONACYT POR LA BECA ECONÓMICA CON REGISTRO 169497, OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO DOCTORAL.

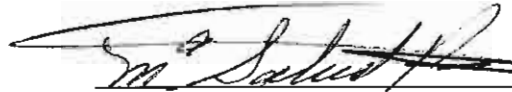
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

M. en C. Norma Cecilia Cárdenas Ortega


El día 16 de Marzo de 2005

Sinodales:

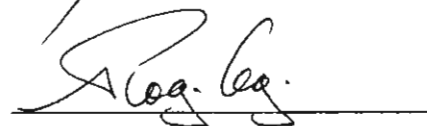
Dra. María Salud Pérez Gutiérrez: Director



Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez: Director



Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera: Asesor



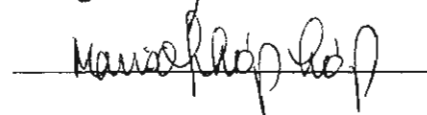
Dra. Mariana Meckes Fisher: Sinodal



Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib: Sinodal



Dra. Marisol López López: Sinodal



COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel I.

Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel I.

ASESOR

Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera

Profesor Investigador Nivel VI. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Miembro
del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel II.

SINODALES

Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib

Investigador Titular "C". Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de
Química. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel II.

Dra. Mariana Meckes Fischer

Investigador Titular "B". Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. Miembro del
Sistema Nacional de Investigadores. Nivel II.

Dra. Marisol López López

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel I

El trabajo de Tesis fue desarrollado en los Laboratorios:

- ◆ 304 del Edificio G del Departamento de Sistemas Biológicos. Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana.

- ◆ Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

- ◆ Análisis Clínicos y Microbiológicos “Altair”. San Luis Potosí, S.L.P.

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco por esta gran oportunidad de superación académica.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, a la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas por todas las facilidades recibidas para la realización de este programa doctoral.

Al Dr. Rubén Román Ramos por su orientación.

Al Dr. Cuauhtémoc Pérez González por su apoyo, sus enseñanzas y su amistad.

Al Taxónomo José García Pérez por su apoyo en la recolección e identificación de las plantas utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Luis Chacón García del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad de Michoacán.

Al personal del Laboratorio 304 del Edificio G del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM unidad Xochimilco, en especial a Claudia y a Daniel, por permitirme formar parte de él, por toda la ayuda que me brindaron y por su amistad.

A los señores Hildeberto Jasso y Juana Pineda de Jasso del Aguaje de los García, Guadalcázar, S.L.P. por su apoyo en la recolección de las plantas de este estudio.

Al personal de Laboratorios Altair, mis amigas y colaboradoras, en especial a Q.F.B. Norma Torres Camacho y Q.F.B. Flor Hernández del Ángel por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez, mi profundo agradecimiento por brindarme su confianza y apoyo incondicional, por sus enseñanzas y por el privilegio de su dirección.

Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez, por su dirección, por brindarme su apoyo incondicional y su confianza, sus enseñanzas, sugerencias y comentarios para la conclusión de este trabajo.

A mi Asesor

Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera, por su incondicional apoyo y su dirección, y el impulso que me ha brindado a lo largo de mi formación académica.

A mis Sinodales

Dra. Mariana Meckes Fischer, Dra. Marisol López López y Dr. Raúl Guillermo Enriquez Habib.

Por sus comentarios y sugerencias para enriquecer este trabajo.

DEDICATORIAS

A Raúl por su amor y por haber recorrido junto a mí todo este camino.

A mi papá (†) y mi mamá, por su amor y su ejemplo; la motivación a lo largo de mi vida.

A mi hermana Chiquis (†) por su impulso y a mis hermanas Maritere, Paty, Gaby y Bebé; y a mis sobrinos y sobrinas, que siempre me han acompañado en todos mis logros.

A Silvia y Marco y a Raúl y Carmen, con mucho cariño.

A mis amigas y compañeras del Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas UASLP, Silvia Romano, Claudia Romano, Ana Luisa Salas, y Lourdes del Valle, por su apoyo y comprensión, lo que me permitió lograr este sueño. Y a Elizabeth Cortés por su gran ayuda.

A mis amigas Lourdes Rodríguez-Borjas, Lourdes Pedroza y Tere Valle por su cariño.

A mis compañeras y amigas del Doctorado. Dra. Eugenia Guzmán. Dra. Claudia Contreras y Erika Rivera por su apoyo y amistad, y por todas las cosas que compartimos.

A Marco Martín González por todo su apoyo y amistad.

A mi maestra y amiga Dra. Berta Irene Juárez Flores por su apoyo y motivación incondicional.

A toda mi familia, en especial a mi prima Karola por su gran apoyo.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo, en especial a las maestras Alicia Zavalza y Blanca Ortiz del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP, y Yolanda Jasso del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas UASLP.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL.	4
OBJETIVOS ESPECIFICOS.	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Almacenamiento de granos	7
2.2. Factores involucrados en el deterioro de los granos	8
2.3. Plagas de productos agrícolas	12
2.4. <i>Aspergillus flavus</i> Link ex Gray	18
2.5. Control de plagas en el almacén	32
2.6. Plantas con actividad sobre <i>Aspergillus flavus</i>	38
2.7. Familia Rutaceae	44
2.8. Familia Asteraceae	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1. Estudio exploratorio	58
3.2. Ensayo biológico	61
3.3. Estudio fitoquímico preliminar	63
3.4. Plantas seleccionadas, recolección, preparación y registro	64

3.5. Preparación de los extractos crudos más activos de cada una de las cuatro especies vegetales seleccionadas y su concentración mínima fungicida (CMF)	64
3.6. <i>Casimiroa pringlei</i> (S. Watson) Engl.	65
3.7. <i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	68
3.8. <i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1. Estudio exploratorio de la actividad antifúngica de extractos crudos de rutáceas y asteráceas	77
4.2. Determinación de la CMF de los extractos hexánicos seleccionados	80
4.3. Estudio fitoquímico preliminar	80
4.4. <i>Casimiroa pringlei</i> (S. Watson) Engl.	82
4.5. <i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	83
4.6. <i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk.	93
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	112
ANEXOS	132

RESUMEN

En la producción de alimentos para el hombre y sus animales domésticos se pierden grandes volúmenes de granos, pues el desconocimiento y el uso inadecuado de las técnicas de conservación, favorece el ataque de insectos, hongos y roedores; estas plagas deterioran la calidad nutricional y sanitaria del grano, el poder germinativo de las semillas y en general el valor económico de los productos agrícolas almacenados. Los hongos contaminantes de granos pueden producir toxinas que imposibilitan su consumo, como es el caso de *Aspergillus flavus* Link que produce aflatoxinas muy tóxicas. A pesar de los riesgos que para la salud humana y animal representan los hongos contaminantes, existen pocos fungicidas químicos autorizados para su combate, lo cual en particular justifica la búsqueda de nuevas opciones para la protección de granos y semillas. En efecto, los extractos vegetales pueden ser la fuente de nuevos plaguicidas para el control de hongos de almacén, con beneficio ecológico ya que son productos renovables y biodegradables. La diversidad de la flora mexicana es una fuente rica de nuevas sustancias para el control de los hongos contaminantes; así, se encontró que plantas de las familias Asteraceae y Rutaceae contienen metabolitos secundarios con actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus*, dos de los cuales fueron caracterizados químicamente. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica sobre *A. flavus* de las plantas *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl., *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk., *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake, así como aislar y determinar la estructura de al menos un compuesto con esta actividad. Se prepararon extractos crudos de las plantas, para elegir el mejor método de obtención de los principios químicos

antifúngicos. A los extractos, fracciones y compuestos aislados se les determinó su actividad antifúngica por la técnica de pozo en agar Czapek, en comparación con el tratamiento testigo consistente en el vehículo utilizado, al igual que su concentración mínima fungicida (CMF) por el método de dilución en medio líquido. Las especies vegetales y la etapa fenológica de obtención, fueron seleccionadas de acuerdo con un estudio preliminar, en el cual también se determinó que el extracto hexánico presentó la mayor actividad antifúngica. En los extractos activos se encontraron esteroides, catequinas y cumarinas en *C. pringlei* (CMF 59.37 µg/mL); esteroides y cumarinas en *D. bicolor* (CMF 12.5 µg/mL); esteroides, terpenos y catequinas en *C. mexicana* (CMF 21.87 µg/mL); y esteroides y terpenos en *H. longipes* (CMF 15.62 µg/mL). El extracto hexánico de *C. pringlei* se fraccionó por cromatografía en columna, con sílice 60, y el sistema hexano/acetato de etilo. A las fracciones activas se les realizó una segunda cromatografía en columna con el sistema cloroformo/acetato de etilo. La fracción activa se purificó por HPLC y sus compuestos se separaron por cromatografía en capa preparativa con el sistema hexano/acetato de etilo 75/25, pero se encontró que después de este procedimiento ya no se manifestaba su actividad antifúngica. Por arrastre de vapor se obtuvo el aceite esencial de las hojas frescas de *C. mexicana* (CMF 1.25 mg/mL), en el cual se reconocieron 17 compuestos (95.84 %) por cromatografía de gases/MS, los cuales se identificaron por medio de su comparación con estándares. Los tres compuestos mayoritarios fueron eucaliptol (41.3 %), acetato de linalilo (9.08 %) y piperitona (37.74 %). El compuesto activo sobre *A. flavus* fue la piperitona (CMF 0.6 mg/mL). De *D. bicolor* se aisló la cumarina seselina, la cual fue identificada por IR, Uv vis, espectroscopia de masas, ¹HMRN, ¹³CRMN, y difracción

de rayos X y se comprobó su actividad fungistática sobre *A. flavus* Link (CMI 31.25 $\mu\text{g/mL}$).

ABSTRACT

A considerable amount of grains employed for the fabrication of human and animal food is lost along the production process due to inadequate and deficient conservation techniques. The actions of insects, fungi and rodents have a negative impact on the sanitary and nutritional quality of the grain as well as on the germination capacity of the seeds, leading to a lower economical value of stocked agricultural products. Fungi produce toxins that turn the grains not viable for nutritional purposes, as it is the case of *Aspergillus flavus* Link, which produces very toxic aflatoxins. Despite the health risks that contaminant fungi represent for human and animals, few chemical fungicides have been approved for use in grains, which justifies the search for new products that allow the protection of grains and seeds. Vegetal extracts could be the source of new pesticides destined to control fungi, given that they provide, in addition, the ecological advantage of being biodegradable and renewable. The diversity of Mexican flora provides a wide supply for the search of new substances, as it has been the case of plants from the Asteraceae and Rutaceae families, which contain chemically characterized secondary metabolites with antifungal activity over *Aspergillus flavus*. The purpose of this study was to determine the antifungal activity of the following plants over *A. flavus*: *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl., *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk., *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake, as well as the isolation and determination of the chemical structure of at least one of the compounds responsible of such antifungal activity. First, raw extracts were prepared in order to choose the best methodology to obtain antifungal compounds. Extracts, fractions and compounds were tested for antifungal activity by means of the technique of Czapek agar well and compared with vehicle controls. The minimal fungicidal concentration (MFC) was determined through the method of liquid dilution. According to a preliminary study that showed the higher antifungal activity of the hexanic extract, we selected the vegetal species and the phenolic obtention step. The active extracts contained sterols, catechin and coumarins in *C. pringlei* (MFC 59.37 µg/mL); sterols and coumarins in *D. bicolor* (MFC 12.5 µg/mL); sterols, terpenes and coumarins in *C. mexicana* (MFC 21.87 µg/mL) and

sterols and terpenes in *H. longipes* (MFC 15.62 µg/mL). The hexanic extract of *C. pringlei* was fractionated by means of column chromatography in silica 60 and the solvents hexane/ethyl acetate. The active fractions were subsequently passed through a second column using chloroform/ ethyl acetate. The active fraction was purified by means of HPLC and its components were separated through preparative layer chromatography with the system hexane/ethyl acetate 75:25. However, after this separation procedure, its activity was not apparent. Essential oil from fresh leaves of *C. mexicana* (MFC 1.25 mg/mL) was extracted by steam distillation and its analysis by means of gas chromatography/mass spectroscopy leads to the identification of 17 compounds. The substances that showed higher concentrations were eucalyptol (41.3%), linalil acetate (9.08%) and piperitone (37.74%). The active compound against *A. flavus* was piperitone (MFC 0.6 mg/mL). The cumarins seselin was isolated from *D. bicolor*, which was identified through IR, UV vis, mass spectroscopy, ¹HMRN, ¹³CRMN and X ray diffraction and its antifungic activity against *A. flavus* was verified (MFC 31.25 µg/mL).

1. INTRODUCCIÓN

Una de las preocupaciones más apremiantes de los países en vías de desarrollo es la producción insuficiente de alimentos básicos como son los cereales y otros granos. La disponibilidad de granos depende de una serie de factores entre los que se encuentran las pérdidas ocasionadas por las plagas, desde el cultivo hasta el almacén. En México se estima que se pierde del 25 % al 30 % de todos los granos cosechados a causa de insectos, roedores y hongos.

La mayor parte de la producción de granos básicos es obtenida por pequeños productores quienes almacenan en forma rústica su cosecha; como estos almacenes no reúnen las medidas sanitarias mínimas, las infestaciones por insectos y las infecciones causadas por hongos pueden llegar a ser masivas y ocasionalmente causar la pérdida total de la cosecha.

Los hongos causan ennegrecimiento de los granos y semillas, afectan su poder germinativo, su calidad nutricional y sanitaria, así como su valor económico. La infección puede iniciarse en el campo donde causa enfermedades a las plantas, y ser transportada al almacén y transmitida de un ciclo agrícola a otro por las semillas. Además del daño directo que ocasionan, algunas especies de hongos producen micotoxinas que aun en pequeñas cantidades son tóxicas para los humanos y para animales de importancia económica.

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, son carcinogénicas, dañan principalmente el hígado, se acumulan en diversos órganos y se eliminan en todas las secreciones. Por ello, es también importante el control sanitario de los animales productores de carne y leche alimentados con granos

infectados. En México no se tienen datos precisos sobre la magnitud del problema, pero en 1991 fue necesario destruir 440 000 t de la producción de maíz del estado de Tamaulipas por contaminación con aflatoxinas.

La presencia de aflatoxinas como contaminante del maíz es un reto que impone revisar los métodos empleados en su control y encontrar procesos que eviten el contagio de los alimentos. La presencia de aflatoxinas puede ser reducida con mejoras en las prácticas agrícolas, como la utilización de semillas mejoradas y mejores sistemas de almacenamiento o de procesos de manufactura, como también con la utilización de fumigantes químicos sintéticos.

A pesar del impacto en la salud que representan las aflatoxinas para el hombre, la diversidad de fungicidas autorizados para su control es muy limitada. Además, el uso indiscriminado de fumigantes puede ocasionar la generación de plagas resistentes, su presencia es un factor de riesgo oncogénico. Por ello, es imprescindible buscar otras opciones de control, alternativas a los actuales. Así, para el control de hongos fitopatógenos y de almacén, se ha intensificado la búsqueda de opciones como el uso de extractos de plantas, aceites esenciales y otros metabolitos vegetales, que resulten efectivas, no contaminantes para el ambiente y que representen menor riesgo para la salud humana y animal. Las plantas de las familias Asteraceae y Rutaceae contienen metabolitos secundarios con actividad fungicida sobre *A. flavus* Link; por ello en este trabajo se estudiaron los extractos de *Chrysactinia mexicana* A Gray, *Heliopsis longipes* (A Gray) Blake, *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl. y *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk. y se identificaron dos compuestos con actividad antifúngica.

HIPÓTESIS

Las especies *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl., *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk., *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake, al presentar ciertas propiedades biocidas, pueden también ser antifúngicas sobre *Aspergillus flavus* Link, y los compuestos responsables de dicha actividad pueden ser aislados y caracterizados químicamente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antifúngico sobre *Aspergillus flavus* Link de las rutáceas *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl. y *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk. y de las asteráceas *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake, así como, aislar y caracterizar estructuralmente al menos uno de los compuestos responsables de dicha actividad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar extractos crudos de *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl., *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk., *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake.
2. Fraccionar los extractos que manifiesten actividad antifúngica por métodos cromatográficos, principalmente por cromatografía en columna.
3. Evaluar la actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* Link, por el método de difusión en agar y la técnica de pozo, de los extractos completos obtenidos de las cuatro especies plantas en estudio, de las fracciones separadas y de los compuestos purificados.
4. Purificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas, para aislar por lo menos un compuesto con actividad antifúngica.
5. Determinar la estructura del compuesto con actividad antifúngica por métodos químicos y espectroscópicos, como son resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y, en caso necesario, difracción de rayos X.

2. ANTECEDENTES

El desarrollo de una sociedad se fundamenta en su capacidad para producir, almacenar y distribuir alimentos. Los incrementos en la productividad de granos y cereales trae como consecuencia la necesidad de almacenar estos productos para lograr una oferta sostenida en épocas y regiones de mayor demanda (Gómez, 1995).

El rendimiento de las cosechas en todo el mundo se reduce por los efectos de una gran diversidad de plagas de insectos, hongos, bacterias, arvenses, etc. Este problema se agrava porque la mayoría de los pequeños productores carecen de almacenes adecuados y donde guardan sus cosechas no se cuenta con las condiciones mínimas sanitarias; por ello las pérdidas pueden ser muy grandes (Gómez, 1995).

El siglo XX ha sido uno de los periodos más importantes en la historia del hombre; en este siglo la agricultura cambió desde una actividad tradicional a una industrial basada en la ciencia y la tecnología. La agricultura científica ha sido responsable de la mayoría de las ganancias obtenidas en la producción de alimentos. Estas ganancias se deben a la mejora del potencial genético de los cultivares, de las prácticas de manejo y de la capacidad de almacenar y proteger estas cosechas (Gómez, 1995; Guo y col., 1994, 1996).

Desde la Segunda Guerra Mundial, los países industrializados dependen cada vez más del uso de sustancias químicas para proteger sus cosechas. El efecto biológico de los plaguicidas es rápido, pueden almacenarse y transportarse con facilidad y se conservan por mucho tiempo. Sin embargo, tienen desventajas que se hacen cada vez más evidentes, como son: daño al ambiente, deterioro de la flora y

fauna silvestres, generación de plagas resistentes y la contaminación de suelos y mantos acuíferos; además, por sus características de bioacumulación y movilidad a través de las redes tróficas, algunos de estos plaguicidas pueden llegar al hombre y causarle efectos adversos en su salud, que pueden manifestarse en forma aguda o crónica, a mediano o largo plazo, como teratogénesis, carcinogénesis y esterilidad, entre otros. En diversas ocasiones los plaguicidas son aplicados por operarios que desconocen su manejo y esto puede ocasionarles intoxicaciones severas y la muerte (Anónimo, 1998).

2.1 Almacenamiento de granos

La producción de maíz en México al igual que en otros países latinoamericanos, se lleva a cabo en dos sistemas de explotación agrícola: el tradicional, del pequeño productor con escasez de recursos económicos y tecnológicos; y el tecnificado, de productores con mejores recursos económicos. Es por ello que la problemática de la poscosecha del maíz difiere considerablemente en la magnitud de las pérdidas, pero no en cuanto a los factores que las provocan (Moreno, 1995).

La mayor parte de la producción de maíz en México se lleva a cabo por los productores de escasos recursos, y el manejo que le dan al maíz en sus campos y fincas, se refleja en la calidad del grano que se comercializa. Por ello, la disponibilidad de granos depende no sólo de la producción, sino también del manejo poscosecha (Moreno, 1995). Las tecnologías de poscosecha empleadas por los pequeños productores han permanecido prácticamente sin evolucionar, lo que se refleja en el uso de estructuras de almacenamiento poco apropiadas que facilitan el deterioro de los granos y sus derivados (Schneider, 1995).

Las pérdidas poscosecha, tanto en su naturaleza como por la forma en que los granos se manejan, son difíciles de determinar, por lo que sólo existen estimaciones. En México llegan a ser del 30 %, pero a nivel mundial la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) estima que se pierde entre 5 y 10 % de todos los granos alimentarios cosechados. En América Latina las pérdidas varían de 25 a 50 %, en la India las pérdidas son de 30 % y en algunas regiones del sureste de África hasta el 50 %. En Estados Unidos se estiman en 10 %, 4 % se pierde durante la cosecha y el 6 % durante el almacenamiento (Moreno, 1991; Schneider, 1995; González, 1995).

2.2 Factores involucrados en el deterioro de los granos

Las estructuras de almacenamiento sirven para aislar y proteger las cosechas de los agentes climáticos y bióticos que inciden en su deterioro (Moreno, 1995; Schneider, 1995).

El contenido de humedad, la temperatura, los hongos, los insectos, las impurezas presentes en la masa de granos, los daños físicos y los roedores son factores que influyen en su conservación durante el almacenamiento. De estos factores, los principales que influyen en el deterioro de los granos son la temperatura y el contenido de humedad. En general mientras más seco y frío sea el ambiente, mejor se conserva el grano en el almacén, y mayor será el periodo que permanezca en buenas condiciones (Ospina, 1995).

2.2.1 Humedad

La humedad es el factor más importante en la conservación de los granos, tanto la del ambiente (humedad relativa) como el agua en los granos (contenido de humedad), ya que la disponibilidad de agua es determinante en el desarrollo de los insectos y de los hongos de almacén, así como su efecto sobre los procesos fisiológicos de las semillas, de los que depende la pérdida de vigor y viabilidad (Moreno, 1995, 1996; Schneider, 1995).

A humedades muy bajas, la actividad de los hongos de almacén es muy baja, pues los hongos que pueden crecer a esas bajas humedades lo hacen muy lentamente y sus efectos también son lentos y poco perceptibles, como es el caso de *Aspergillus halophilicus*. Los hongos de almacén que más daño causan a los granos y semillas requieren una actividad del agua superior a 0.75 %, lo cual corresponde a humedades relativas superiores al 75 % y a contenidos de humedad del grano de maíz superiores al 13 %. Entre estos hongos están los miembros de los grupos *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus flavus* (Moreno y Gil, 1991).

La germinación de las esporas ocurre a una humedad de 81 a 82 % y la esporulación del hongo a 83 %; conforme la humedad aumente, el crecimiento de *A. flavus* aumenta drásticamente (Guzmán, 1997).

2.2.2 Temperatura

La temperatura es de importancia en la conservación de las cosechas, por su efecto en el desarrollo de las poblaciones de insectos y de hongos. Estos últimos pueden crecer desde temperaturas muy bajas (0 °C) hasta las temperaturas que resultan del calentamiento de los granos (45 °C). El desarrollo de los hongos a

temperaturas bajas es lento, incrementándose a medida que la temperatura es mayor (Moreno, 1995).

El incremento de la temperatura del grano almacenado se debe al metabolismo de la propia semilla y de los insectos y hongos. El calentamiento del grano húmedo (mayor a 15 %) es originado por el metabolismo de las semillas y de los hongos y se puede incrementar hasta 62.2 °C. Inicialmente *A. glaucus* eleva la temperatura hasta 35 o 40 °C, posteriormente *A. candidus* y *A. flavus* la elevan hasta 55 °C, y provocan un apelmazamiento del grano por el desarrollo del micelio durante semanas, en dependencia del agua metabólica, del agua de respiración, de la acumulada por el grano o de la transportada fuera del punto caliente, generalmente por los insectos (González, 1995).

En el lugar de almacenamiento es necesario tomar en cuenta la temperatura del aire y del grano. En un clima muy frío, los insectos y hongos no crecen muy rápidamente o no crecen del todo y las semillas no respiran en gran medida, por lo que se retrasa su deterioro. En lugares cálidos, los hongos, insectos y semillas respiran más rápido y causan un incremento de temperatura y humedad, lo cual puede llegar al extremo de causar la descomposición total. El contenido de humedad y temperatura interactúan constantemente por lo que es necesario mantener el grano seco y fresco (Schneider, 1995).

2.2.3 Tiempo

El factor tiempo también es importante en el deterioro de los granos por la acción de los hongos y los insectos. A periodos largos de almacenamiento, corresponde un mayor riesgo de daño, lo cual es directamente proporcional al

contenido de humedad y temperatura. Para determinar el periodo de almacenamiento se requiere conocer con precisión la humedad del grano y la del ambiente, así como la temperatura y condición del grano y niveles de infestación por insectos y contaminación por hongos. La humedad máxima para un almacenamiento seguro en los cereales de importancia económica es de 13 % para un año y 11 % para cinco años (González, 1995).

2.2.4 Secado y daño físico del grano

La mayoría de los agricultores, en el medio rural, dejan secar su grano en el campo hasta que alcanza un contenido de humedad alrededor del 14 %, para luego proceder a la cosecha manual. Durante el tiempo que el grano está en el campo, existen fluctuaciones muy grandes en el contenido de humedad y está expuesto al ataque de insectos, hongos, roedores y pájaros. El secado artificial se realiza en el sector empresarial y en los centros de acopio (Moreno, 1995; Schneider, 1995).

El secado de los granos es una fuente importante de daño físico, pues favorece la formación de fisuras, las cuales facilitan la fragmentación del grano al golpearse en los ductos de transporte o en las caídas normales dentro de las estructuras de almacenamiento. La intensidad del daño por el secado se refleja en el ataque de hongos, en la pérdida de viabilidad, en la cantidad de grano con fisuras o quebrado y en la presencia de partículas provenientes de dicho daño. La cuantificación de estas características resultantes del deterioro físico permiten inferir la almacenabilidad del grano, y establecer disposiciones operativas respecto al manejo de un determinado lote de grano, en dependencia de su condición física y biológica (Moreno, 1995).

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos especifica que el maíz debe secarse hasta tener 13 % de humedad dentro de las 24 horas posteriores a su cosecha, para evitar la formación de aflatoxinas (González, 1995). Cualquiera que sea el método de secado, la humedad del grano tiende a estar en equilibrio con su ambiente. Para el almacenamiento seguro del maíz, se debe evitar que el grano tenga un contenido de humedad en equilibrio mayor de 14 % (Schneider, 1995).

El grano en buena condición física y biológica, puede almacenarse por periodos más largos que el grano dañado, ya que está menos expuesto al ataque de los hongos (Moreno, 1995).

2.3 Plagas de productos agrícolas

La principal plaga de los productos agrícolas la constituyen los insectos; el segundo lugar lo ocupan los microorganismos: hongos, bacterias y levaduras, en dependencia con factores específicos de oxígeno, nutrientes, humedad y temperatura. De esta forma las condiciones ambientales determinan el tipo de microorganismo que va a prevalecer en el producto y será el que cause el mayor daño (Schneider, 1995).

2.3.1 Hongos contaminantes de productos agrícolas

A nivel mundial, después de los insectos, los hongos son los principales causantes de la reducción de calidad de los cereales almacenados. En países desarrollados, donde los insectos y roedores son controlados eficientemente, los hongos causan la mayoría de las pérdidas durante el almacenamiento (González, 1995).

Los hongos son los microorganismos dañinos más importantes en el grano almacenado; son aerobios, se reproducen por medio de esporas que bajo condiciones climáticas apropiadas producen estructuras filamentosas llamadas hifas. Las hifas penetran la cubierta (capa externa) del grano y avanzan hasta el embrión y éste se decolora. Las esporas son muy resistentes a condiciones adversas como frío, calor, sequedad y falta de nutrientes. Los hongos pueden llegar a sobrevivir meses o años en forma de esporas (Moreno, 1988).

Los hongos son pequeños organismos, que causan daño al generar compuestos químicos que pueden detener la germinación y el crecimiento de las plántulas, causan arrugamiento en las semillas y producen sustancias tóxicas, y así disminuyen la calidad del grano como semilla y para la alimentación y el comercio. El daño producido por hongos se detecta con la vista y el olfato, invaden y decoloran el germen del grano seguido de ennegrecimiento, producen mal sabor y olor a moho seguido de olor a fermentación (rancidez y etílica) y cambios bioquímicos. La única forma para proteger el grano del ataque de hongos en el almacén, es secarlo previamente y guardarlo en un lugar seco, fresco y sin insectos (González, 1995; Schneider, 1995).

2.3.2 Especies de hongos de importancia

Los granos y las semillas son invadidos en el campo por diversas especies de hongos, como: *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Diplodia*, *Curvularia*, *Phoma* y *Mucor* entre otros, las cuales causan enfermedades a las plantas y se transmiten de un ciclo agrícola a otro a través de las semillas. Por otra parte, también los granos y las semillas son invadidos por hongos cuyo hábitat natural no es

el campo sino el almacén, la bodega, el silo y las trojes, principalmente de varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Moreno, 1988; Schneider, 1995).

2.3.3 Tipos de hongos presentes en granos y semillas y sus requerimientos

Los granos pueden ser invadidos por los hongos durante su formación en la planta, en la cosecha, transporte, acondicionamiento y almacenamiento. Por las condiciones ambientales en las que se desarrollan, los hongos se han agrupado en: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado (Moreno, 1988; Schneider, 1995):

1) Hongos de campo, son agentes causales de enfermedades de los cultivos e invaden a los granos en el campo; son transportados por el viento, la erosión, los animales o a través del suelo. Su existencia varía de acuerdo con el cultivo, localidad, sistema de cultivo y condiciones ambientales. En general el microclima alrededor del grano posee condiciones de humedad suficientes para su desarrollo y generación de micotoxinas (Moreno, 1988; Schneider, 1995). Estos hongos pueden provocar pérdida de la coloración natural y del brillo de los granos con lo que reducen su valor comercial, en las semillas reducen el poder germinativo, y pueden causar putrefacción de las raíces y otras enfermedades en las plantas (Schneider, 1995).

2) Hongos de almacén, se desarrollan bajo condiciones de relativa baja humedad, después de la cosecha, durante el transporte, el secado lento, el almacenamiento y proceso de los granos. Generalmente no dañan al grano antes de la

cosecha, pero en el almacén disminuyen su poder germinativo, provocan decoloración, calentamiento, cambios bioquímicos y producen micotoxinas.

3) Hongos de pudrición avanzada, son aquellos hongos que colonizan los granos y los productos alimentarios que han sufrido deterioro biológico previo; requieren alto contenido de humedad para su desarrollo, se encuentran en la naturaleza y colonizan la materia orgánica en proceso de descomposición.

La principal diferencia entre estos tres grupos son los requerimientos de agua para crecer. Los hongos de campo necesitan humedades relativas de 90 a 100 %, equivalentes a humedad del grano de 22 al 23 % o más; normalmente no continúan desarrollándose en el almacén por la falta de humedad, sin embargo, el daño después de la cosecha ya ha sido realizado. En cambio, los hongos de almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90% y temperatura de 25 a 35 °C; el factor más importante en su desarrollo es la humedad interna del grano que debe ser superior a 14 %. Una diferencia en la humedad del 1 % puede determinar que una especie de hongos sea la predominante y alterar la velocidad del daño del grano. En el grano seco, el desarrollo de varias especies de hongos ocurre en una secuencia biológica, según el contenido de humedad del grano en donde crecen. La primera especie que atacará el grano es *Aspergillus restrictus* si su contenido de humedad es de 14.0 a 14.5 %; después se irán presentando otras especies adaptadas al contenido de humedad ascendente, hasta llegar a humedades apropiadas para el ataque de bacterias (Moreno, 1988; Schneider, 1995).

El tercer grupo de hongos prolifera en altas humedades relativas, superiores al 90 %. Estos hongos invaden los granos y otros materiales en pésimas condiciones de almacenamiento; las infecciones se pueden iniciar en el campo, como cuando se dejan las mazorcas de maíz en las plantas en el campo, o cuando el grano forrajero se almacena a la intemperie. Los hongos de deterioro avanzado, prácticamente destruyen a los granos y productos que invaden, debido a su alta capacidad de degradar la materia orgánica; además, algunos de ellos tienen la capacidad de producir micotoxinas (Moreno, 1988).

Los daños que causan los hongos de campo a los granos dependen en gran medida de la severidad del ataque y del hongo de que se trate. Si el ataque es muy severo puede prácticamente destruir el grano, como frecuentemente sucede con las pudriciones de las mazorcas del maíz por especies de *Fusarium*; si el ataque es leve el hongo permanece en la semilla sin alterarla aparentemente, y ésta es la forma en que muchos hongos son transmitidos por la semilla de un ciclo agrícola a otro. Para combatir a estos hongos acarreados en las semillas se utiliza el tratamiento de las semillas con diversos fungicidas.

Algunos hongos de campo ponen en peligro la salud de los animales domésticos y la del hombre, debido a que pueden producir micotoxinas y originar micotoxicosis o intoxicaciones, cuando se les ingieren. Entre estos hongos se encuentran algunas especies de *Fusarium*, las cuales desafortunadamente son muy comunes en los cultivos agrícolas y en particular en los cereales, este género de hongos es uno de los tres más importantes productores de micotoxinas (Moreno, 1988; Schneider, 1995).

El control de los hongos de campo está muy ligado al buen manejo de los cultivos durante su desarrollo, lo cual implica el empleo de variedades resistentes a

enfermedades y a plagas, el uso adecuado de fertilizantes y fungicidas, la oportunidad de los riegos y todas aquellas prácticas agrícolas que permitan el desarrollo de plantas sanas y vigorosas, y por último una cosecha a tiempo y un manejo poscosecha adecuado.

Los hongos de almacén de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* no dañan el grano antes de la cosecha; sin embargo, cuando el maíz es atacado por gusanos de la mazorca, *Aspergillus flavus* puede encontrarse en los granos y sus derivados. La presencia de granos dañados o quebrados o de materiales extraños, como granos o semillas de otras especies (arvenses), partículas de suelo e insectos vivos o muertos, pueden propiciar el desarrollo rápido de estos hongos. Entre los efectos que los hongos causan en los granos y semillas almacenadas (Tabla 1), los más sobresalientes son: calentamiento y germen dañado; ello tiene como consecuencia la reducción del poder germinativo y nutricional de las semillas, a través del ennegrecimiento de los granos, malos olores (moho, fermentación rancia y etílica), aglomeración de granos (terrones) y la producción de micotoxinas (Moreno, 1988, 1996; Schneider, 1995; González, 1995).

Actualmente, el combate de estos hongos se logra secando los granos hasta niveles de humedad relativa desfavorables para su desarrollo (inferior a 75%). Otra manera es almacenar los granos a bajas temperaturas o en ausencia de oxígeno.

Al identificar el tipo de hongo, se puede predecir si el grano puede ser potencialmente tóxico, o si las condiciones durante el almacenamiento fueron inapropiadas. También es posible predecir cómo se podría almacenar el grano, si se conoce además el contenido de humedad (Schneider, 1995).

Tabla 1. Daños principales provocados por los hongos de almacenamiento.

Hongo	Efectos	Posible toxicidad
<i>Aspergillus restrictus</i>	Deteriora y mata el germen. Causa el ojo azul en el maíz.	No
<i>Aspergillus glaucus</i>	Decolora y mata el germen. Causa el ojo azul en maíz con 14.5 a 15 % de humedad.	Sí, como cultivo puro en animales de laboratorio.
<i>Aspergillus candidus</i>	Decolora y mata el germen. Eleva la temperatura a 55 °C.	Sí, como cultivo puro en animales de laboratorio.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Decolora y mata el germen. Causa deterioro avanzado.	Sí, produce ocratoxina.
<i>Aspergillus flavus</i>	Decolora y mata el germen. Produce calentamiento rápido a 55 °C.	Sí, produce aflatoxinas.
<i>Penicillium spp.</i>	Decolora y mata el germen. Produce olor ahogado. Causa el ojo azul en maíz a 18.5 % de humedad.	Sí, produce ocratoxina.

Citado por González (1995).

2.4 *Aspergillus flavus* Link ex Grey

El género *Aspergillus*, de acuerdo con Raper y Fennell (1965) ha sido dividido en 18 grupos, con 132 especies. La palabra *Aspergillus* (del latín que significa asperjar) fue utilizada originalmente por Micheli en 1729 por la similitud microscópica de este hongo con el instrumento (hisopo) que se utiliza para las bendiciones religiosas (Bonifaz, 2000). Entre los hongos que invaden y deterioran los granos almacenado sobresalen *A. glaucus*, *A. restrictus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. fumigatus* y *A. clavatus*, por sus efectos negativos sobre la calidad física, biológica, nutricional y sanitaria de los granos y semillas (Moreno y Gil, 1991).

Cada grupo de hongos está integrado por especies con características morfológicas o fisiológicas similares y el reconocimiento de sus integrantes se basa principalmente en características morfológicas (forma, estructura, tamaño y color) y fisiológicas (reproducción y crecimiento) específicas. La presencia de hongos de este género es indicativa de una mala conservación de los granos, pero es insuficiente para concluir que las micotoxinas estén presentes en dichos granos. La presencia de aflatoxinas se confirma por análisis químico y bioensayo. Las aflatoxinas son producidas por dos especies importantes, *Aspergillus flavus* Link y *A. parasiticus* Speare; ambas especies pertenecen al grupo *Aspergillus flavus*, de las cuales sólo algunas cepas son productoras de aflatoxinas. Estos hongos colonizan diversos granos y productos como cacahuete, maíz, arroz, copra y semilla de algodón (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991).

El género *Aspergillus* se caracteriza por no requerir agua libre para su desarrollo, ya que algunas especies pueden prosperar sobre materiales con actividad acuosa muy baja (0.70), por lo que se les considera xerófitas (Moreno y Gil, 1991).

Aspergillus flavus tiene una amplia distribución, y generalmente se encuentra como saprófito en el suelo y en muchos tipos de materia orgánica en descomposición. Este grupo está formado por once especies.

2.4.1 Morfología

Características macroscópicas: sus colonias son de crecimiento rápido y tienden a cubrir toda la superficie del medio de cultivo. Presentan aspecto algodonoso y su color varía de verde-amarillento a verde oscuro con un halo micelial blanco. Al reverso, algunas cepas producen pigmento castaño ligeramente difusible. En agar

Czapek las colonias son granulares, planas y a menudo con surcos radiales, amarillas al principio que cambian a grises-verdosas con el tiempo. Se ha registrado la formación de esclerocios en colonias viejas o cuando se siembran en medios pobres de nutrientes (Bonifaz, 2000).

Características microscópicas: *A. flavus* presenta cabezuelas globosas o radiadas de color verde amarillento brillante y los esterigmas en dos series (Moreno y Gil, 1991). Posee un micelio microsifonado, tabicado y hialino de 2 a 4 micras. Las cabezas aspergilaras llegan a medir hasta 100 micras de largo y están compuestas por conidióforos largos (80 a 100 micras), vesículas redondas (20 de 8 a 10 micras) y las subsecuentes de 5 a 6 micras; de estas últimas nacen microconidias redondas de 2 a 3 micras. Sus esterigmas están dispuestos un ángulo aproximado de 360° (Bonifaz, 2000).

Datos claves: este hifomicete presenta cabezas conidiales con esterigmas que nacen directamente de la vesícula como capa simple o doble como palizada, las microconidias son hialinas y rugosas. Cabezas conidiales de color amarillo pálido a intenso o verde-amarillo. Esterigmas de dos series, cabezuelas radiadas o columnares, las columnas no compactas (Figura 1).

2.4.2 Ciclo de vida

El ciclo biológico de las especies de *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare corresponde al de los hongos imperfectos o sin estado sexual conocido. En este tipo de ciclo los conidios germinan y producen el micelio que origina los conidióforos; éstos en su parte apical presentan vesículas con fiálides, en una o dos series, las cuales producen las cadenas de conidios. Las vesículas, las fiálides y los conidios

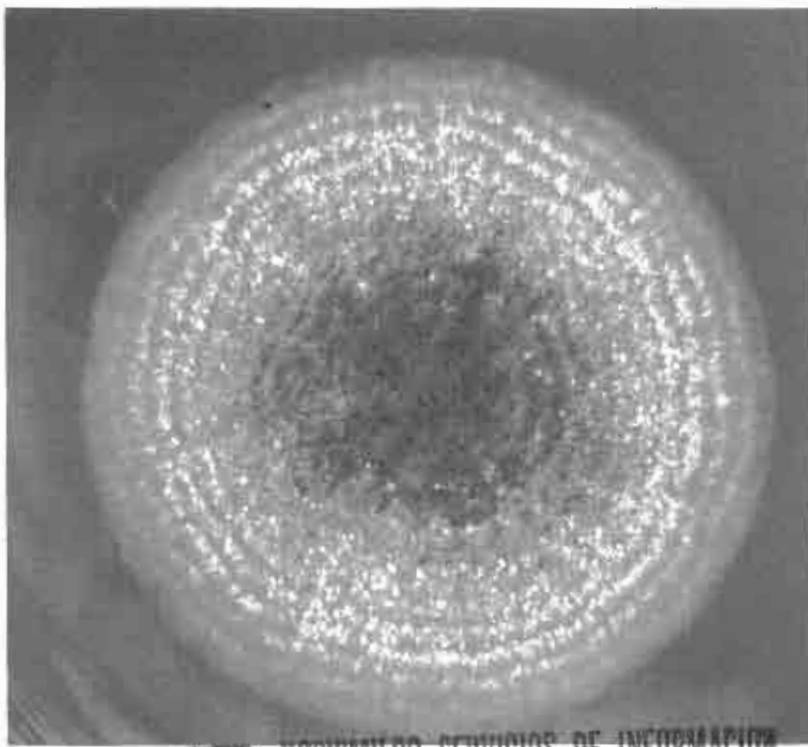
conforman lo que se conoce como cabezuelas, cuyo color y en consecuencia el de la colonia, está dado por el inmenso número de conidios que de ellas nacen (Moreno y Gil, 1991).

A. flavus se caracteriza por producir un gran número de conidios; algunos de éstos no son viables y si caen en lugares inhóspitos, no pueden establecerse ni germinar. Dichos conidios son de distribución cosmopolita y su principal vehículo es el viento. Algunas cepas de *A. flavus* Link forman esclerocios, estructuras de resistencia formadas por aglomeración de hifas, los cuales pueden permanecer viables por meses y quizá por años en el suelo (Moreno y Gil, 1991).

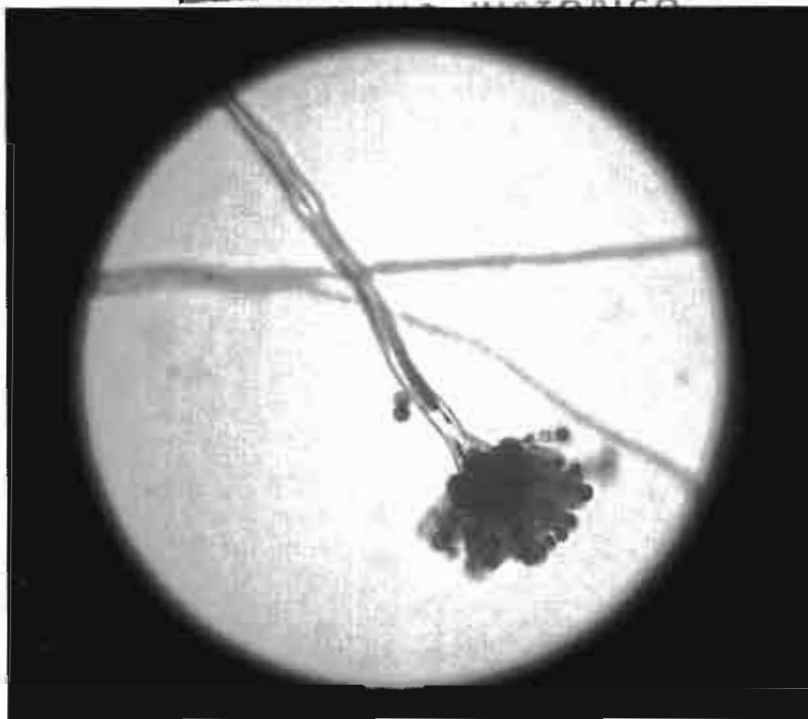
Las especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* se consideran parásitos débiles, por lo que invaden con mayor facilidad a plantas y semillas débiles. En tejidos muertos proliferan con gran velocidad, debido a que son más saprobios que parásitos (Moreno y Gil, 1991).

2.4.3 Condiciones óptimas para su desarrollo

A. flavus es un hongo más delicado que otros en sus requerimientos de humedad para poder desarrollarse y producir aflatoxinas; se ha observado que a 30 °C con una humedad relativa de 80 % es la especie predominante sobre un sustrato de maíz blanco. Este hongo no invade maíz cuyo contenido de humedad es menor al 17.5 %; en cambio, con humedad de 18.5 % se presenta un crecimiento abundante (Rosiles, 1996a). Los conidios requieren una humedad relativa mínima de 83 % para germinar; y para establecerse, el hongo requiere de una humedad relativa mínima de 85 % (Moreno y Gil, 1991).



(a)



(b)

Figura 1. *Aspergillus flavus* Link. (a) Características macroscópicas.

b) Características microscópicas. Fotografía: M. en C. Blanca Ortiz Saldívar

Los hongos pueden crecer bajo temperaturas desde menores de los 0 °C hasta los 50 °C; sin embargo, *A. flavus* está clasificado como mesófilo, ya que a temperaturas de 6 a 8 °C presenta crecimiento mínimo, de 36 a 38 °C óptimo y de 44 a 46 °C disminuye hasta el mínimo. Para su desarrollo, los hongos requieren de oxígeno. Cuando el nivel de oxígeno es reducido desde 5 hasta 1 %, se observa una disminución dramática en el crecimiento micótico y en la producción de aflatoxinas (Rosiles, 1996a).

2.4.4 Infección por *A. flavus* en el campo

Es un hongo ampliamente distribuido; es común encontrarlo como saprobio en el suelo y en muchos tipos de materia orgánica en descomposición, sobre todo en zonas cálidas y húmedas, pues estas condiciones favorecen su desarrollo. Durante el desarrollo de la planta de maíz, existen períodos en los que ocurre más fácilmente la invasión por *A. flavus*; sin perder de vista que los factores ecológicos ejercen influencia en el desarrollo de la mazorca y del grano, ello sucede aproximadamente a los 60 días de desarrollo. Después de este periodo, el daño causado por insectos y por estrés ambiental, puede dar como resultado una mayor acumulación del hongo. Durante la infección en el campo es importante tomar en cuenta factores como la densidad del inóculo, sequía, temperatura y genotipo de maíz. Por otro lado, se conoce que la inoculación del hongo en el maíz en desarrollo se lleva a cabo por el insecto *Carpophilus hemipterus* L. (Vázquez, 2001).

2.4.5 Infección por *A. flavus* en el almacén

Durante el proceso de infección del maíz por *A. flavus*, el hongo invade la cariopsis y también puede penetrar en las ranuras microscópicas presentes en su superficie. Algunos insectos primarios como los picudos acarrean gran cantidad de esporas de hongos, con lo cual favorecen su diseminación. Las fisuras o quebraduras del pericarpio sobre el germen facilitan su rápida infección por hongos. Por ello, la integridad física del grano cosechado es un factor importante para la invasión por cualquier hongo en el almacén (Guzmán y Ruiz, 1997).

2.4.6 Micotoxinas y tipos de micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias producidas por diferentes hongos al desarrollarse sobre los alimentos y productos agrícolas, las cuales aun en pequeñísimas cantidades pueden causar enfermedad e inclusive la muerte al hombre y los animales que los ingieran. En algunos casos pueden ser tóxicas por contacto con la piel, como algunas toxinas de *Fusarium*. A las intoxicaciones ocasionadas por micotoxinas se les denomina micotoxicosis (González, 1995).

Frecuentemente los hongos toxígenos desaparecen de los granos y quedan solamente las micotoxinas, por lo que se tiene que recurrir a técnicas químicas y biológicas para conocer su calidad sanitaria (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991). Las micotoxinas son relativamente estables bajo las condiciones usuales de cocimiento de los alimentos (González, 1995).

Desde 1900 es conocida la enfermedad anemia aplástica alimentaria tóxica (aleukia) en Rusia, la cual entre 1930 y 1944 provocó la muerte de diez millones de personas. Esta enfermedad fue conocida en China desde 100 años antes y hasta 1949

fue descrita; la intoxicación se relacionó con el consumo de maíz enmohecido en el campo por *Fusarium sporotrichoides* y *F. poae*. Estas especies producen toxinas a temperatura entre 5 y 8 °C, las cuales originan problemas hemáticos semejantes a una anemia aplásica y hemorragias (González, 1995).

En Nueva Zelanda y Australia se sabe que el eczema facial de origen hepático en el ganado vacuno y en ovejas, es causado por la toxina esporidesmins del hongo *Pithomyces chartarum*, y cuyo cuadro sintomático es ictericia, fotosensibilidad y edema (González, 1995).

En 1960 murieron 100 000 guajolotes en Inglaterra de una causa desconocida; el factor común de esta enfermedad fue el pienso preparado con pasta de cacahuete importada de Brasil y contaminado con *Aspergillus flavus*. La sustancia tóxica producida por este hongo y aislada de la pasta de cacahuete, fue un grupo de metabolitos caracterizados en 1961 por su fluorescencia azul o verde bajo la luz ultravioleta, por lo que originalmente fueron llamadas aflatoxinas B (azul) o G (verde) (González, 1995). Se han descrito más de 3500 micotoxinas con diferentes niveles de toxicidad, producidas por diversas especies de hongos, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Sin embargo, por sus efectos, las aflatoxinas han sido las más estudiadas, ya que se les reconoce como las sustancias carcinogénicas más potentes hasta ahora conocidas, además de ser teratógenas y mutagénicas; el órgano más afectado es el hígado, por lo que se consideran hepatotóxicas. También existen evidencias de que las partículas de grano y el polvo en el aire pueden estar contaminadas con aflatoxinas, las que al ser inhaladas pueden ocasionar cáncer pulmonar (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995).

De acuerdo con las evidencias actuales, de los diferentes hongos toxígenos que invaden los granos, a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* pertenece el 58 % de las 943 cepas con toxicidad probada. Estos tres géneros junto con algunas especies de los géneros *Stachybotrys*, *Pithomyces* y *Rhizoctonia* han sido responsables de los casos más conocidos de micotoxicosis (Tabla 2) (Moreno, 1988).

Dentro de una determinada especie de hongo, diferentes cepas difieren en su capacidad toxígena, lo cual dificulta la evaluación de materiales sospechosos de contener toxinas; además, la ausencia del hongo no elimina la posibilidad de que el producto contenga micotoxinas (Moreno, 1988).

2.4.6.1 Condiciones que favorecen el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. La producción de micotoxinas es máxima cuando el hongo está presente en los alimentos en forma de cultivo puro (sin competidores). La temperatura es el factor más importante para favorecer la producción de micotoxinas, seguido del substrato; así por ejemplo, para el desarrollo óptimo de *Aspergillus flavus* se requiere temperatura de 36 a 38 °C, pero para la producción de aflatoxinas se requiere temperatura de 25 a 35 °C (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996a).

2.4.6.2 Aflatoxinas. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nonius* (poco frecuente) son las únicas especies confirmadas como secretoras de aflatoxinas. Estas sustancias carecen de sabor, color y olor; son fluorescentes con luz ultravioleta, resisten altas temperaturas (260 a 320 °C) sin descomponerse, de modo que hervir, cocer, fermentar o pasteurizar los alimentos no las elimina (Carvajal, 2000).

Tabla 2. Algunas micotoxinas producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

<i>Aspergillus</i>		<i>Penicillium</i>		<i>Fusarium</i>	
Especie	Toxina	Especie	Toxina	Especie	Toxina
<i>A. chevalier</i>	Xantocilina	<i>P. cyclospium</i>	Acido Penicillico Ocratoxina	<i>F. avenaceum</i>	Tricotecenos Zearalenona
<i>A. clavatus</i>	Patulina	<i>P. expansum</i>	Patulina Citrinina	<i>F. culmorum</i>	Zearalenona
<i>A. fumigatus</i>	Viriditoxina Gliotoxina Fumagilina Malformina Acido oxálico	<i>P. islandicum</i>	Islanditoxina	<i>F. equiseti</i>	Tricotecenos Zearalenona
<i>A. niger</i>	Acido oxálico	<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoxinas Ac. Glaucánico	<i>F. graminearum</i>	Zearalenona Tricotecenos
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas Acido penicillico	<i>P. viridicatum</i>	Ocratoxinas Viridicatina Citrinina	<i>F. moliniforme</i>	Moliniformina Zearalenona Fusarina
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina	<i>P. citrinum</i>	Citrina	<i>F. oxysporum</i>	Zearalenona Moniliformina
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1	<i>P. citreoviride</i>	Citreoviridina	<i>F. nivale</i>	Butenolida
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2	<i>P. terrestre</i>	Ac. Terrestrico	<i>F. tricinctum</i>	T - 2

Fuente: Moreno (1988).

Cuando las toxinas son ingeridas en dosis muy pequeñas no causan una enfermedad declarada, pero sí ocasionan una reducción en el crecimiento, vigor, conversión del alimento y en general una reducción de la producción animal. Además alteran la calidad sanitaria de los granos destinados al consumo humano y originan un riesgo para la salud pública, pues son dañinas aun en cantidades traza $\mu\text{g}/\text{kg}$ o ppb (Carvajal, 2000).

La producción de aflatoxinas depende de la cepa del hongo productor, el substrato, el contenido de humedad del substrato y del ambiente, la temperatura, la micoflora asociada, el oxígeno en la atmósfera de almacenamiento y el periodo de almacenamiento. La sola presencia del hongo en un determinado material, aun de una cepa productora de aflatoxinas, no significa que las aflatoxinas estén presentes, o que se vayan a producir, ya que para su producción se requiere que los diferentes factores mencionados coincidan bajo determinadas circunstancias y condiciones (Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995).

Aspergillus flavus Link produce principalmente aflatoxinas B1 y B2, mientras que *A. parasiticus* Speare produce las B1, B2, G1, G2 y M1. La aflatoxina B1 es la que se encuentra en mayores concentraciones y la más tóxica; es el hepatocancerígeno más potente conocido, pero además es teratógena y mutagénica en el hombre y los animales (Moreno y Gil, 1991).

Entre los materiales en los que se han encontrado aflatoxinas están: maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada, mijo, avena, pastas de cacahuete, soya, algodón, copra y girasol, harina de pescado, papas, aceites de olivo y de coco, higos, chícharos y avena (Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996a).

Las cepas productoras de aflatoxinas son pobres competidoras con otros hongos que crecen bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura, y su incompetencia evita la producción de aflatoxinas. Las especies de *Aspergillus* requieren oxígeno para su desarrollo; en niveles de 1 % de oxígeno en la atmósfera de almacenamiento el desarrollo de los hongos se detiene y se suspende el riesgo de la producción de aflatoxinas, lo cual se logra con el uso de atmósferas controladas y almacenamiento hermético.

Para la producción de aflatoxinas se requiere desde unas cuantas horas a varios días, siempre y cuando se conjunten los factores adecuados de humedad, temperatura y ausencia de microflora competitiva (Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996a).

Se han realizado muchas investigaciones sobre el efecto de las aflatoxinas en los animales domésticos, entre los que se incluyen: aumento de la mortalidad, baja ganancia de peso, desarrollo lento, problemas en la reproducción, diarrea, desórdenes respiratorios, hemorragias, reducción en la producción de leche y huevos, e incremento en la susceptibilidad a las infecciones por bacterias y virus y otros agentes causales de enfermedades. Además del daño al hígado, las aflatoxinas reducen la absorción y metabolismo de los lípidos, vitaminas y minerales. También son muy peligrosas por ser acumulativas y pasar del tracto digestivo a la leche y a los tejidos de los animales que las ingieran, con el consiguiente riesgo de llegar a los humanos que consuman estos productos animales (Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995; Rosiles, 1996a).

El hombre ingiere continuamente aflatoxinas en muchos alimentos (los alimentos libres de aflatoxinas son las frutas y verduras frescas y la miel); así, se encontraron aflatoxinas (de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en el 19 % de las tortillas consumidas en

la Ciudad de México y en el 40 % de los cacahuates en todas sus presentaciones. Aunque los humanos las eliminan por la orina, heces, leche materna y bilis, las aflatoxinas les causan intoxicaciones severas, abortos, vómitos, diarreas y hemorragias internas, y con el tiempo se van acumulando produciendo enfermedades crónicas como hepatitis, cirrosis, malformaciones en fetos y diversos tipos de cáncer (colorrectal, hígado, pulmón, páncreas, mamario y cervicouterino) (Carvajal, 2000; Chu, 1991).

La susceptibilidad de los animales de granja a esta toxina es muy variada, pero en todas las especies estudiadas, el animal joven es más susceptible que el adulto, los primeros síntomas son carencia de apetito y pérdida de peso y el principal daño es necrosis en el hígado con síntomas variados de acuerdo con la especie animal. Además, causan daños en otros órganos, como el riñón y el bazo, y alteraciones en el sistema inmunológico. La susceptibilidad de las aves de corral es mayor en patos seguida de pavos y pollos; en los mamíferos los más sensible son los lechones, seguidos de las cerdas preñadas, vacas paridas y ganado maduro. Dado que la aflatoxina B1 es la más tóxica, se ha establecido su DL_{50} para diferentes especies de animales (Tabla 3) (González, 1995).

El control de aflatoxinas en el mundo se basa en regulaciones sanitarias sobre su contenido en alimentos destinados a consumo humano y animal; algunos países consideran todos los alimentos y todas las aflatoxinas, en cambio otros países, sólo ciertos alimentos y la aflatoxina B1 por ser la mas tóxica (Ramírez, 1995; González, 1995).

Tabla 3. DL₅₀ de aflatoxina B-1 en diferentes especies de animales.

Especie animal	DL₅₀ de B1 (mg/kg)
Ratones (hamsters)	10.2
Ratones	9.0
Gallinas	6.3
Rata	5.5 – 17.9
Monos	2.2
Cabras	2.0
Cobayos	1.4 – 2.0
Perros	1.0
Trucha arcoiris	0.5 – 1.0
Cerdos	0.6
Patos	0.3 – 0.6

Citado por González (1995)

Por otra parte, la mezcla de grano contaminado con grano no contaminado se ha permitido sólo para maíz destinado al consumo animal. Actualmente estas mezclas son ilegales, y el grano que contiene más que 300 microgramos de aflatoxinas se debe destruir. La tendencia de los países desarrollados es a disminuir el límite máximo permitido de aflatoxinas, en los alimentos (Moreno y Gil, 1991).

Por lo que se ha señalado sobre las condiciones que favorecen el desarrollo de los hongos de granos y semillas, y dada la importancia de los hongos toxígenos, la manera más obvia de combatirlos es mantener los graneros y almacenes bajo condiciones que impidan su proliferación, usar inhibidores químicos para granos destinados a la alimentación animal, o bien utilizar fungicidas cuando se trate de maíz para semilla.

Para aminorar la producción de aflatoxinas en el campo, se debe tener como meta evitar que las plantas de maíz sufran estrés por falta de agua, la deficiencia de

nitrógeno, o densidades de siembra excesivas y sembrar cultivares que sean más resistentes a esas condiciones de estrés (Schneider, 1995; Moreno, 1995).

2.5 Control de plagas en el almacén

Desde tiempos inmemoriales los humanos se han preocupado por controlar las diferentes plagas que infestan sus cereales y granos almacenados, para lo cual han utilizado diversos métodos que han descartado y mejorado de acuerdo con sus posibilidades económicas y culturales. Los métodos de control más utilizados son los químicos, físicos, biológicos, genéticos y culturales.

2.5.1 Control químico

El uso de sustancias químicas para controlar un sin número de plagas data de épocas anteriores a la era cristiana, cuando algunos materiales de origen vegetal, grasas animales y diversos compuestos inorgánicos, se utilizaban en forma rudimentaria para matar ciertas especies de artrópodos ectoparásitos del hombre y de los animales domésticos. Sin embargo, no fue sino hasta el primer tercio del siglo XX cuando los plaguicidas sintéticos aparecieron, e iniciaron la llamada segunda generación de plaguicidas que revolucionó completamente todos los conceptos y técnicas existentes para el control de plagas (Aranda, 1987).

El uso de las piretrinas se remonta a la época de Marco Polo (1254–1324), cuando también se utilizaban sales de zinc, cobre, talio, plomo y cromo. En 1939, Paul Muller descubrió en Suiza las propiedades insecticidas del DDT (dicloro-difenil-

tricloro etano), un organoclorado ampliamente utilizado durante la Segunda Guerra Mundial para el control de piojos y chinches. Posteriormente surgirían algunos compuestos ciclodienos como aldrín, dieldrín y hexaclorobenceno. En las décadas de los cuarenta y cincuenta, los insecticidas organoclorados fueron desplazados por los organofosforados (pirimifos metílico), las piretrinas (deltametrina) y los carbamatos como eserina y carbaril (Rosiles, 1996b).

Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluyendo especies no deseadas que interfieren en la producción agropecuaria y forestal. Actualmente se calcula que el 65% del consumo nacional de plaguicidas es aplicado a cultivos de maíz, sorgo, soya, caña de azúcar, arroz, hortalizas y pastos. Entre los insecticidas más utilizados se encuentran aquellos que contienen como principio activo malatión, deltametrina, metil pirimifos, metil clorpirifos, isotiocianato de metilo, fosforo de magnesio, cloropicrina, 1,3-dicloropropeno y bromuro de metilo. Por otra parte, los fungicidas más utilizados son Captán, Carboxín (carbamida), mezclas de Captán-Carboxín, Clorotalonil (isoflalonitrilo), Fludioxonil, Mancozeb, Maneb (ditiocarbamato), Metalaxil, Quintozeno y Thiram, todos ellos para uso en cultivos o para proteger semilla para siembra, aunque el Carboxín origina efecto fitotóxico temporal altamente significativo en semilla de trigo. Cabe aclarar que el más efectivo para el control de especies de *Aspergillus* es el Captán, y que el Clorotalonil y el Quintozano son plaguicidas restringidos en México. Para grano almacenado se permite el fumigante bromuro de metilo (Moreno y col., 1991; Anónimo, 1998).

El uso de ácido propiónico como inhibidor de hongos en el almacén comenzó en Europa en 1970 y posteriormente se utilizó en Estados Unidos y Canadá. La dosis

depende del contenido de humedad del grano; para evitar la proliferación de hongos contaminantes como *Aspergillus* spp. se utiliza en dosis de 0.1 a 0.3 L/100 kg de maíz con humedad del 18 al 26 %. El grano tratado con este ácido no puede comercializarse en Estados Unidos y sólo puede usarse como alimento para ganado y aves de corral. Esta sustancia destruye la viabilidad de los granos y deja un olor característico en ellos; es el único permitido para usarse en granos de consumo humano, con el inconveniente de su olor (Anónimo, 1994; González, 1995).

En forma experimental se ha demostrado que la utilización conjunta del fungicida benlate y del insecticida lannate reduce el contenido de aflatoxinas en un nivel inferior que cuando ambos compuestos se aplican en forma independiente (González, 1995).

Con los fungicidas sintéticos siguientes se puede conseguir 100 % de inhibición del desarrollo de *A. flavus*, en las concentraciones indicadas: Agrosan G.N., 4000 ppm; Ceresan y Dithane M-45, 5000 ppm; Agrozim, Bavistin, Emison y Thiovit, 6000 ppm; azufre humectable, 7000 ppm; y oxiclورو de cobre, 8000 ppm (Mishra y Dubey, 1994).

En los años cuarenta y cincuenta se investigó sin éxito el control químico de los hongos de almacén; se descubrió que los fungicidas no funcionaban por la falta de agua bajo las condiciones en que se almacenaban las semillas (alrededor de 10 % de contenido de humedad). Luego en investigaciones posteriores se observó una mayor efectividad de los fungicidas cuando el contenido de humedad de la semilla es de 14 a 15 %; a la vez, se estableció que estos compuestos son efectivos para prevenir la infección más que para combatirla cuando ya está establecida (Moreno, 1995).

Aun cuando recientemente se le ha dado gran publicidad e impulso al uso de sustancias químicas para combatir a los hongos en el almacén, en México su uso se ha restringido a la adición de ciertos inhibidores orgánicos a los piensos preparados, con resultados no muy claros. Estos inhibidores son principalmente los ácidos orgánicos propiónico, acético, butírico y fórmico, y sus sales. Por la información que existe parece que hay microorganismos tolerantes a dichos compuestos, entre ellos algunas cepas de *A. flavus*. Entre los inconvenientes que presentan estos inhibidores, se puede señalar que son corrosivos, destruyen el poder germinativo de las semillas, imparten olores y sabores desagradables, por lo que sólo se recomiendan para piensos. Las semillas agrícolas normalmente son tratadas con fungicidas para protegerlas de los hongos que las pueden dañar en el momento de su germinación en el suelo y la emergencia, así como para evitar la transmisión de enfermedades asociadas a las semillas (Moreno, 1995).

2.5.2 Control físico

El control físico es uno de los métodos más antiguos; en la actualidad aún se aplican algunas técnicas. Dentro de estas técnicas se encuentran la manipulación de las temperaturas, humedades relativas y contenidos de humedad del grano, radiaciones y la aplicación de atmósferas controladas o modificadas (Ariza y col., 1992).

Una de las características del almacenamiento hermético es la reducción del oxígeno y el incremento de CO₂, por la respiración de los propios hongos, de las semillas y de los insectos. *A. flavus* no prolifera bajo atmósferas carentes de oxígeno;

por lo tanto, el almacenamiento hermético es una excelente alternativa para la conservación de los granos en el medio rural, particularmente en aquellas regiones donde los productores guardan parte de sus cosechas para autoconsumo (Moreno, 1995).

2.5.3 Control biológico

El término “control biológico” involucra el control de la población de una plaga mediante el uso de un organismo (insecto, bacteria, hongo, virus, protozoario o nemátodo) claramente definido como su enemigo natural (Markham, 1992).

La aplicación de aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* al grano de maíz en mazorca, redujo en forma importante la infección artificial de *A. flavus* (Luna-Romero y col., 2000). También, *P. fluorescens* aislado de la rizósfera del maíz, presentó actividad antagónica contra hongos que ocasionan enfermedades radicales y del follaje; en especial se evaluaron las cepas bacterianas que fueron activas sobre *A. flavus* (Luna-Romero y col., 2001).

Se ha determinado una variedad amplia de metabolitos activos de *P. fluorescens* BRG100, pero en particular se ha demostrado la actividad de las pseudofomina A y B y lipodepsipéptidos en el biocontrol de hongos fitopatógenos y arvenses (Pedras y col., 2003).

El micoparásito *Humicola fuscoatra*, aislado del esclerocio de *A. flavus*, produce los metabolitos monordenio y monocillina IV, los cuales inhiben el desarrollo de *A. flavus*; también produce los cerebrósidos C y D, los cuales fueron inactivos sobre este hongo (Wicklów y col., 1998).

2.5.4 Control genético

El uso de cultivares mejorados permite la obtención de rendimientos altos porque entre otras características, presentan mayor resistencia al ataque de insectos y hongos, y algunos presentan una disminución en el contenido de almidón, lo que les hace ser más duros (Gómez, 1995).

El mejoramiento genético del maíz generalmente incluye dentro de sus objetivos incrementar la resistencia al ataque de insectos, lo cual puede estar asociado a que el maíz madure más uniforme y rápidamente y que no constituya un buen sustrato para hongos como *A. flavus* (Gómez, 1995; Guo y col., 1994, 1996). La resistencia del maíz a la infección puede darse a través de la presencia de proteínas protectoras o inhibidoras (Guo y col., 1998), con inhibidores de la α -amilasa de *A. flavus* (Fakhoury y Woloshuk, 2001), o con la generación de compuestos volátiles, como el 2-furancarboxaldehído, que impiden el desarrollo y la formación de aflatoxinas por *A. flavus* (Zeringue, 2000).

2.5.5 Manejo integrado de plagas

Para solucionar los problemas del almacenamiento, además de los métodos preventivos se ha recurrido al sistema de control conocido como manejo integrado de plagas, el cual consiste en el empleo de dos o más de los métodos seleccionados de acuerdo con la plaga que se intenta controlar, como son la búsqueda de cultivares resistentes, la regulación de humedad del grano, el uso de productos químicos y de microorganismos antagónicos. Ninguna de estas medidas se considera la mejor, más

bien son complementarias y aplicables en determinadas circunstancias, por lo que no deben descartarse otras opciones que demuestren su viabilidad práctica y económica (Sifuentes, 1977; Moreno, 1995).

2.5.6 Medidas de control cultural

Algunos agricultores carecen de recursos económicos para fumigar sus cosechas por lo que adoptan métodos tradicionales para el control de plagas. Algunos de éstos son: rotación de cultivos, irrigación, uso de leguminosas y abonos orgánicos, destrucción de residuos de la cosecha anterior, eliminación de plantas hospederas, secado del grano por exposición al sol, ahumado del grano y almacenamiento en mazorcas con brácteas y recipientes herméticos (Anónimo, 1980; Lindblad y Druben, 1981; Schneider, 1995). También es común que en ciertas regiones de la República Mexicana se utilicen diversos materiales vegetales mezclados con los granos almacenados para evitar el ataque de plagas (Lagunes, 1994).

2.6 Plantas con actividad sobre *Aspergillus flavus*

La literatura relacionada con los metabolitos vegetales que reducen el desarrollo de las especies de *Aspergillus* o la síntesis de sus aflatoxinas es escasa; sin embargo, existen datos importantes al respecto tanto sobre materiales vegetales, como de metabolitos de diferentes plantas y metabolitos del propio maíz. Un ejemplo es la actividad inhibitoria del extracto clorofórmico de la raíz de zanahoria sobre el desarrollo de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxina B1, así como la inhibición

de la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* con la corteza de *Philodendron* sp. y con los extractos de *Brassica nigra* y *Zanthophyllum* sp., los cuales tienen menor actividad sobre *A. flavus*. Los extractos clorofórmicos de *Syzygium aromaticum*, *Illicium anisatum* y *Pimenta dioica* y de la mayoría de otras especias, inhiben la producción de micotoxinas. Los aceites esenciales de canela y clavo limitan el desarrollo de *A. parasiticus*, pero no la producción de sus aflatoxinas. Además, los metabolitos de maíz 1-heptanol, 2-nonanol, 1-nonanol, geraniol, 2-octanol, 2-decanol, brionona, 2,4-hexadienal, trans-2-hexanal y 2,4-decadienal inhiben completamente el desarrollo de *A. flavus* (Montes y Figueroa, 1995).

A través del potencial de desarrollo y la producción de aflatoxinas se evaluó la capacidad antimicótica del tomillo, semilla de apio, orégano, canela, jengibre, semilla de alcaravea, clavo, mostaza, semilla de ajonjolí y hoja de romero de paquetes comerciales, los cuales fueron inoculados con *A. flavus* y *A. parasiticus*. Después de 30 días se encontró crecimiento de *A. flavus* en todas las muestras con excepción de orégano, canela y clavo, y ligero crecimiento en mostaza. Las aflatoxinas se produjeron sólo sobre semilla de ajonjolí, jengibre, hoja de romero, mostaza, semilla de apio y de alcaravea. Así, se pudo determinar el efecto antifúngico y antiaflatoxígeno de las especias orégano, canela y clavo y del tomillo como probable inhibidor natural (Llewellyn y col., 1981).

Se han evaluado pequeñas proteínas/péptidos extraídos de *Indigofera oblongifolia* de la familia Fabaceae, involucrados en los mecanismos de defensa inducidos por patógenos, los péptidos P-2, P-3 y P-4 fueron activos sobre *A.*

fumigatus, los péptidos P-3 y P-4 fueron activos sobre *A. niger* y sólo el péptido P-4 fue activo sobre *A. flavus* (CMI de 25-50 µg/mL) (Dahot, 1999).

Algunos aceites esenciales (Tabla 4) no sólo inhiben el desarrollo del hongo sino también detienen la producción de aflatoxinas; la síntesis de aflatoxina B1, una de las más carcinógenas, fue completamente inhibida con 500 ppm del aceite esencial de *Azadirachta indica*, 1000 ppm del aceite de *Morinda lucida* (Bankole, 1997), y con 1.0 mg/mL de los aceites de geranio y de zacate limón (con un contenido de 70% de citral) (Paranagama y col., 2003). El aceite esencial de tomillo (0.4 mg/mL) y los de clavo y comino (0.6 mg/mL) también inhiben la producción de aflatoxinas (Hitokoto y col., 1980). Los compuestos que inhiben completamente el desarrollo del hongo y la formación de aflatoxinas fueron el geraniol, nerol y citronelol (CMI de 500 ppm), además del timol (250 ppm) y cinamaldehído (200 ppm) (Shin, 2003). Se determinó que el citral, el citronelal y el eugenol inhiben el desarrollo fúngico y la producción de aflatoxinas más de 8 días; sin embargo, después de 15 días de incubación, la producción de toxinas fue superior a los controles (Mahmoud, 1994).

La actividad de estos compuestos puede inhibir la penetración de los tejidos, la colonización del grano o la producción de propágulos del hongo, y en nivel celular, alterar la pared micótica (Montes y Figueroa, 1995).

Tabla 4. Aceites esenciales con actividad sobre *Aspergillus flavus*.

Fuente	Parte de la planta	Composición	Cantidad de prueba	CM₅₀ o zona de inhibición
<i>Carum carvi</i> L. Apiaceae (Soliman y Badeaa, 2002)	Semillas	Carvona 50 % Limoneno 35 %		2000 ppm
<i>Pimpinella anisum</i> L. Apiaceae (Soliman y Badeaa, 2002)	Fruto	Anetol 80.0 % Estragol 0.0 %, Safról		500 ppm
<i>Caesulia axillaris</i> Asteraceae (Varma y col., 2002)	Hojas	Aceite γ -asarone		1300 ppm 500 ppm
<i>Calendula officinalis</i> L. Asteraceae (Soliman y Badeaa, 2002)	Flores	Sesquiterpenos		2000 ppm
<i>Chrysanthemum coronarium</i> L. Asteraceae (Alvarez-Castellanos y col., 2001)	Flores	Alcanfor 29.2 %, α -pineno 14.8 %, β -pineno 9.5 % Liratil acetato 9.8 %	10.0 μ L 20.0 μ L	62.2 % 82. %
<i>Senecio aegyptius</i> var. <i>discoideus</i> Boiss. Asteraceae	Hojas	1,10-epoxifurano 66.3 %	1.0 mg	6.0 mm
(El-Shazly y col., 2002 a)	Flores	55.3 %	1.0 mg	8.0 mm
<i>Tanacetum santolinoides</i> (DC) Feinbr. y Fertig. Asteraceae	Hojas	Timol 17.96 % Trans-tujona 17.51 %	1.0 mg	8.0 mm
(El-Shazly y col., 2002 b)		Eucaliptol 4.65 %		
<i>Scorodophloeus zenkeri</i> Harms. Caesalpinaceae	Corteza	Sulfuros, alquiltiosulfuros sulfóxidos y sulfonas	10.0 μ L/ml	Fungistático
(Kouokam y col., 2002)				
<i>Brassica nigra</i> (L.) Koch Cruciferae (Nielsen y Rios, 2000)	Semillas	Isotiocianato de alilo	1.0 μ L	81 % 1.8 μ g/ml

Tabla 4. (Continuación).

Fuente	Parte de la planta	Composición	Cantidad de prueba	CMI, % o zona de inhibición
<i>Teloxys ambrosioides</i>				
(Montes y Figueroa, 1995)	Hojas			100 %
<i>Mentha piperita</i> L. Lamiaceae	Hojas	Mentol 36.4 % Eucaliptol 5.9 %		3000 ppm
(Soliman y Badeaa, 2002)				
<i>Ocimum basilicum</i> L. Lamiaceae	Hojas	Estragol, linalol, eugenol, Eucaliptol		3000 ppm
(Soliman y Badeaa, 2002)				
<i>Thymus capitatus</i> L. Lamiaceae	Hojas	Carvacrol	50 µg/mL	19.5 mm
(Kandil y col., 1994)				
<i>Thymus vulgaris</i> L. Lamiaceae	Hojas	Timol 53.9 % p-cimeno 25.2 %		100 % 500 ppm
(Montes y Figueroa, 1995)				
(Guynot y col., 2003)				
(Soliman y Badeaa, 2002)				
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Blume Hojas	Eugenol 78.5 %		100 %
Lauraceae	Corteza	Cinamaldehido		500 ppm
(Guynot y col., 2003)				
(Montes y Figueroa, 1995)				
(Soliman y Badeaa, 2002)				
<i>Laurus nobilis</i> L. Lauraceae	Hojas	Eugenol 57.0 % Eucaliptol		100 %
(Guynot y col., 2003)				
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill & Flores		Eugenol 83.9 % Acetato de eugenilo 10 %	1.0 µL	100 %
L.M. Perry Myrtaceae				
(Montes y Figueroa, 1995)				
(Nielsen y Rios, 2000)				
(Guynot y col., 2003)				

Tabla 4. (Continuación).

Compuesto	Parte de la planta	Composición	Cantidad de prueba	CMI, % o Zona de inhibición
<i>Jasminum officinarum</i> var. Hojas <i>grandiflorum</i> Oleaceae			0.1 mL	100 %
(Jain y Agrawal, 2002)				
<i>Jasminum sambae</i> (L.) Ait. Oleaceae	Hojas		0.1 mL	100 %
(Jain y Agrawal, 2002)				
<i>Piper angustifolium</i> Lam. Piperaceae	Hojas	Alcanfor 25.3 % Canfeno 22.4 %		100.0 µg/mL
(Tirillini y col., 1996)				
<i>Cymbopogon citratus</i> Sapf. Poaceae	Hojas	Citral 72.8 % Geraniol 2.9 % Linalool 1.46 %		1000 ppm
(Pattnaik y col., 1997)				
(Mishra y Dubey, 1994)				
(Paranagama y col., 2003)				
<i>Cymbopogon flexuosus</i> Wats. Poaceae	Hojas	Citral		0.4 µL/mL
(Shahi y col., 2003)				
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Hojas	Limonenol, γ -terpineno	3000 ppm	80 %
Rutaceae (Mishra y Dubey, 1994)				
<i>Citrus reticulata</i> Blanco Rutaceae	Pericarpio	Limonenol	3000 ppm	40 %
(Mishra y Dubey, 1994)				
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck Rutaceae	Pericarpio	Limonenol, β -mirceol, linalol,	3000 ppm	60 %
(Mishra y Dubey, 1994)				
<i>Helietta parvifolia</i> A. Gray Benth.	Hojas	Eugenol, metil eugenol safrol e isosafrol	600 ppm	Fungistático
Rutaceae				
(Rovalo y col., 1983)				

2.7 Familia Rutaceae

La familia Rutaceae esta formada por árboles, arbustos o hierbas con hojas alternas u opuestas, sin estípulas, simples, palmati o pinnado-compuestas, algunas veces reducidas a espinas y siempre dotadas de glándulas translúcidas, inflorescencia cimosa, paniculada, racimosa, en forma de espiga o algunas veces las flores solitarias; flores hermafroditas o unisexuales; sépalos 3 a 5; pétalos 3 a 5, rara vez más; estambres 3 a 10, filamentos libres o unidos en la parte inferior; ovario súpero con 3 a 5 lóculos con placentación axilar; óvulos 1 o varios en cada lóculo, estilos libres o unidos; fruto en forma de folículo, cápsula, sámara, drupa o baya, con una o varias semillas en cada lóculo. Familia de aproximadamente 140 géneros y 1300 especies, ampliamente distribuida en regiones tropicales de los Hemisferios Norte y Sur. La familia posee gran importancia económica porque en ella se agrupan todos los frutales cítricos (Rzedowski y col., 2001).

En la evaluación *in vitro* de la actividad sobre *A. flavus* Link de seis rutáceas recolectadas en diversas etapas fenológicas, *Casimiroa pringlei*, *Citrus aurantiifolia*, *C. aurantium*, *Ptelea trifoliata* y *Helietta parvifolia* manifestaron actividad antifúngica. Los extractos etanólicos obtenidos por maceración de *C. aurantiifolia* (frutos inmaduros y maduros) y *C. pringlei* (ramillas con flor) manifestaron actividad protectora del maíz cacahuazintle a la infección por *A. flavus*, durante los 20 días de almacenamiento evaluados (Cárdenas, 1998).

2.7.1 *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl.

Arbusto o arbolito de 3 a 5 m; hojas compuestas de 2 a 3 hojuelas obovadas a elípticas, lisas y enteras de 3 a 9 cm de largo; flores amarillo-verdosas; fruto oval o globoso de 1.2 a 1.8 cm de ancho con semillas de 10 a 12 mm (Figura 2). Se ha registrado en los estados de Durango, Nuevo León y San Luis Potosí (Standley, 1923; Martínez, 1979).

En el estado de San Luis Potosí, se le conoce en los municipios de Cerritos y Guadalcázar, en vegetación de matorral desértico micrófilo con izote y en matorral submontano, a una altitud promedio de 1470 m. Es llamada “Zapotillo” (Guadalcázar, S.L.P.) (Martínez, 1979).

No tiene utilidad registrada, pero su extracto etanólico ha demostrado poseer actividad fungicida sobre *Aspergillus flavus* Link e inhibe la producción de aflatoxinas (Cárdenas, 1998).

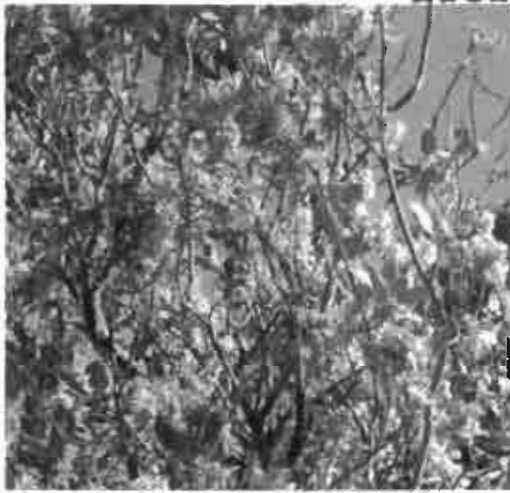


Figura 2. *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl.

2.7.2 *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

Arbusto o arbolito de 2 a 7 m de alto, no ramificado; hojas alternadas, pinnadas, hojuelas 5 a 11, lanceoladas, de 2.5 a 10 cm de largo, color ocre en el envés, verde en el haz; flores pequeñas, blancas, en un largo panículo terminal; frutos pequeños, verdosos y de 2 a 5 carpelos (Figura 3). Se encuentra en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz e Hidalgo (Standley, 1923).

Se ha encontrado en el sur del estado de San Luis Potosí. Forma parte del matorral submontano hacia sus límites con el bosque de encino, en laderas calizas y a una altitud promedio de 1550 m. Se le conoce como rosa amarilla o Santo Domingo en el sureste de San Luis Potosí; rantó en lengua otomí en Hidalgo; tzatzubtzá en la huasteca potosina; y cococuahuitl en lengua náhuatl, en el sureste de San Luis Potosí (Martínez, 1979).

Las partes aéreas de *D. bicolor* se han utilizado en la medicina tradicional contra infecciones bacterianas y como antiinflamatorio (Aguilar y col., 1994). Fue publicada la presencia de los alcaloides dictamnina y skimmianina (Domínguez y col., 1971). De la parte aérea de *D. bicolor* se aislaron las cumarinas heraclenina, seselina, psoralena, imperatorina, skimmianina y heraclenola (García-Argáez y col., 2000).



AGRICULTURA SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO



Figura 3. *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

2.8 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae es la más vasta del reino vegetal. Se encuentra prácticamente en toda la superficie de la tierra, pero está especialmente bien representada en las regiones secas. En la zona árida del estado de San Luis Potosí las asteráceas son uno de los principales componentes de la flora (Salas, 1987).

En la altiplanicie del estado de San Luis Potosí se encuentran 11 tribus con 73 géneros, que representan el 25% de los géneros reportados por Rzedowski (1978, citado por Salas, 1987) para la República Mexicana, y 190 especies. Más del 80% de estas especies quedan incluidas en las tribus Heliantheae, Tageteae, Helenieae, Eupatorieae y Astereae (Salas, 1987).

Dentro de la familia Asteraceae, se estudió la actividad antifúngica de los extractos, obtenidos por destilación con arrastre de vapor, de 31 especies sobre *Fusarium oxysporum* y *Trichophyton mentagrophytes*. La máxima actividad se observó con el extracto de las flores de *Tagetes erecta*, seguida del extracto de la planta completa de *Tagetes patula* y del extracto de las hojas de *T. erecta* (Rai y Acharya, 1999).

2.8.1 *Chrysactinia mexicana* A. Gray

Es un subarbusto o arbustito perenne hasta de 60 cm de alto; glabro o casi glabro, muy aromático; las ramas lignificadas conservan las bases de las hojas caídas; hojas densamente imbricadas sobre las ramas, en su mayoría alternas, algo carnosas, lineares de 5 a 15 mm de largo, verdes oscuras; cabezuelas solitarias sobre pedúnculos hasta de 5 cm de largo, bracteados; involucro anchamente campanulado a subhemisférico, de 4 a 6 mm de alto, sin cálculo; sus brácteas (± 12), linear-oblongas, agudas en el ápice, con una gran glándula oleífera en la parte superior; receptáculo convexo; flores liguladas (± 12), amarillas, sus láminas oblongas, de 6 a 10 mm de largo; flores del disco 20 a 30, sus corolas amarillas, de 4 a 6 mm de largo; aquenios lineares, de 3 a 4 mm de largo, estriados, negruzcos, algo pubescentes; vilano más largo que el aquenio, sus cerdas de color blanquecino-castaño (Figura 4). Se encuentra desde Nuevo México y Texas hasta Veracruz y Oaxaca. Fuera del Valle de México está mayormente ligada al sustrato de roca caliza (Rzedowski y col., 2001).

En el estado de San Luis Potosí, esta especie se encuentra en planicies y laderas de cerros calizos y yesosos con matorral desértico, en los municipios de Charcas, Guadalcázar, Moctezuma, Soledad y Villa Juárez, en altitudes que varían entre 1200 y 2000 m (Salas, 1987). Se le conoce como Damiana o Falsa Damiana en Coahuila, Chihuahua y Durango; Garañona y Romerillo en Coahuila e Hidalgo; Hierba de San Nicolás en San Luis Potosí; y Mariola en Puebla y Valle de México (Martínez, 1979).

Se le utiliza en medicina tradicional por sus propiedades como afrodisíaco, antiespasmódico, sudorífico, diurético, tónico y febrífugo (Juárez y col., 1996). Se usa en casos de menstruación dolorosa, enfermedades venéreas y leucorrea

(González, 1984). También se le atribuyen propiedades insecticidas en el control de plagas del maíz almacenado (Villavicencio y col., 1995), especialmente sobre el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motsch (Juárez, 1998; Hernández y col., 2000). Presentó actividad antifúngica sobre dermatofitos (Zavalza, 2001) y amebicida sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (Pérez, 2002).

De las partes aéreas de esta planta, con éter de petróleo se extrajo un aceite verdoso que contiene 1,8-cineol y sitosterol, acetilenos y tiofenos (Domínguez y Pierantozzi, 1972). Se aislaron derivados de tiofenos que son característicos del género *Tagetes* (Downum y col., 1985). El compuesto 3Z, 6Z, 8Z-dodecatrieno-1-ol, fue previamente aislado como una feromona de termitas (Domínguez y col., 1985). Posteriormente, se aislaron de esta planta nuevos constituyentes monoterpénicos, como son el 3,6-dihidroxipiperitona, 7-acetoxipiperitona, 7-hidroxipiperitona y 6-hidroxipiperitona (Delgado y Ríos, 1991).

Del extracto metanólico de las hojas de *Chrysactinia mexicana* se obtuvo una mezcla de flavonoides, el 3-glucósido y 7-glucósido de quercetagina, el 6-hidroxicanferol 7-glucósido y el 6-hidroxicanferol 7-acetilglucósido. Estos compuestos, según Harborne y col., (1991), podrían ser útiles como marcadores taxonómicos de la tribu *Tageteae*. También fueron aislados los constituyentes β -sitosterol, 5 α -hidroxi-8,9-dihidroxicarvona y 5 β -hidroxi-8,9-dihidroxicarvona; los últimos dos compuestos también fueron aislados de *Chenopodium multifidum* y mostraron toxicidad sobre *Artemia salina* (LC₅₀ 478 ppm y 48 ppm, respectivamente) (Delgado y col., 1993).



Figura 4. *Chrysactinia mexicana* A. Gray

2.8.2 *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake

Entre los vegetales silvestres del estado de San Luis Potosí debe citarse esta especie, que aunque poco abundante tiene diversas aplicaciones y posiblemente en un futuro próximo llegue a explotarse más intensamente (Rzedowski, 1955; Salazar, 1999).

Es una planta vivaz, herbácea o subarborescente de 25 a 50 cm de altura; ligeramente pubescente. Los tallos, en número de uno a varios, generalmente no se ramifican. Las hojas opuestas, los pares distantes entre sí, con peciolo cortos, los limbo obovados, de 2 a 4 cm de largo por 1 a 3 cm de ancho. Las flores amarillas reunidas en cabezuelas, cada una de las cabezuelas dando la apariencia de una sola flor. Las cabezuelas una o pocas, situadas en la parte terminal de los tallos, sobre pedúnculos muy alargados y desnudos (Figura 5). Florece en la época de lluvias. Las raíces son delgadas, cilíndricas, ligeramente carnosas y con engrosamientos más o menos equidistantes; la parte medular fibrosa presenta coloración amarilla (Rzedowski, 1955).

El área en que vive se restringe a la porción limítrofe entre los estados de San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro y particularmente en la Sierra Gorda. Vegeta en bosques templados y húmedos de encinos y pinos, sobre suelos algo ácidos y ricos en materia orgánica, entre los 1800 y los 2400 m de altitud (Rzedowski, 1955).

En el estado de San Luis Potosí se encuentra en la Sierra Gorda entre los municipios de San Ciro y Río Verde a una altitud de 1300 a 2350 m. Florece de agosto a octubre, o de septiembre a diciembre; en cultivo el tiempo de floración es mayor (Salazar, 1999).

Se le llama chilcuague, chilcuán, chilcúam, pelitre, peritre y chilaunagua en San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro. Chilmecatli (lengua náhuatl) (Martínez, 1979).

Un fragmento de raíz de la planta colocado sobre la lengua produce en poco tiempo un marcado efecto anestésico local y provoca fuerte secreción de saliva. Debido a su sabor picante se emplea entre la gente de campo como condimento y también como aditivo de bebidas alcohólicas, aunque según afirman, a veces es peligroso porque en cantidades fuertes produce intoxicaciones y puede causar la muerte (Salazar, 1999).

Es muy extendido su empleo como calmante de dolores de muelas, aplicándose directamente un extracto acuoso o alcohólico de la raíz o bien masticando un trocito. Se dice que también es de utilidad en casos de resfriados.

Dada la escasez de la especie se realizaron experimentos de propagación y aclimatación, de los cuales pudo deducirse que el chilcuague es susceptible de trasplantarse y en el cultivo se desarrolla con mucho mayor rapidez (Salazar, 1999).

En una investigación general de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana los extractos de *H. longipes* presentaron propiedades antisépticas significativas, lo cual respalda sus usos tradicionales (Gutiérrez-Lugo y col., 1996).

H. longipes es una planta con una larga tradición en la herbolaria indígena, pues es usada en México como especia, insecticida y en medicina tradicional desde hace varias centurias. Muchas otras especies como *Zanthoxylum piperitum* que contienen alcanidas han sido utilizadas en la medicina tradicional en las culturas antiguas (Hashimoto y col., 2001).

Recientemente se ha empleado la raíz de chilcuague para la preparación de polvos insecticidas con resultados muy prometedores. Durante la última Guerra Mundial el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos promovió extensas investigaciones: algunos de sus resultados se publicaron en varios artículos. Se aisló de la planta un principio activo que corresponde a la fórmula condensada de $C_{14}H_{25}NO$ y que es una amida: N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida, denominada también afinina, debido a la previa identificación errónea de la planta como *Erigeron affinis* D.C. (Acree y col., 1945). También se encontró que contiene alcanidas hidroxiladas, isobutilamidas y la sanshoamida, una de las primeras amidas aisladas (Molina-Torres y García, 2001). La alcanida afinina es el mayor compuesto bioactivo presente en las raíces de *H. longipes*, y representa el 0.78 % de su peso seco (Molina-Torres y col., 1996).

Se ha demostrado la actividad antifúngica y antibacteriana de la afinina y de dos alcanidas obtenidas por reducción catalítica de la afinina, la N-isobutil-2E-decanamida y N-isobutil-decanamida. La afinina, principal compuesto de la fracción

lipídica, es la responsable de la actividad fungitóxica observada en la raíz de esta planta, pero ninguno de los dos compuestos obtenidos por catálisis mostró actividad fungitóxica. La afinina presento actividad sobre las bacterias pero la N-isobutil-2E-decanamida parcialmente reducida, mostró la mayor potencia sobre *E. coli* y *Erwinia caratovora*, además de actuar sobre *B. subtilis*, causándoles 100 % de inhibición a 5.0, 5.0 y 50 mg/L respectivamente. Sin embargo la N-isobutil-decanamida reducida totalmente, mostró 100 % de inhibición a 150 mg/L sobre *B. subtilis*, pero no fue inhibidor de los otros microorganismos. Los resultados indican que el mecanismo de acción de las alcaninas en los hongos y bacterias puede ser diferente. La afinina fue más activa en hongos, lo cual sugiere que la instauración 2E es insuficiente para la acción, y que se requiere su conjugación con la instauración en las posiciones 6Z, 8E o ambas. Los hongos que tienen micelio hialino fueron más susceptibles que aquellos con micelio colorido. De igual forma Singh y col. (1990) observaron que los hongos con conidios coloridos, requieren altas concentraciones de ajoeno para inhibir la germinación de los conidios (Molina-Torres y col., 2004).



Figura 5. *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cuatro especies vegetales estudiadas se eligieron por medio de un estudio exploratorio con ensayos preliminares para establecer su actividad antifúngica.

3.1 Estudio exploratorio

Se seleccionaron cuatro especies vegetales: dos Rutáceas *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl. y *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk y dos Asteráceas: *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake, tomando en cuenta que existían pocas referencias bibliográficas relacionadas con ellas. Las localidades para su recolección fueron seleccionadas de acuerdo con la revisión de las etiquetas de ejemplares existentes en el herbario “Isidro Palacios” del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (SLPM). Las plantas se recolectaron en etapa de floración, con excepción de *D. bicolor* que se obtuvo en etapa vegetativa. Las plantas fueron autenticadas por el Taxónomo José García Pérez y un ejemplar se depositó en el herbario SLPM para su registro (Tabla 5).

3.1.1 Preparación del material vegetal

Se separaron las hojas de las plantas; estos materiales se colocaron en bandejas de papel absorbente y se secaron a la sombra por un periodo de 10 a 25 días, de acuerdo con el tipo de material vegetal. Las hojas se molieron en una licuadora de tipo casero.

Tabla 5. Registro de las plantas de las familias Rutaceae y Asteraceae recolectadas en el estado de San Luis Potosí.

Nombre botánico y familia	Etapas fenológica	Fecha de recolección para registro	Localidad	Altitud msnm	Registro Herbario "Isidro Palacios" (IIZD UASLP)
<i>Casimiroa pringlei</i> (S. Watson) Engl. Rutaceae	Floración	24-III-2002	El Aguaje de los García, Mpio. de Guadalcázar, S.L.P.	1 470	SLPM 37573
<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk. Rutaceae	Floración	25-I-2002	Km. 63 S.L.P.-Río verde a 3 km de las Rusias, Mpio. de Villa de Zaragoza, S.L.P.	1 550	SLPM 37574
<i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray.) Blake Asteraceae	Floración	5-IV-2002	IIZD UASLP Altair #200 Fracc. El Llano, San Luis Potosí, S.L.P.	1 850	SLPM 37572
<i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray Asteraceae	Floración	29-III-2002	Dos km del entronque a Guadalcázar, Mpio. de Guadalcázar, S.L.P.	1 450	SLPM 37571

3.1.2 Obtención de los extractos vegetales crudos

Las muestras vegetales molidas se sometieron a procesos de extracción comunes, como son la maceración, la extracción por calentamiento y con la columna de gravedad o de percolación, con disolventes de diferente polaridad.

Se utilizó una serie de disolventes de polaridad creciente (hexano, cloroformo, acetato de etilo, etanol, metanol y agua), y se realizó la extracción hasta agotamiento del polvo vegetal con cada uno de ellos; se obtuvieron 52 extractos.

3.1.2.1 Extracción por columna de gravedad o percolación en serie. En una columna de percolación se colocaron 20 g de polvo foliar y se agregó hexano hasta cubrir completamente la muestra; se dejó en reposo por 48 horas y se percoló hasta agotamiento del material vegetal, para lo cual se requirieron aproximadamente 500 mL de dicho disolvente. Se dejó secar el contenido de la columna de percolación, se continuó la extracción con cloroformo y se repitió el procedimiento con etanol. Cada uno de los extractos obtenidos se concentró en un rotavapor a presión reducida, a 29 °C.

3.1.2.2 Extracción por calentamiento en serie. En un matraz de fondo redondo se colocaron 20 g de polvo foliar con 100 mL de hexano, se colocó un refrigerante en posición de reflujo y se calentó al punto de ebullición del disolvente, por cuatro horas. Se dejó enfriar, se filtró con papel Whatman 2 al vacío. El polvo residual se extendió sobre papel absorbente para eliminar por evaporación cualquier resto de hexano. Posteriormente se sometió a extracción con cloroformo y se repitió el procedimiento con etanol y agua destilada. Los extractos orgánicos fueron

concentrados a presión reducida en un rotavapor y el agua se eliminó por liofilización.

3.1.2.3 Extracción por maceración. Este método de extracción se realizó con los siguientes disolventes en forma independiente: hexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, etanol y metanol. En un frasco de cierre hermético se colocaron 20 g de polvo foliar y aproximadamente 100 mL del disolvente correspondiente. Se dejó en reposo al abrigo de la luz por 10 días y se filtró con papel Whatman 2 al vacío. Los extractos se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.2 Ensayo biológico

Las evaluaciones se llevaron a cabo con base en un diseño experimental con tratamientos asignados completamente al azar y cinco repeticiones. La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales se realizó sobre *Aspergillus flavus* Link cepa 1273 SRRC del *National Center for Agricultural Utilization*, en Peoria, Illinois.

3.2.1 Preparación del inóculo de *Aspergillus flavus* Link

El inóculo se estandarizó por el método turbidimétrico a un contenido de 1×10^6 propágulos/ mL, lo cual se comprobó por la cuenta de las colonias obtenidas por siembra en cajas de Petri con agar Czapek (Difco), con incubación a 28 °C por 72 horas (Cárdenas, 1998).

3.2.2 Determinación de la actividad antifúngica

En todos los casos la evaluación de la actividad antifúngica se realizó con la siguiente metodología. Se aplicó el método de difusión en placa y la técnica de pozo; para ello se prepararon cajas de Petri de 5.0 cm de diámetro con agar Czapek, las cuales se inocularon por espatulación con 50 μ L del inóculo estandarizado (100 000 propágulos del hongo). Se perforaron los pozos con un asa de 0.6 cm de diámetro y la disolución de las sustancias a evaluar (tratamientos) se depositaron en el pozo, se dejaron en reposo para permitir la difusión en el medio y se incubaron a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

Se determinó la actividad antifúngica por el diámetro de la inhibición del desarrollo del hongo en cm; se usaron como testigos los disolventes utilizados como vehículos, y como control positivo de actividad se utilizaron 5.0 μ g de Daconil (Clorotalonil 75 % activo) de Coraza.

3.2.3 Determinación de la actividad fungistática o fungicida y de la concentración mínima fungicida (CMF)

En todos los casos los extractos vegetales o sustancias que presentaron actividad antifúngica se evaluaron para determinar si su acción era fungicida o fungistática, y a la vez para establecer su CMF. Estas actividades se establecieron por inhibición de desarrollo del *A. flavus* en caldo Sabouraud dextrosa (CSD) (Bioxon), y se confirmaron mediante resiembra en agar Czapek. Antes de llevar a cabo los ensayos, se estableció la cantidad máxima de hexano tolerado en los cultivos líquidos sin causar interferencia en su desarrollo, la cual fue de 150 μ L.

En tubos de ensaye que contenían 4.0 mL de CSD se colocó el volumen correspondiente de la dilución de la muestra a evaluar y se inoculó con 1000 propágulos de *A. flavus* del inóculo estandarizado, se homogenizó y se incubó a 28 °C por 72 horas. Pasado este tiempo, se homogenizó el cultivo en medio líquido en el vortex y luego se sembró 0.1 mL de él en la superficie de agar Czapek en tubos inclinados, se incubó a 28 °C por 72 horas y se observó el desarrollo de *A. flavus* Link.

Se consideró actividad fungistática cuando hubo ausencia visible de desarrollo en los cultivos líquidos en CSD y se estableció su concentración mínima inhibitoria (CMI). Los cultivos líquidos se homogenizaron y 100 µL de éstos se sembraron sobre agar Czapek. La actividad fungicida, se evaluó en la resiembra sobre agar Czapek en tubos inclinados; la CMF se consideró como la menor cantidad/mL de la muestra necesaria para matar el hongo *in vitro*.

3.2.4 Análisis estadístico

Los datos experimentales registrados se sometieron a análisis estadístico descriptivos, cálculo de medias y errores estándar.

3.3 Estudio fitoquímico preliminar

A los extractos hexánicos obtenidos por maceración de las cuatro especies elegidas, *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl., *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk, *Chrysactinia mexicana* A. Gray y *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake, se les realizó un estudio fitoquímico preliminar para conocer cuáles grupos químicos estaban

presentes. Así se procedió a la identificación de metabolitos secundarios como esteroides, terpenos, flavonoides, sesquiterpenlactonas, cumarinas, taninos, catequinas, quinonas y alcaloides, mediante reacciones de coloración y precipitación y su comprobación por cromatografía en capa fina (Zweig y Sharma, 1984; Evans, 1991; Domínguez, 1985; Bruneton, 1991; Harborne, 1998).

3.4 Plantas seleccionadas, recolección, preparación y registro

En la zona semiárida del estado de San Luis Potosí se obtuvieron muestras suficientes de las cuatro especies de plantas silvestres elegidas. Estas fueron recolectadas en la fase de desarrollo con mayor actividad antifúngica y en las localidades seleccionadas (Tabla 5), lo cual se estableció en el estudio exploratorio. Se separaron las hojas y se sometieron a secado sobre papel absorbente por 10 a 25 días para obtener por lo menos 3 a 4 kg de las hojas deshidratadas, y posteriormente se molieron. En forma simultánea se obtuvieron ejemplares de herbario para su identificación y registro.

3.5 Preparación de los extractos crudos más activos de cada una de las cuatro especies vegetales seleccionadas y su CMF

Las hojas secas y molidas se sometieron al proceso de extracción seleccionado con base en el estudio exploratorio. Se obtuvieron extractos hexánicos por percolación de *C. pringlei* y de *C. mexicana*; y extractos hexánicos por maceración de *D. bicolor* y de *H. longipes*. A estos cuatro extractos se les determinó su CMF.

3.6 *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl.

Se preparó el extracto hexánico por percolación de 4.0 kg de las hojas secas y molidas de *C. pringlei*, el disolvente se eliminó por destilación en un rotavapor a presión reducida, a 29 °C.

3.6.1 Separación cromatográfica del extracto hexánico de *C. pringlei*

3.6.1.1 Primer fraccionamiento. El extracto hexánico de *C. pringlei* se sometió a una separación por cromatografía en columna empacada con sílice gel 60 (0.063 – 0.200) (Merk) como adsorbente, y como fase móvil se utilizó el hexano, con proporciones crecientes de acetato de etilo, y finalmente las columnas se lavaron con metanol. De cada columna se obtuvieron 10 fracciones de volúmenes aproximados de 150 mL cada una, de acuerdo con su propio desarrollo. Todas las fracciones se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida y a 29 °C.

Estas fracciones posteriormente se analizaron por cromatografía en capa fina, en cromatoplasmas Merk F₂₅₄ de sílice gel como adsorbente y como fase móvil el hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo. Las fracciones que presentaron el mismo patrón cromatográfico se juntaron. A todas las fracciones se les determinó su actividad antifúngica.

Una vez determinado cuáles fueron las fracciones con actividad antifúngica, se reunieron y se procedió a una segunda separación por cromatografía en columna.

3.6.1.2 Segundo fraccionamiento. Para la segunda separación por cromatografía en columna se utilizó sílice gel 60 (0.063 – 0.200) como adsorbente y cloroformo como fase móvil, con proporciones crecientes de acetato de etilo. Se

obtuvieron seis fracciones con volúmenes aproximados de 150 mL, de acuerdo con su propio desarrollo. Todas las fracciones se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida y a 29 °C.

A estas fracciones se les evaluó su actividad antifúngica. Luego las fracciones activas se reunieron y se procedió a su separación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

3.6.2 Separación de las fracciones activas por HPLC

El establecimiento del método para la separación se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia Varian Pro Star equipado con una columna de fase normal, 4.0 por 250 mm (Econosphere), empacada con Sílice 5.0 μm , y con un detector de luz evaporativa Alltech ELSD 2000. Como fase móvil se utilizó el sistema hexano/acetato de etilo a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min; se evaluaron diversas proporciones de fase móvil y tiempos de desarrollo del método, hasta establecer la proporción final con la mejor resolución: hexano/acetato de etilo 75/25 y tiempo de desarrollo cromatográfico de 50 min.

Una vez determinado el método de separación, se escaló el procedimiento a cromatografía semipreparativa y la separación se realizó usando una columna semipreparativa de 22.0 por 250 mm, (Econosphere) empacada con Sílice 5.0 μm , con la misma fase móvil (hexano/acetato de etilo 75/25), una velocidad de flujo correspondiente a 4.0 mL/min y tiempo de desarrollo cromatográfico de 50 min.

Las fracciones se recolectaron a intervalos de 1 min durante todo el fraccionamiento, hasta un total de 50. Este procedimiento se repitió 15 veces hasta concluir con toda la muestra.



3.6.3 Separación de la fracción activa de *C. pringlei* por cromatografía de capa preparativa

Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm con sílice gel para cromatografía en capa preparativa con un espesor aproximado de 0.5 a 1.0 mm, las cuales fueron activadas por calentamiento a 100 °C por dos horas. La disolución en cloroformo de la mezcla de las fracciones activas obtenidas en el HPLC se aplicó en línea recta a dos centímetros de uno de los extremos de las placas, las cuales fueron desarrolladas con el sistema hexano/acetato de etilo 75/25 en cámara hermética.

Las zonas de separación de las placas se rasparon y se extrajeron con cloroformo por agitación continua durante una hora. Se filtraron para eliminar el sílice y el filtrado se evaporó a temperatura ambiente para eliminar el cloroformo.

La actividad antifúngica de las fracciones obtenidas se evaluó por el método de difusión en placa y la técnica de pozo.

3.6.4 Determinación de la CMF de las fracciones obtenidas en capa preparativa

Se prepararon disoluciones en cloroformo de las fracciones obtenidas de la separación en capa preparativa y se evaluó la CMF en CSD y resiembra en agar Czapek. Para determinar su actividad fungistática o fungicida.

3.7 *Chrysactinia mexicana* A. Gray

3.7.1 Obtención del aceite esencial de las hojas de *Chrysactinia mexicana* A. Gray.

La planta fresca recolectada se conservó en refrigeración a 4.0 °C el tiempo que duró el proceso extractivo. 1.6 kg de hojas frescas se extrajeron por arrastre de vapor y el aceite esencial se recuperó del agua de arrastre por extracción con éter etílico en un embudo de separación; este procedimiento se repitió tres veces.

La solución etérea se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se destiló en un rotavapor a presión reducida, a temperatura ambiente. Se utilizaron 10 L de éter etílico que se reutilizaron tres veces. El aceite esencial extraído se conservó en refrigeración a 4.0 °C.

3.7.2 Determinación del índice de refracción del aceite de *C. mexicana*

Se realizó en un refractómetro de AB, calibrado a 20 °C con agua destilada.

3.7.3 Determinación de la densidad del aceite esencial de *C. mexicana*

Se realizó con un micropignómetro a 20 °C (Shriner y col., 1991).

3.7.4 Actividad antifúngica del aceite esencial de *C. mexicana*

La actividad antifúngica del aceite esencial se determinó por la técnica de pozo en concentraciones de 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 mg de aceite esencial disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), para favorecer su difusión en el medio de cultivo. Las disoluciones se depositaron en el pozo y las cajas se incubaron a 28 °C por 72 horas;

después de este periodo se midió el diámetro de la inhibición del desarrollo del hongo en cm.

3.7.5 Determinación de la composición del aceite esencial de *C. mexicana* por cromatografía de gases

La identificación de los componentes del aceite esencial de *C. mexicana* se llevó a cabo por cromatografía de gases. Para ello se utilizó el cromatógrafo de gases Varian CP – 3800 (Tabla 6), equipado con una columna capilar CP-Sil-SCB-MS de 30.0 m, un espesor de capa 25.0 μm y un detector de ionización de flama (FID). Se usó nitrógeno como gas acarreador. La identificación se realizó por comparación con estándares comerciales.

Especificaciones iniciales del cromatógrafo de gases Varian CP - 3800.

Horno	250 ° C
Flujo de columna	1.0 mL/min
Presión de columna (psi)	10.0
Horno de columna	50 ° C
Horno FID	250 ° C
Señal FID (mV)	0.088

Se evaluaron 10 diferentes métodos, los cuales variaron en cuanto a temperatura de trabajo, tiempo de desarrollo del método, incremento de la temperatura y utilización de rampas de temperatura sostenida a determinados intervalos de tiempo.

Tabla 6. Método de análisis en el cromatógrafo de gases Varian CP-3800, del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* A. Gray.

Etapa	Temperatura ° C	Velocidad ° C/min	Duración (min)	Tiempo total (min)
Inicial	50	-	0.0	0.00
1	85	4.0	0.0	8.75
2	130	1.0	0.0	53.75
3	165	4.0	0.0	62.50
4	220	1.0	0.0	117.50

3.7.6 Determinación de la composición del aceite esencial de *C. mexicana* por CG/MS

El análisis del aceite esencial de *C. mexicana* para la identificación de los compuestos mayoritarios se desarrolló en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 GC equipado con una columna capilar CP-Sil-SCB-MS (DB Wax) de 30.0 m, 0.25 mm de diámetro interno y espesor de película de 25 μm , acoplado a un espectrómetro de masas modelo Jeol GC-mate, con un detector de sector magnético de 15 cm. La fase móvil fue helio con un flujo de 1.0 mL/min. La temperatura inicial fue 50 °C y se incrementó hasta 85 °C a una velocidad de 4.0 °C/min, seguido de un incremento hasta 130 °C a una velocidad de 1.0 °C/min y finalmente un incremento a 4.0 °C/min hasta 220 °C por 10 min. Se usó una energía de ionización de 70 eV. El tiempo de encendido del filamento del espectrómetro de masas fue de 10 min. La identificación se realizó por comparación con los tiempos de retención y los espectros de masas de compuestos comerciales y con los de la base de datos NIST/NBS.

3.7.7 Determinación de la actividad fungistática o fungicida y de la CMF del aceite esencial de *C. mexicana* y de sus componentes mayoritarios

La actividad fungicida o fungistática y la CMF del aceite esencial de *C. mexicana* y sus tres compuestos mayoritarios se evaluó a través del grado de inhibición del desarrollo de *A. flavus* en CSD y se confirmó mediante resiembra en agar Czapek.

Para ello se preparó una disolución del aceite esencial en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración de 50 mg/mL. Se evaluaron las concentraciones de 0.125 a 1.5 mg/mL del medio de cultivo, con tres repeticiones. Los compuestos que se encuentran en mayor proporción también fueron evaluados en disolución con DMSO.

Se determinó la actividad fungistática en CSD y la actividad fungicida, se evaluó en la resiembra sobre agar Czapek.

3.7.8 Fraccionamiento del aceite esencial de *C. mexicana*

Se realizó por cromatografía en columnas con sílice gel 60 (0.063 – 0.200) como adsorbente, y como fase móvil se utilizó el hexano con proporciones crecientes de acetato de etilo y lavando las columnas con metanol. De cada columna se obtuvieron 13 fracciones de volúmenes aproximados de 100 mL cada una, de acuerdo con el desarrollo de las columnas. Todas las fracciones se concentraron con evaporador rotatorio a presión reducida para eliminar los disolventes.

3.7.8.1 Actividad antifúngica de las fracciones del aceite esencial de *C. mexicana*. El estudio de la actividad antifúngica se realizó por el método de difusión en agar con la técnica de pozo, para cada una de las fracciones obtenidas. Las fracciones con actividad antifúngica se analizaron por cromatografía de gases, con el método seleccionado, para detectar las similitudes en su composición química.

3.8 *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

El extracto hexánico de 3.0 kg del polvo foliar de *D. bicolor* se obtuvo por maceración y el disolvente se eliminó por destilación a presión reducida en un rotavapor a 25 °C.

3.8.1 Separación cromatográfica del extracto hexánico de *D. bicolor*

El extracto hexánico de *D. bicolor* se separó por cromatografía en columnas empacadas con sílice gel 60 (0.063 – 0.200), como fase móvil se utilizó hexano, con proporciones crecientes de acetato de etilo. De cada columna se obtuvieron 12 fracciones de volúmenes aproximados de 150 mL cada una, de acuerdo con su propio desarrollo. Todas las fracciones se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida a 25 °C.

Estas fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina en cromatoplasas Merk F₂₅₄ de sílice gel, y como fase móvil se utilizó hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo. A todas las fracciones se les realizó el estudio de actividad antifúngica.

De la fracción activa se obtuvo un sólido, el cual se filtró y purificó por cromatografía en columnas con sílice gel 60 (0.063 – 0.200) como adsorbente, y como fase móvil se utilizó el hexano, con proporciones crecientes de acetato de etilo. De cada columna se obtuvieron seis fracciones de volúmenes aproximados de 150 mL cada una. Todas las fracciones se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida a 25 °C.

Posteriormente estas fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina. Para ello se utilizaron placas de sílice gel y como fase móvil al hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo. A todas las fracciones se les realizó el estudio de actividad antifúngica.

El sólido obtenido de la fracción activa, se purificó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, en un cromatógrafo de líquidos Varian Pro Star equipado con una columna fase normal Econosphere Silica 5.0 μm , de 4.0 por 250 mm, y un detector Alltech ELSD 2000. Como fase móvil se utilizó el sistema hexano/acetato de etilo a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min; se evaluaron diversas proporciones de fase móvil y tiempos de desarrollo del método, hasta establecer la proporción final con la mejor resolución: hexano/acetato de etilo 80/20 y tiempo de desarrollo cromatográfico de 40 min.

Se determinaron los tiempos de retención de los dos compuestos que se encuentran en mayor proporción, los cuales fueron de 5:17 min y 11:13 min.

Una vez determinado el método de separación, el procedimiento se escaló a cromatografía semipreparativa, lo cual se realizó con una columna semipreparativa Econosphere Sílice 5 μm , de 22 por 250 mm, con la misma fase móvil

(hexano/acetato de etilo 80/20), velocidad de flujo correspondiente a 5.0 mL/min, y tiempo de desarrollo cromatográfico de 60 min. La muestra se disolvió en cloroformo y las fracciones se recolectaron a intervalos de 1 min durante todo el fraccionamiento, hasta un total de 60. Este procedimiento se repitió 10 veces hasta concluir con toda la muestra.

Se obtuvieron cristales blancos y se determinó su punto de fusión en un aparato Fisher Johns. Después se determinó su pureza en el cromatógrafo de gases Varian CP-3800 equipado con una columna capilar CP-Sil-5CB-MS FS de 30 m, espesor de película de 0.25 μm y diámetro interno de 0.25 mm, y un detector de ionización de flama (FID). Se usó nitrógeno como gas acarreador con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. La muestra se preparó en disolución con cloroformo grado reactivo.

Especificaciones iniciales del cromatógrafo de gases Varian CP - 3800.

Horno	270 °C
Flujo de columna	1.0 mL/min
Presión de columna (psi)	10.0
Horno de columna	50 °C
Horno FID	280 °C
Señal FID (mV)	0.067

Se evaluaron cuatro métodos diferentes, los cuales variaron en cuanto a temperatura de trabajo, tiempo de desarrollo del método, incremento de la

temperatura y utilización de rampas de temperatura sostenida a determinados intervalos de tiempo. El método elegido se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Método de análisis en el cromatógrafo de gases Varian CP – 3800, del compuesto purificado de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

Etapa	Temperatura ° C	Velocidad ° C/min	Duración (min)	Tiempo total (min)
Inicial	50	-	0.0	0.00
1	180	10.0	0.0	13.00
2	250	8.0	15.0	36.75

3.8.2 Determinación de la estructura del compuesto aislado de *D. bicolor*

La estructura del compuesto se determinó por espectrometría de masas, de ¹H RMN y ¹³C RMN, así como por espectrofotometría de IR y de UV-vis.

Los espectros de RMN fueron obtenidos en el espectrómetro Varian Mercury de 400 MHz. El espectro de IR fue obtenido en una tableta de KBr en el espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer Paragon 1000.

El espectro en UV se obtuvo en el espectrofotómetro Beckman DU 650 (800 a 200 nm), y el análisis de GC/MS se realizó en el cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Serie II, acoplado a un espectrómetro de masas marca Jeol modelo SX-102 A, con doble sector de geometría inversa.

El análisis de la disolución en cloroformo grado reactivo del compuesto purificado, se desarrolló en el cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Serie II, equipado con una columna capilar HP-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y espesor de película de 25 micras, acoplado a un espectrómetro

de masas marca Jeol modelo SX-102 A. El gas acarreador fue helio con un flujo de 1.0 mL/min, el tipo de inyección fue Split 1:30, el volumen inyectado de 1.0 μ L y la temperatura del inyector de 300 °C, a 70 eV. La temperatura de la cámara de ionización de 300 °C. La resolución fue de 1000.

El análisis elemental fue realizado en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la UNAM, en un analizador elemental FISIONS modelo EA1108.

El análisis de difracción de rayos X para la determinación de la estructura se realizó en el Instituto de Química de la UNAM.

3.8.3 Determinación de la actividad fungistática o fungicida y de la CMF del compuesto aislado de *D. bicolor*

Se preparó una disolución del compuesto en DMSO y se evaluó su acción fungicida o fungistática, así como su CMF. Estos atributos se evaluaron a través del grado de inhibición del desarrollo de *A. flavus* en CSD y se confirmaron mediante resiembra en agar Czapek.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio exploratorio de la actividad antifúngica de extractos crudos de rutáceas y asteráceas

El rendimiento de los 52 extractos obtenidos con las hojas secas de las cuatro plantas seleccionadas, por los tres métodos extractivos (percolación en serie, calentamiento en serie y maceración) se muestra en la Tabla 8. En la Tabla 9 se observa que los extractos de *C. pringlei*, *D. bicolor*, *C. mexicana* y *H. longipes* mostraron clara actividad antifúngica y por ello se seleccionaron para continuar con su estudio en este trabajo.

También se observó que los extractos hexánicos son los más activos; sin embargo, su actividad antifúngica disminuyó cuando la extracción se llevó a cabo por calentamiento, como sucedió con el extracto de *D. bicolor*, pero fue más evidente con el de *H. longipes*, el cual perdió casi por completo su actividad. Cabe resaltar que los extractos hexánicos activos presentaron una acción antifúngica superior a la del Daconil, ya que inhibieron totalmente el desarrollo del hongo.

Con base en los resultados obtenidos se seleccionó el hexano como disolvente único, pero para *C. pringlei* y *C. mexicana* se eligió el método de percolación y para *D. bicolor* y *H. longipes* se escogió el método de maceración.

Tabla 8. Rendimiento de la extracción (%) del follaje seco, con diferentes métodos y disolventes.

Método extractivo	Disolvente	<i>Casimiroa pringlei</i> (S. Watson) Engl.	<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk	<i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray	<i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) Blake
Percolación en serie	Hexano	4.1	9.5	4.5	2.0
	Cloroformo	2.5	12.5	4.25	2.75
	Etanol	6.6	6.9	5.0	3.0
Calentamiento en serie	Hexano	3.0	4.5	4.0	2.25
	Cloroformo	3.75	9.5	4.0	3.0
	Etanol	6.0	5.5	6.0	3.0
Maceración independiente	Agua	20.25	11.0	14.0	10.75
	Hexano	4.0	4.0	2.75	2.0
	Cloroformo	3.0	15.0	6.0	4.0
	Diclorometano	1.3	6.0	4.0	0.6
	Acetato de etilo	0.75	7.5	1.5	0.5
	Etanol	11.3	7.5	9.5	1.5
Metanol	14.25	14.0	8.5	2.0	

Tabla 9. Actividad antifúngica de 25 µg de los diferentes extractos sobre *Aspergillus flavus* Link

Método de extracción	Disolvente	<i>C. pringlei</i>	<i>D. bicolor</i>	<i>C. mexicana</i>	<i>H. longipes</i>
Percolación	Hexano	SD	16.6 ± 0.61	SD	11.0 ± 0.40
	Cloroformo	12.6 ± 0.22	10.4 ± 0.22	NI	NI
Calentamiento	Etanol	NI	NI	NI	NI
	Hexano	10.4 ± 0.22	14.6 ± 0.22	17.6 ± 0.67	NI
Maceración	Hexano	SD	SD	SD	SD
	Cloroformo	17.8 ± 0.22	11.6 ± 0.22	SD	NI
	Etanol	15.2 ± 0.18	11.8 ± 0.18	18.8 ± 0.19	NI
	Metanol	16.6 ± 0.22	14.8 ± 0.44	16.6 ± 0.22	NI
	Daconil 5.0 µg	25.4 ± 0.22			

Resultados de las medias de cinco determinaciones ± error estándar, expresadas como diámetro de la zona de inhibición en mm.

NI = No inhibición. SD = Sin desarrollo.

4.2 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) de los extractos hexánicos seleccionados

Después de verificarse la actividad fungistática de los cuatro extractos hexánicos con la ausencia de desarrollo de *A. flavus* Link en los cultivos líquidos (CSD), se estableció la concentración mínima inhibitoria o fungistática (CMI). A la vez, luego de resembrar los cultivos líquidos y observar la ausencia de desarrollo en la superficie del agar Czapek se procedió a definir la CMF (Tabla 10). Las diferencias encontradas entre las cuatro especies fueron notables, particularmente entre la biocida menos potente (*C. pringlei*) y *D. bicolor* que la superó casi cinco veces y ambas son rutáceas.

Tabla 10. Concentración mínima fungistática (CMI) y fungicida (CMF) ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos hexánicos de las cuatro especies seleccionadas.

Planta	CMI	CMF
<i>Casimiroa pringlei</i>	56.25	59.37
<i>Decatropis bicolor</i>	12.50	12.50
<i>Chrysactinia mexicana</i>	18.75	21.87
<i>Heliopsis longipes</i>	12.50	15.62

4.3 Estudio fitoquímico preliminar

Los resultados del estudio fitoquímico preliminar (reacciones de coloración y precipitación) de los extractos hexánicos obtenidos por maceración, y su comprobación con cromatografía en capa fina se resumen en la Tabla 11. En las cuatro especies sólo se registraron los esteroides. Del resto de metabolitos evaluados se encontró: terpenos en *C. mexicana* y *H. longipes*, cumarinas en *C. pringlei* y *D. bicolor*, y catequinas en *C. pringlei* y *C. mexicana*.

Tabla 11. Estudio fitoquímico preliminar de las maceraciones hexánicas de rutáceas y asteráceas.

Grupos químicos	Pruebas	<i>Casimiroa pringlei</i>	<i>Decatropis bicolor</i>	<i>Chrysactinia mexicana</i>	<i>Heliopsis longipes</i>
Esteroles	Lieberman-Burchard	+	+	+	+
	Salkoski	+	+	+	+
	CCF silica 60G				
	CHCl ₃ /etanol 9/1				
	Anizaldehído-H ₂ SO ₄	+	+	+	+
Terpenos	CCF silica 60G				
	Hexano/ac. de etilo 6/4				
	Vainillina- H ₂ SO ₄	-	-	+	+
Flavonoides	KOH	-	-	-	-
	NaOH	-	-	-	-
	FeCl ₃	-	-	-	-
	Shinoda	-	-	-	-
	Constantinescu	-	-	-	-
Sesqui-terpenlactonas	Reacción de hidroximato férrico	-	-	-	-
Cumarinas	CCF silica 60G				
	Hexano/ac. de etilo 6/4				
	Vapores de amoníaco	+	+	-	-
Taninos	FeCl ₃	-	-	-	-
	Precipitación de gelatina	-	-	-	-
	Stiasny	-	-	-	-
Catequina	Ensayo de lignina	+	-	+	-
Antraquinonas	NH ₄ OH	-	-	-	-
	Börntrager	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	+	-	+	-
	Hager	-	-	-	-
	Meyer	+	-	+	-
	Wagner	-	-	-	-
	Sonnenchein	+	-	-	-
	CCF silica 60G				
	CHCl ₃ /acetona/dietilamina 5/4/1				
	Dragendorff	-	-	-	-
	Yodo	-	-	-	-
	CCF silica 60G				
	Hexano/ac de etilo 6/4				
	Dragendorff	-	-	-	-
Yodo	-	-	-	-	

4.4 *Casimiroa pringlei* (S. Watson) Engl.

4.4.1 Separación cromatográfica del extracto hexánico de *C. pringlei*

El extracto hexánico obtenido por percolación fue sometido a una separación por cromatografía en columna para separar los compuestos y evaluar su actividad antifúngica. En el primer fraccionamiento se obtuvieron 10 fracciones, las cuales fueron obtenidas aumentando la polaridad.

A estas diez fracciones se les evaluó su actividad antifúngica. Las fracciones 1, 2, 3 y 10 carecieron de dicha actividad, las fracciones 4 a 8 fueron las más activas y la fracción 9 sólo presentó actividad escasa. Las fracciones con actividad antifúngica, se reunieron y se procedió a un segundo fraccionamiento, con excepción de la fracción 4 pues presentó diferencias cromatográficas en relación con las fracciones 5 a 8.

En la separación por cromatografía en columna de la mezcla de las fracciones activas 5 a 8, se obtuvieron seis fracciones de 150 mL. A las cuales se les evaluó su actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus*, y se encontró que las fracciones 1 a 3 eran muy activas, las fracciones 4 y 5 no presentaron actividad y la fracción 6 presentó una inhibición moderada.

4.4.2 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) de la mezcla de fracciones activas del segundo fraccionamiento

En la evaluación de las fracciones 1 a 3 se encontró una CMI y CMF de 15.6 µg/mL. Cabe hacer notar que el extracto hexánico crudo presentó una CMF de 59.3 µg/mL (Tabla 10), de manera que la separación cromatográfica elevó la potencia biocida del extracto en casi cuatro veces.

4.4.3 Separación en HPLC de las fracciones activas del segundo fraccionamiento

La separación de las fracciones activas (1 a 3) del segundo refraccionamiento se realizó por medio de cromatografía de líquidos de alta presión. Después, las 50 fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina para establecer sus similitudes cromatográficas. Las fracciones similares se reunieron y se procedió a su evaluación de actividad antifúngica. Sólo se encontró actividad antifúngica sobresaliente en la mezcla de las fracciones 24 a 28.

4.4.4 Separación de la fracción activa de *C. pringlei* por cromatografía de capa preparativa

La mezcla de las fracciones activas (24 a 28), se sometieron a una separación cromatográfica con el sistema hexano/acetato de etilo 75/25. Se obtuvieron cuatro zonas de separación, tres bandas definidas en la parte superior y una mezcla en la parte inferior. Se evaluó la actividad antifúngica de estas fracciones y se encontró que después de este procedimiento ya no se manifiesta la actividad antifúngica.

4.5 *Chrysactinia mexicana* A. Gray

A partir de 1.6 kg de las hojas frescas de *C. mexicana*, se obtuvieron 15 mL de aceite esencial (porcentaje de rendimiento de 0.94 % v/p), de color amarillo y de olor característico, con un índice de refracción $\eta_D^{20^*} = 1.4790$, y una densidad $\rho^{20^*} = 0.9290$ g/cm³.

4.5.1 Actividad antifúngica del aceite esencial de *C. mexicana*

El aceite esencial de *C. mexicana* presentó actividad antifúngica. Los diámetros de las zonas de inhibición del desarrollo de *A. flavus* fueron de 17.8 ± 0.017 y de 25.2 ± 0.022 mm, con 1.25 y 2.5 mg de aceite disueltos en DMSO, respectivamente. Con 5.0, 10.0 y 20.0 mg, el aceite esencial inhibió totalmente el desarrollo de *A. flavus* en todos los cultivos.

En este estudio preliminar se comprobó que el aceite esencial de *C. mexicana* es un potente antifúngico sobre *Aspergillus flavus* Link, por lo cual se realizó la identificación de los principales compuestos que lo constituyen y su actividad antifúngica respectiva.

4.5.2 Identificación de los componentes del aceite esencial de *C. mexicana*

La identificación de los componentes del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* se llevó a cabo por cromatografía de gases. Se logró la separación de 32 constituyentes, así como el establecimiento de su tiempo de retención y el porcentaje que cada uno de ellos representa. En el cromatograma (Figura 6) se observa la presencia de tres componentes mayoritarios que representan el 88.12 % del contenido del aceite esencial, con los siguientes tiempos de retención: 28.263 min, 72.569 min y 77.170 min, los cuales se identificaron por comparación con estándares.

El compuesto con tiempo de retención de 28.263 min fue identificado como eucaliptol el cual ya se había aislado de esta planta del extracto de éter de petróleo

(Domínguez y Pierantozzi, 1972) y representa el 41.30 %. El compuesto con tiempo de retención de 72.569 min corresponde a acetato de linalilo y representa el 9.08 % y el tercer compuesto resultó ser piperitona, con tiempo de retención de 77.170 min, y constituyó el 37.74 % de este aceite esencial.

Para comprobar la composición de dicho aceite esencial de *C. mexicana* se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

La identidad de los compuestos del aceite esencial de *C. mexicana* se corroboró por comparación de sus espectros de masas con los de compuestos comerciales y con los de la base NIST/NBS (Figura 7).

Se identificaron diecisiete compuestos del aceite esencial (Tabla 12), los tres dominantes, como ya se mencionó anteriormente, fueron eucaliptol (41.3 %), piperitona (37.74 %) y acetato de linalilo (9.08 %), además de: 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (1.4 %), α -mirceno (1.2 %), α -tujona (1.2 %) y otros compuestos que fueron detectados por GC-MS en cantidades menores al 1.0 %.

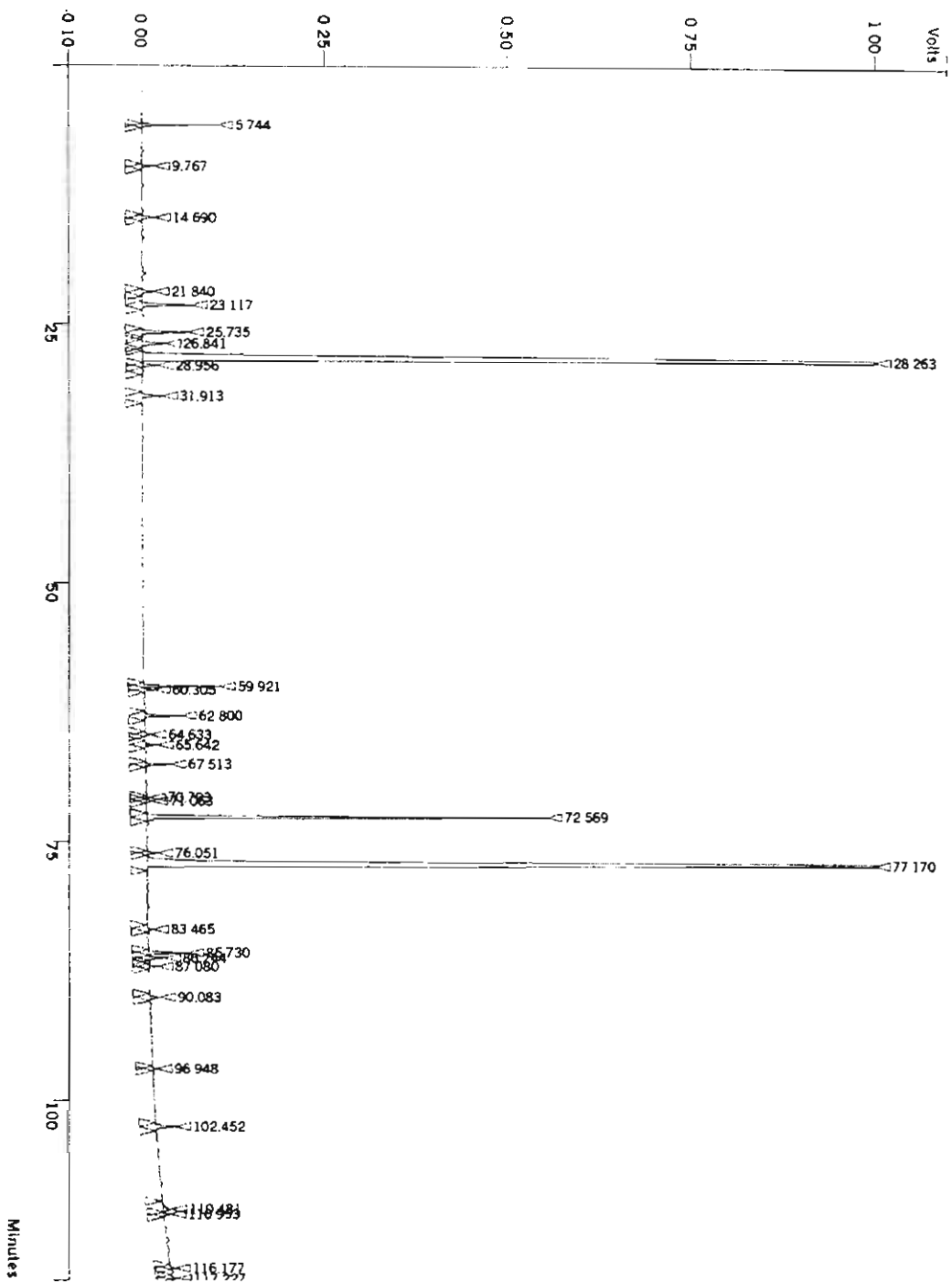
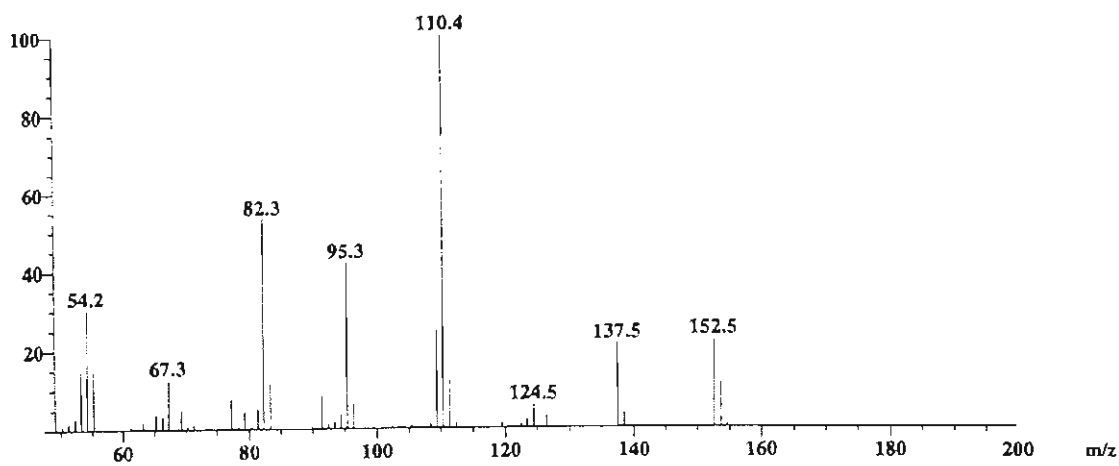
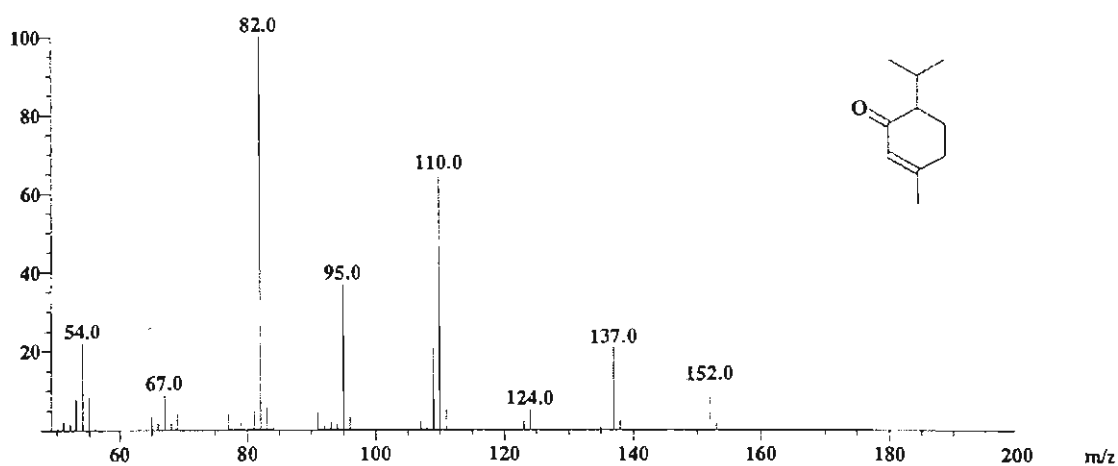


Figura 6. Cromatograma del aceite esencial de *C. mexicana*.

INSTITUTO MEXICANO DE INVESTIGACIONES Y SERVICIOS DE INFORMACION



(a)



(b)

Figura 7. Espectro de masa de la piperitona presente en el aceite esencial de *C. mexicana* (a) y comparación con la base NIST (b).

Tabla 12. Composición química del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* A.

Gray

No.	Compuesto	Contenido (%)	Tiempo de retención (min)
1	α -felandreno	0.2506	11:57.8
2	α -mirceno	1.1970	13:06.5
3	α -tujona	1.1721	13:46
4	Acetato de 1-metil-4-(1-metil etenil) ciclohexanol	0.6341	15:22.2
5	Eucaliptol	41.3021	17:50.9
6	2-etil-6-metil bencenamina	0.4715	19:34.4
7	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	1.3873	43:02.1
8	<i>Trans</i> -limoneno	0.6893	46:10.8
9	4-metil-1-(1-metil etil)-3-ciclohexen-1-ol	0.1009	49:55
10	<i>Cis</i> -limoneno	0.4408	52:57.5
11	Éster S-(tetrahydro-2H-piran-3-il) etanetiónico	0.0427	57:05
12	Acetato de linalilo	9.0763	59:22.8
13	Piperitona	37.7439	62:06
14	Acetato de exo-2- hidroxicineol	0.1063	63:43
15	Exo-2-hidroxicineol	0.8686	67:14
16	Fenol	0.0621	71:59
17	Éster 3-fenil-2-propenil etílico	0.2933	75:37

4.5.3 Determinación de la actividad fungistática o fungicida y de la CMF del aceite esencial de *C. mexicana* y de sus tres componentes mayoritarios

Los resultados de la actividad fungistática o fungicida del eucaliptol, la piperitona y el acetato de linalilo comerciales en concentraciones de 0.1 a 0.6 mg/mL se muestran en la Tabla 13. Se encontró que el eucaliptol y el acetato de linalilo carecen de actividad antifúngica contra *A. flavus*; a pesar de que estos dos compuestos no son los responsables de la actividad registrada para el aceite esencial se ha encontrado que el eucaliptol esta presente en cantidades importantes en aceites esenciales de otras plantas con actividad antibacteriana (Martins y col., 2001; Faleiro y col., 2003; Unlu y col., 2002; El Shazly y col., 2002b; Vila y col., 1999; Pattnaik y col., 1997; Candan y col., 2003). En estos trabajos no se muestra una correlación entre la cantidad de sus compuestos mayoritarios y la actividad antibacteriana (Cimanga y col., 2002).

Algunos estudios reportan que es inferior la actividad antifúngica de los aceites esenciales que contienen eucaliptol (Sokovic y col., 2002; Carson y Riley, 1995), aun contra dermatofitos humanos (Lima y col., 1993; Hammerschmidt y col., 1993), y otras especies de *Aspergillus* (Kalemba y col., 2002; Hammer y col., 2002). El eucaliptol también presenta actividad insecticida sobre el vector de la fiebre del dengue (*Aedes aegypti*) y la mosca de la fruta (*Bermisia argentifolii*) (Araujo y col., 2003), es acaricida (Macchioni y col., 2002), también tiene actividad sobre hongos fitopatógenos (Pitarokili y col., 2003) y no presenta efecto mutagénico (Gomes-Carneiro y col., 1998).

Tabla 13. Efecto de la concentración (mg/mL) en la actividad antifúngica del eucaliptol, acetato de linalilo y piperitona comerciales sobre *Aspergillus flavus* Link

Compuesto	Concentración					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Eucaliptol	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Acetato de linalilo	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Piperitona	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-

+/+ = desarrollo en CSD/ desarrollo en agar Czapek

CMF -/+ = sin desarrollo en CSD/ desarrollo en agar Czapek

CMF -/- = sin desarrollo en CSD/ sin desarrollo en agar Czapek

Pitarokili y col. (2002), encontraron que el acetato de linalilo presentó acción inhibitoria sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, con una EC₅₀ (concentración que causa el 50 % de inhibición del desarrollo micelial frente al control) de 569.62 µL/L. Sin embargo, con otros hongos fitopatógenos la EC₅₀ evaluada excedió a 1,500 µL/L. En cambio, con una concentración similar a la registrada en este trabajo (0.6 mg/mL), este compuesto careció de efecto sobre *A. flavus*.

En cambio la piperitona inhibe el crecimiento de este hongo y su CMF fue de 0.6 mg/mL. Este es el primer hallazgo conocido sobre la actividad fungicida de este compuesto y su eficacia sobre *A. flavus*. Por lo tanto, el uso de la piperitona o de polvos vegetales ricos en ella resultan interesantes para el estudio de la protección de granos y amerita futuras investigaciones con ensayos de campo.

La piperitona se ha registrado como constituyente de aceites esenciales de otras asteráceas como el *Senecio graveolens* Wedd. (2.1 %), el cual presentó actividad sobre cocos Gram positivo (Pérez y col., 1999), y de lamiáceas como *Mentha longifolia* (38.79 %), con importante actividad antibacteriana, sobre dermatofitos y sobre *Candida albicans* (Mímica-Dukic y col., 2003).

Por otro lado, la piperitona produce reacción electrofisiológica en hembras de *Helicoverpa armigera* (Bruce y Cork, 2001), redujo la sobrevivencia de dos especies de insectos (Ketoh y col., 2002) y presentó actividad antimicrobiana (Sokmen y col., 2003). La piperitona es usada como agente saborizante.

Por otra parte, la determinación de la CMI y CMF del aceite esencial, se llevó a cabo a concentraciones de 0.125 a 1.5 mg/mL de medio de cultivo, con los resultados que se muestran en el Tabla 14.

Tabla 14. Concentración mínima fungistática (CMI) y fungicida (CMF) del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* A Gray.

Medio	Concentración (mg/mL)						
	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5
CSD	+	+	+	+	-	-	-
Agar							
Czapek	+	+	+	+	+	-	-

+ = desarrollo en el cultivo
 - = sin desarrollo en el cultivo

4.5.4 Separación cromatográfica del aceite esencial de *C. mexicana*

En el fraccionamiento del aceite esencial de *C. mexicana* se obtuvieron 13 fracciones de aproximadamente 100 mL cada una, a las cuales se les evaluó su actividad antifúngica. Las fracciones 1 a 3 carecieron de actividad antifúngica, las fracciones 4, 12 y 13 mostraron menor actividad, pero las fracciones 5 a 11 presentaron una marcada actividad inhibitoria sobre *Aspergillus flavus*.

En cantidades de 20.0, 10.0 y 5.0 mg (Tabla 15), se encontró que con 5.0 mg se inhibe totalmente el desarrollo de *Aspergillus flavus* en todos los cultivos.

Tabla 15. Efecto de la concentración sobre la actividad antifúngica (diámetro del área de inhibición en cm) de las fracciones del aceite esencial de *C. mexicana* A. Gray.

Fracción	Dosis		
	20 mg	10 mg	5 mg
I	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
II	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
III	Sin actividad	Sin actividad	Sin actividad
IV	Total inhibición	Total inhibición	1.8
V	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
VI	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
VII	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
VIII	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
IX	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
X	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
XI	Total inhibición	Total inhibición	Total inhibición
XII	Total inhibición	Total inhibición	3.5
XIII	1.1	0.9	Sin actividad

4.5.4.1 Identificación por cromatografía de gases de las fracciones activas del aceite esencial de *C. mexicana*. Las fracciones con actividad antifúngica se analizaron por cromatografía de gases. Para ello se utilizó el mismo método descrito para el estudio del aceite esencial.

Se encontró que las siete fracciones activas muestran similitud en el contenido químico cualitativo de los tres compuestos mayoritarios, pero en diferentes proporciones, ya que al disminuir la proporción de piperitona en las últimas fracciones (12 y 13), también se reduce su actividad.

4.6 *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk.

4.6.1 Separación cromatográfica del extracto hexánico de *D. bicolor*

La separación de 100 g del extracto hexánico por cromatografía en columna, dio como resultado 12 fracciones de volúmenes aproximados de 150 mL cada una (Tabla 16). Al evaluar su actividad antifúngica, se encontró que las fracciones 1, 2, 3, 7 y 12 fueron inocuas, pero las fracciones 4, 5, 6, y 8 inhibieron el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Las fracciones 9 a 11 presentaron menor actividad.

Tabla 16. Desarrollo cromatográfico del primer fraccionamiento en columna del extracto hexánico de *Decatropis bicolor* y evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones resultantes.

Fracción	Fase móvil Hexano/acetato de etilo	Volumen mL	Actividad antifúngica
I	Hexano	150	Sin actividad
II	95/5	150	Sin actividad
III	90/10	150	Sin actividad
IV	85/15; 80/20	150	Muy activa
V	80/20	150	Muy activa
VI	75/25	150	Muy activa
VII	70/30	150	Sin actividad
VIII	65/35	150	Muy activa
IX	60/40	150	Activa
X	50/50	150	Poca actividad
XI	50/50	150	Poca actividad
XII	Metanol	150	Sin actividad

De las fracciones 4 y 5 con actividad sobre *Aspergillus flavus* se obtuvo un sólido blanco, el cual se purificó por cromatografía en columna (Tabla 17). De la fracción 3 se obtuvieron 1.8 g de un sólido blanco que se purificó por HPLC. A este compuesto por cromatografía de gases, se le encontró un tiempo de retención de 21.588 min, y su pureza fue de 99.9 %.

Tabla 17. Desarrollo cromatográfico del segundo fraccionamiento en columna del sólido precipitado de *Decatropis bicolor* y evaluación de su actividad antifúngica sobre *Aspergillus flavus* Link.

Fracción	Fase móvil Hexano/acetato de etilo	Volumen ML	Actividad antifúngica
I	90/10	150	Sin actividad
II	85/15	150	Muy activa
III	80/20	150	Muy activa
IV	80/20	150	Muy activa
V	75/25	150	Activa
VI	Acetato de etilo	150	Poco activa

4.6.2 Identificación del compuesto purificado del extracto hexánico de *D.*

bicolor

Del sólido blanco obtenido por HPLC de *Decatropis bicolor* (Zucc.) Radlk se obtuvieron 167.68 mg de un material cristalino con una pureza de 99.9 %, con punto de fusión de 110 a 112 °C.

Este sólido cristalino fue identificado como la cumarina Seselina (Figura 8) por UV-vis, IR, espectrometría de masas, ¹HRMN, ¹³CRMN, con los experimentos de DEPT, HETCOR y COSY; así como por difracción de rayos X.

Análisis elemental: C: 73.79 %, H: 5.36 % . Análisis calculado C₁₄H₁₂O₃. El EM muestra: *m/z* 228 (19%) (Figura 9).

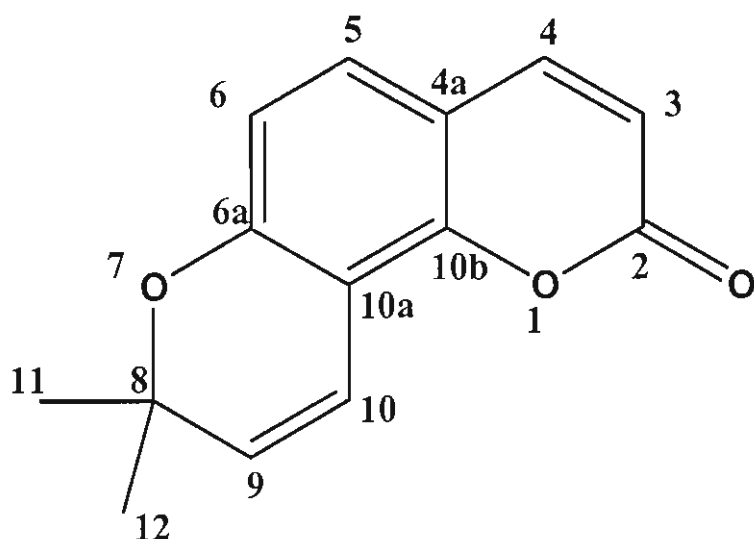


Figura 8. Estructura de la Seselina.

En UV-vis (CHCl_3) se obtuvieron tres máximos de absorción: el primero en la longitud de onda de 331.5 nm con una absorbancia de 0.4539; el segundo en 293.5 nm con una absorbancia de 0.420; y el tercero en 284.0 nm con una absorbancia de 0.3729 que es característico de un sistema de dobles enlaces conjugados (Figura 10).

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3049.31 (H-C=C), 2972.58 (C-H), 2928.04 (C-H), 1724.58 (C=O), 1592.54 (-C=C-), 1113.21 (C-O) (Figura 11).

El espectro de IR presentó una banda de intensidad baja a 3049.31 cm^{-1} debido al enlace C-H de carbonos Sp^2 ; a 2928.04 cm^{-1} una banda de intensidad baja que corresponde al enlace C-H de carbono Sp^3 ; a 1724.58 cm^{-1} una banda intensa que se atribuye al carbonilo de la lactona conjugada; a 1592.54 cm^{-1} una banda intensa debida al enlace de -C=C- y a 1113.21 cm^{-1} una banda que indica la presencia de un éter.

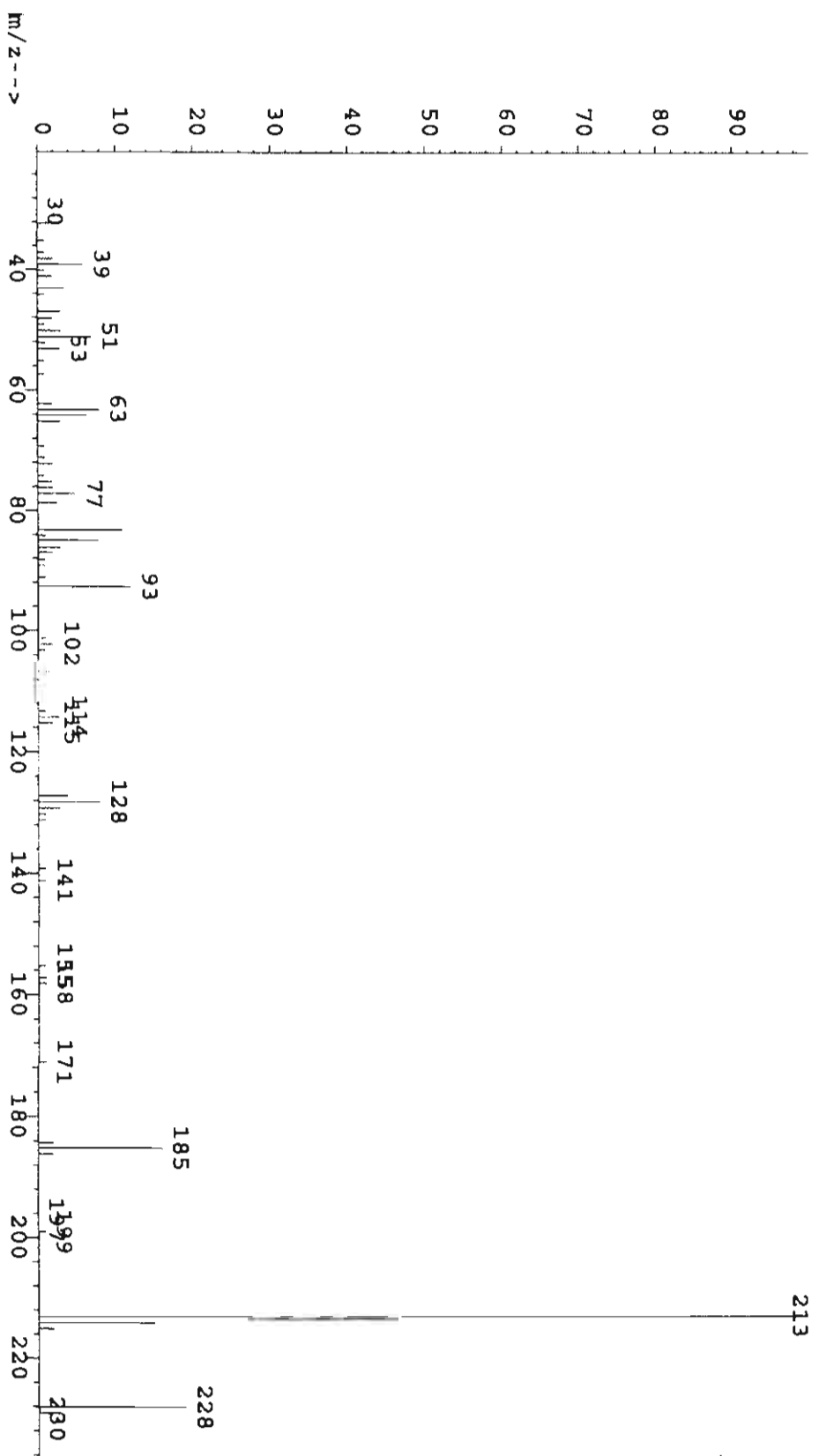


Figura 9. Espectro de masas de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

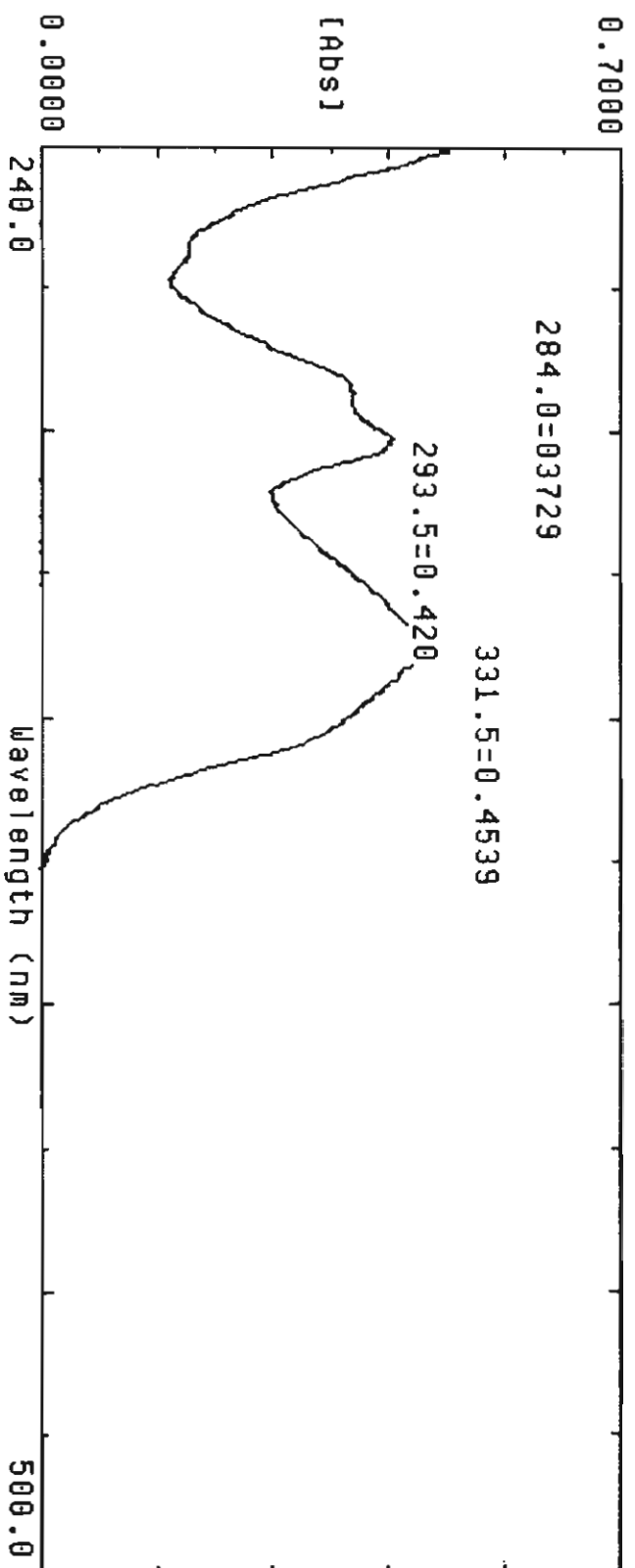


Figura 10. Espectro en UV-vis de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

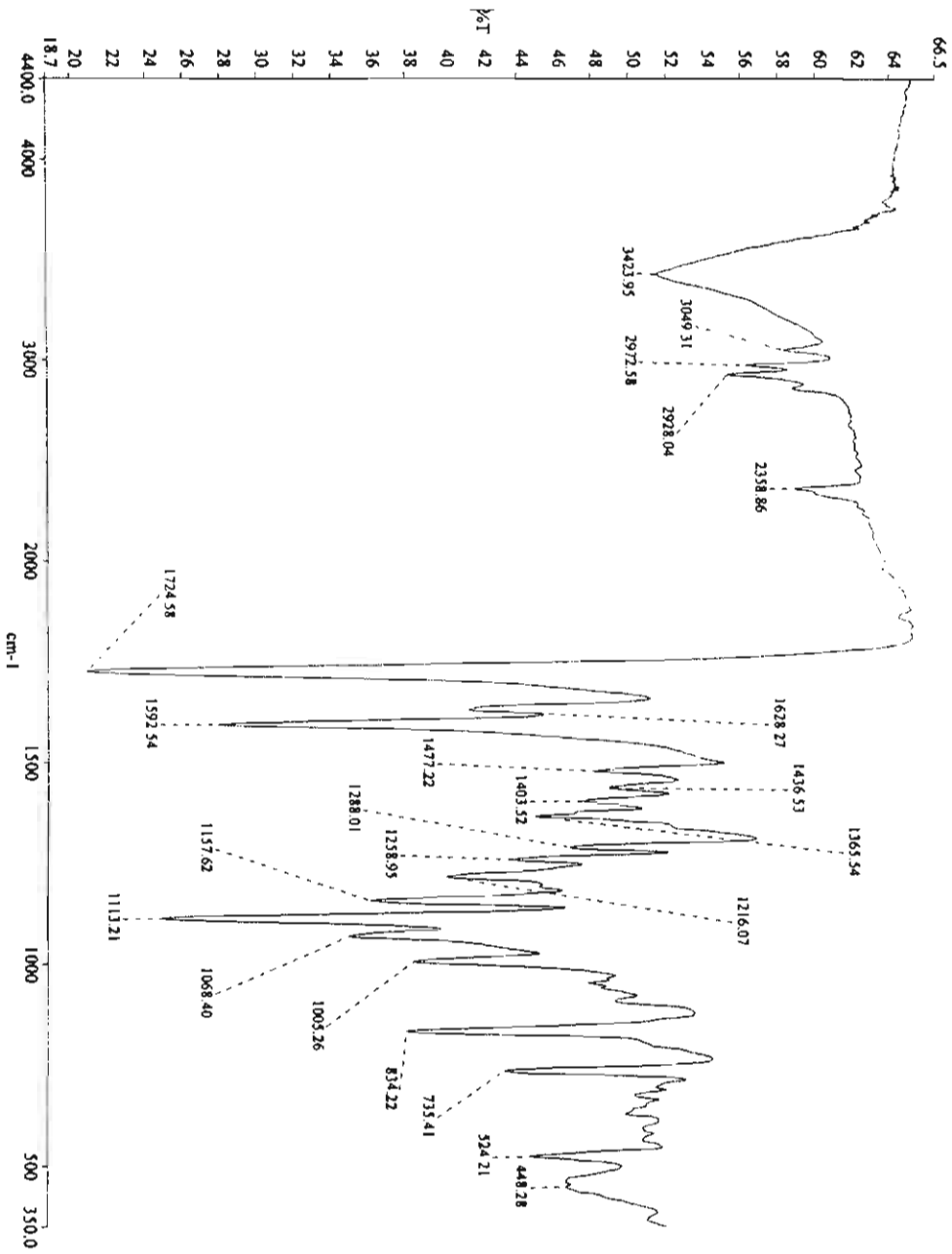


Figura 11. Espectro en IR de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

$^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.58 (*d*, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.19 (*d*, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.86 (*d*, $J = 10.0$ Hz, 1H), 6.7 (*d*, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.22 (*d*, $J = 9.2$ Hz, 1H), 5.75 (*d*, $J = 10.0$ Hz, 1H) y 1.47 (*s*, 6H) (Figura 12).

$^{13}\text{CRMN}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz) δ (ppm): 160.7, 155.91, 149.7, 143.61, 130.5, 127.5, 114.7, 113.3, 112.3, 77.42 y 28.04 (Figura 13).

El espectro de $^{13}\text{CRMN}$ presenta 11 señales y el experimento DEPT (Figura 14) presenta 7 señales para carbonos protonados lo que indica que 4 carbonos son cuaternarios, la señal de 28.04 corresponde a un carbono metilo (CH_3) por lo que se puede asignar a los carbonos de los metilos gem (11 y 12), en el experimento HSQC (Figura 15) se puede corroborar lo anterior por la correlación de la señal en 1.47 ppm de $^1\text{HRMN}$ con la señal 28.04 ppm: la señal de 77.42 ppm se asigna al carbono cuaternario (C-8) el cual difiere con lo reportado por Rahmani y col., (1996) y la señal 160.7 ppm es característica de un carbono cuaternario de carbonilos conjugados por lo que se asigna a C-2. Las demás señales se asignaron por los experimentos DEPT (Figura 14) y COSY (Figura 16) y en la Tabla 18 se resumen los datos espectroscópicos. Las señales de 155.91 ppm y 149.7 ppm corresponde a carbonos cuaternarios de acuerdo al experimento DEPT y pueden asignarse respectivamente a 6a y 10b, y 4a y 10a. La señal de 6a y 10b puede encontrarse desplazada a campo más bajo por el efecto de desprotección del oxígeno. La asignación se comprobó mediante el experimento HMBC (Tabla 19).

Adicionalmente se obtuvo el patrón de difracción de rayos X de un cristal único que corrobora la estructura propuesta (Figura 17).

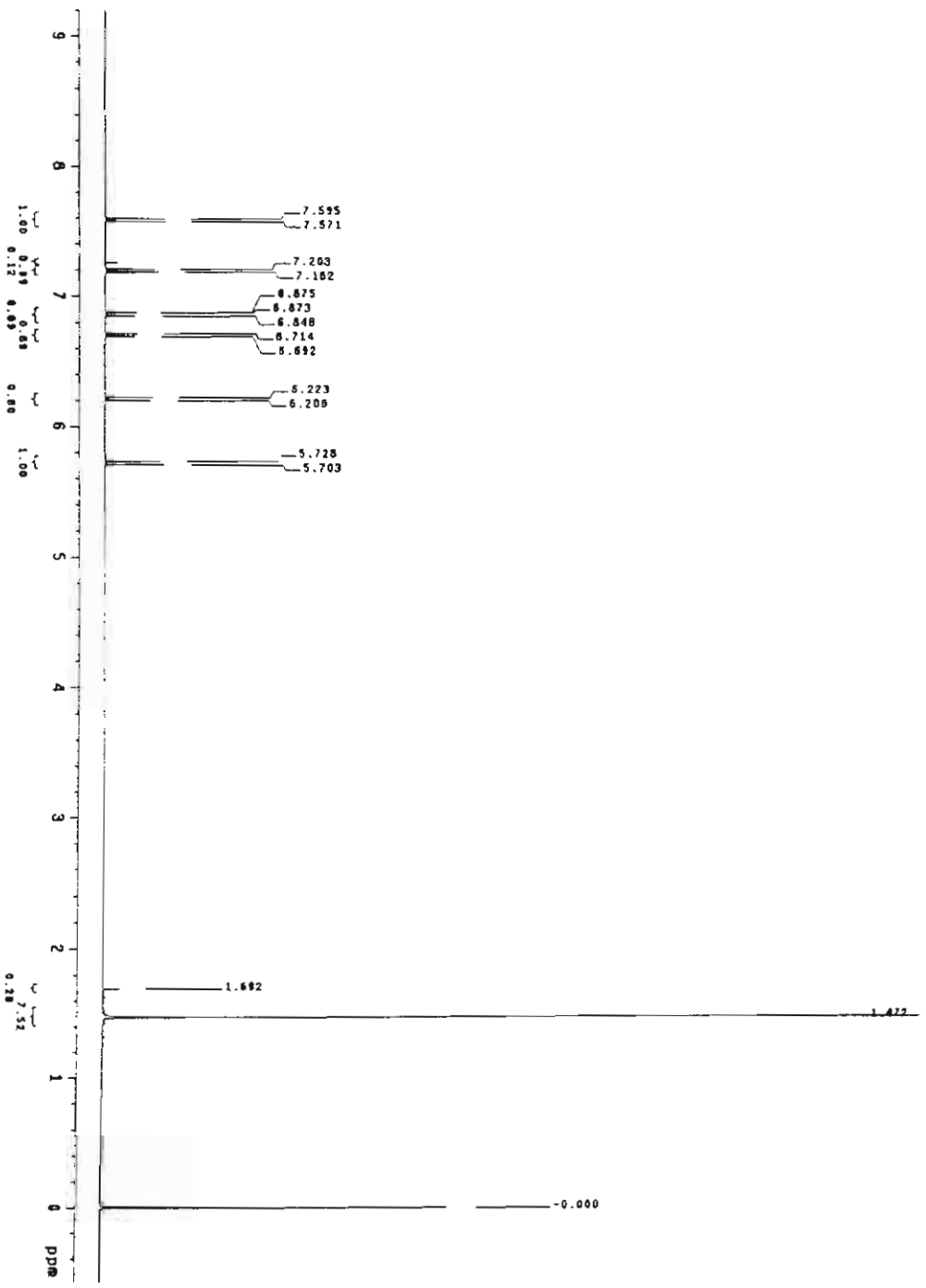


Figura 12. Espectro de ¹H RMN de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

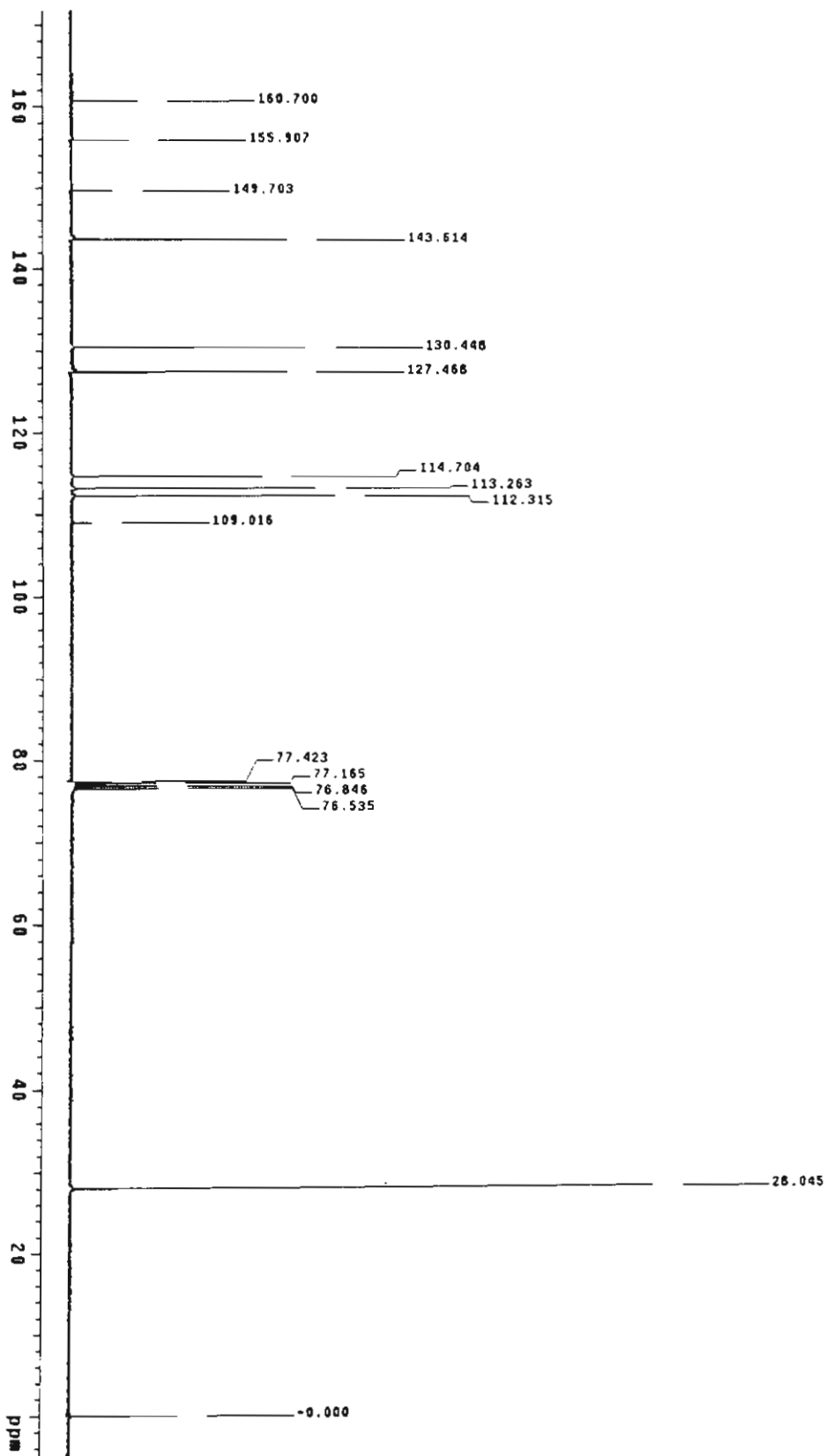


Figura 13. Espectro ^{13}C RMN de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

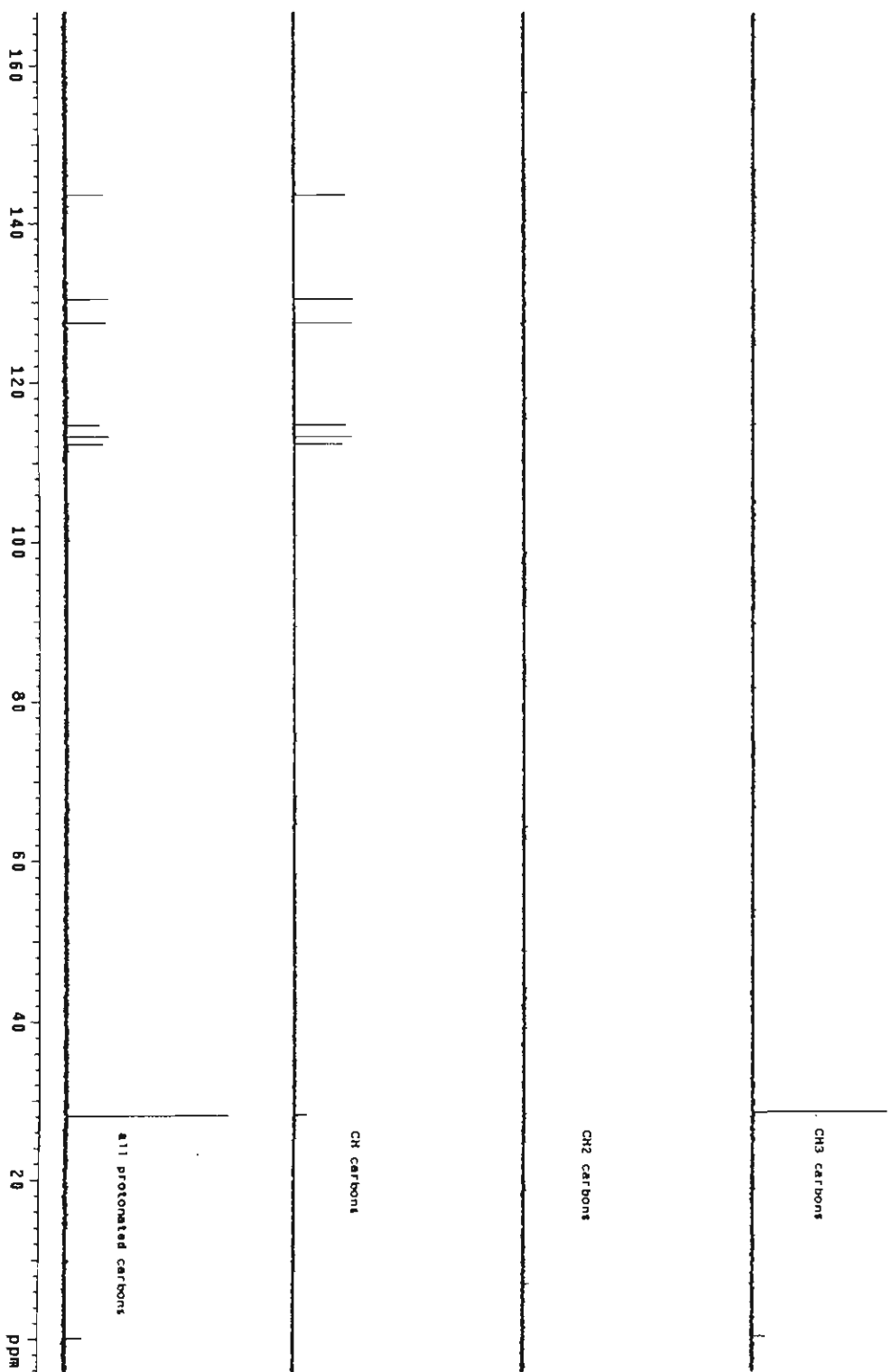


Figura 14. DEPT de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

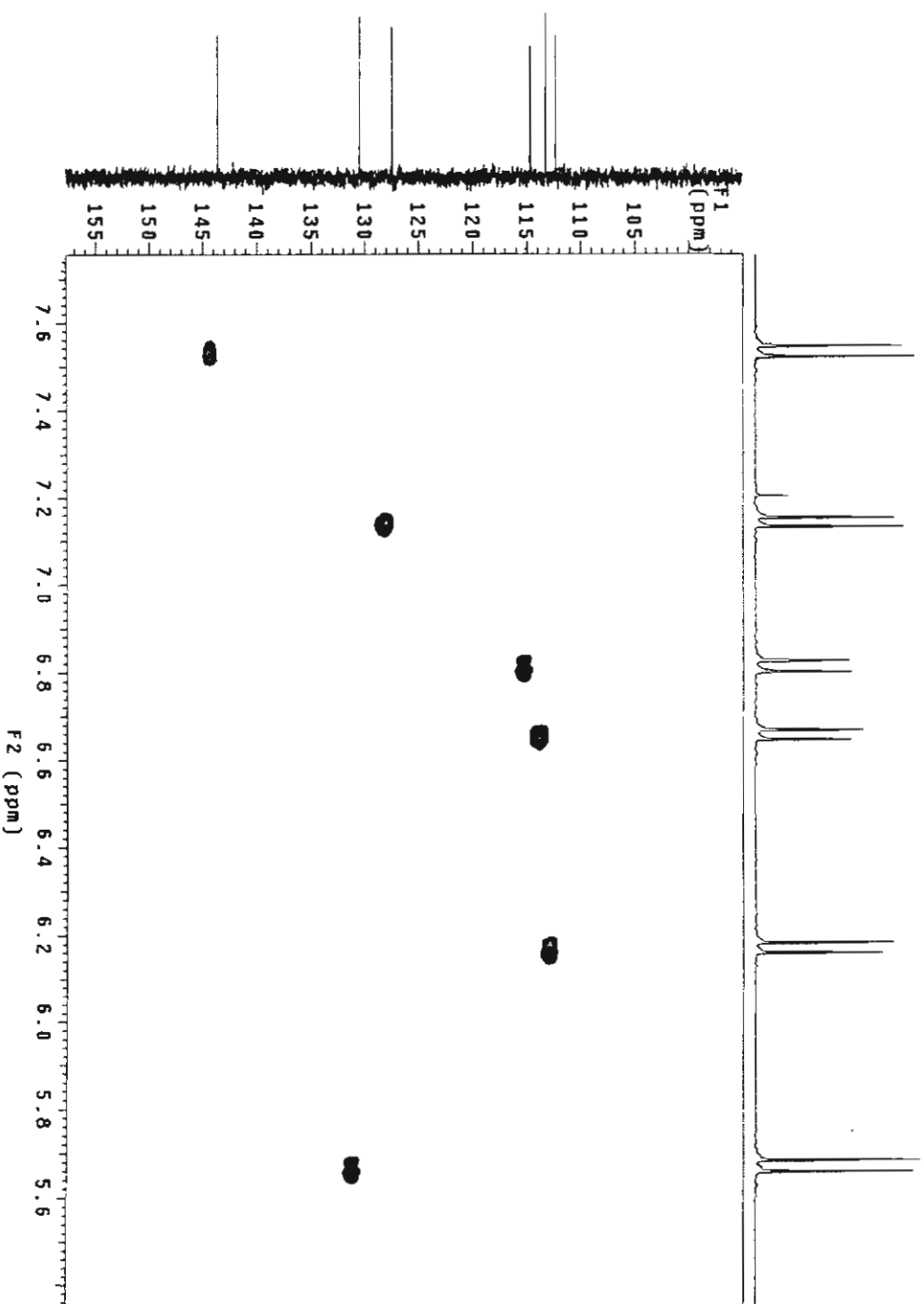


Figura 15. HSQC de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

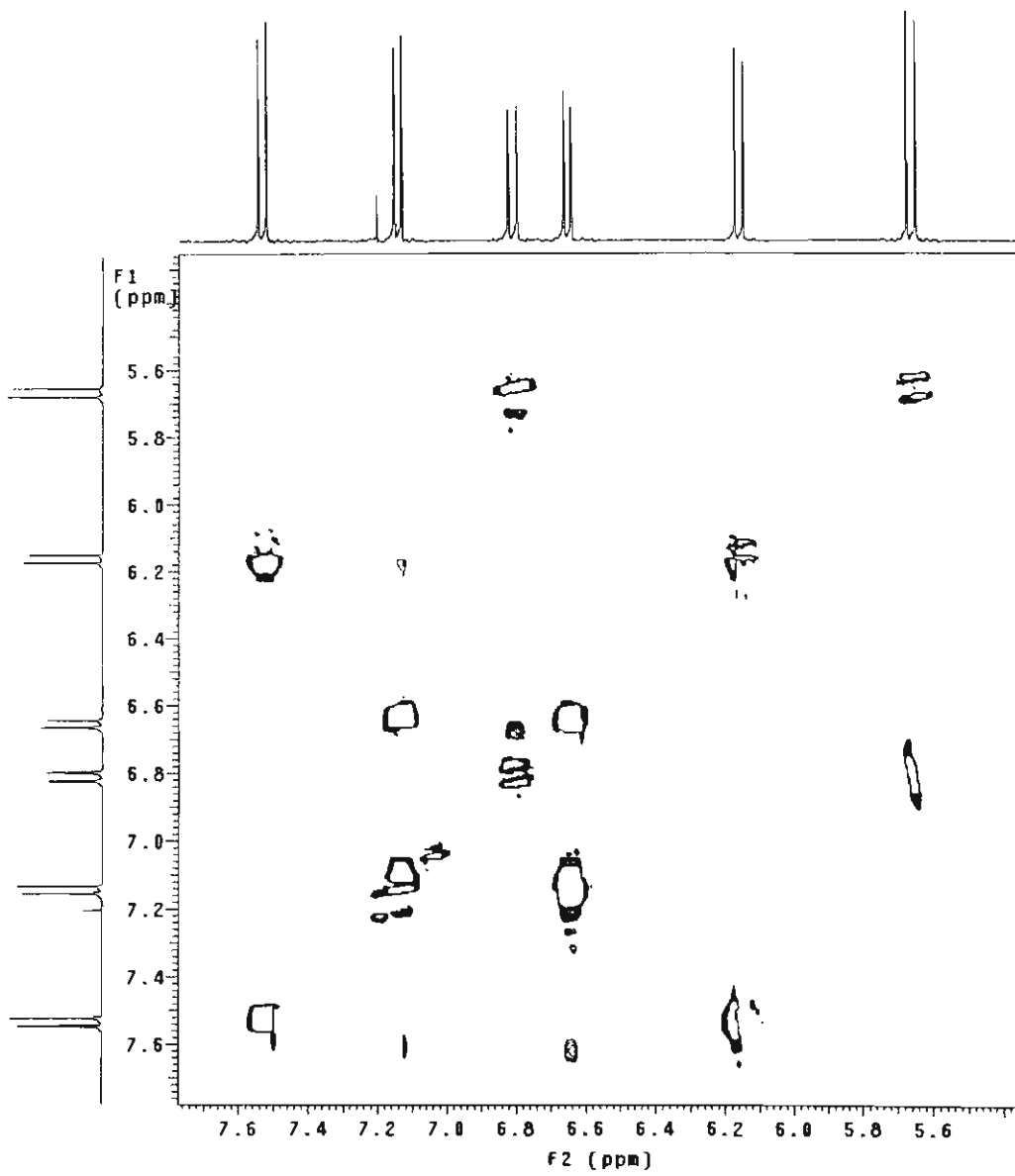


Figura 16. ^1H - ^{13}C COSY de la Seselina aislada de *D. bicolor*.

Tabla 18. Correlación ¹H RMN - ¹³C RMN.

¹ H RMN				¹³ C RMN			
δ ppm	Multiplicidad	J Hz	Asignación	COSY correlación δ, ppm	HSCQ correlación δ, ppm	DEPT	Asignación
1.47	s		H-11 y 12		28.04	Metilo	C-11 y 12
5.74	d	10	H-9	6.86	130.5	Metino	C-9
6.22	d	9.2	H-3	7.58	112.3	Metino	C-3
6.70	d	8.8	H-6	7.19	113.3	Metino	C-6
6.86	d	10	H-10	5.74	114.7	Metino	C-10
7.19	d	8.4	H-5	6.70	127.5	Metino	C-5
7.58	d	9.6	H-4	6.22	143.61	Metino	C-4

Tabla 19. Correlación del experimento HMBC.

No. de H	ppm	¹³ CRMN ppm
4	7.58	160.7, 149.7, 127.5, 112.3
5	7.19	155.91, 149.7, 113.3
10	6.86	155.91, 149.7, 113.3, 77.42, 28.04
6	6.70	155.91, 149.7
3	6.22	160.7
9	5.74	155.91, 114.7, 77.42, 28.04
11 y 12	1.47	130.5, 77.42, 28.04

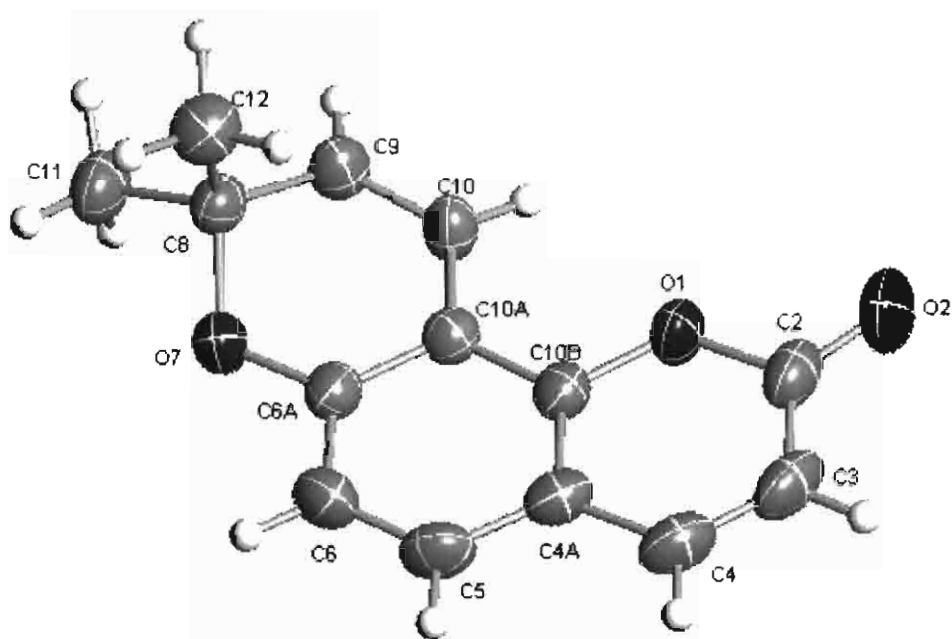


Figura 17. Estructura de la Seselina obtenida por los resultados de difracción de rayos .X.

4.6.3 Determinación de la actividad fungistática o fungicida y de la CMF

del compuestos aislado de *D. bicolor*

Para este propósito se utilizó una disolución de 2.5 mg/mL del compuesto en volúmenes de 10 a 200 μ L, con intervalos de 25 μ L por tubo (Tabla 19). La CMI resultó de 31.25 μ g/mL. En las resiembras de los cultivos líquidos en agar Czapek, las colonias presentaron un desarrollo micelial limitado y sin conidiación al término del tiempo de incubación: así, la actividad del compuesto es solamente fungistática. Todos los cultivos del control presentaron abundante desarrollo y conidiación de *A. flavus*.

Tabla 20. Concentración mínima fungistática (CMI) y fungicida (CMF) del compuesto obtenido de *Decatropis bicolor*.

Medio	Concentración (μ g/mL)								
	6.25	15.6	31.25	46.9	52.5	78.1	93.7	109.3	125
CSD	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Agar Czapek	++	+	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm

+ = desarrollo en el cultivo

- = sin desarrollo en el cultivo

\pm = una o dos colonias en el cultivo, sin conidiación

La cumarina Seselina fue aislada de las semillas de *Seseli indicum* y manifestó en ratas y ratones efecto antiinflamatorio, analgésico y anticonvulsionante, además de no mostrar toxicidad aún en dosis de 6 g/kg en ratones (Tandan y col., 1990). En *D. bicolor*, el compuesto se aisló de la parte aérea y se observó que su actividad antiinflamatoria es de poca relación dosis-respuesta (García-Argáez y col., 2000).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

1. Los extractos de *C. pringlei*, *C. mexicana*, *D. bicolor* y *H. longipes* poseen actividad fungistática y fungicida sobre *A. flavus* Link, la actividad depende de la polaridad del extracto y del método de extracción utilizado.
2. La mayor actividad antifúngica se encontró en los extractos hexánicos de las cuatro especies vegetales estudiadas. Las CMF son: 59.37 $\mu\text{g/mL}$ para *C. pringlei*; 12.50 $\mu\text{g/mL}$ para *D. bicolor*; 21.87 $\mu\text{g/mL}$ para *C. mexicana*; y 15.62 $\mu\text{g/mL}$ para *H. longipes*.
3. La CMF del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *A. flavus* es de 1.25 mg/mL, y la del componente activo piperitona, de 0.6 mg/mL.
4. La cumarina Seselina aislada de *D. bicolor* presentó una CMI de 31.25 $\mu\text{g/mL}$, pero su actividad es sólo fungistática sobre *A. flavus*.
5. Se reasignaron las señales de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de la Seselina. Se someterá dicha corrección como una nota en el foro de publicación apropiado.
6. El extracto hexánico de las hojas de *H. longipes* posee actividad fungicida, por lo que se recomienda continuar con el estudio de esta especie vegetal, de la cual sólo se conocen los efectos biocidas de su raíz.
7. Después de utilizar diferentes métodos de purificación, el extracto hexánico de *C. pringlei* no manifiesta la actividad antifúngica.

8. Los nuevos datos experimentales descritos, constituyen una base adecuada para avanzar en el estudio de los efectos antifúngicos, a partir de los extractos activos y los compuestos identificados en este trabajo, con el enfoque de protección a productos agrícolas de importancia alimenticia.

5. BIBLIOGRAFIA

Acree F., Jacobson M. Haller H. L. 1945. An amide possessing insecticidal properties from the roots of *Erigeron affinis* DC. Journal of Organic Chemistry. 10: 236-242.

Aguilar, A., J. Camacho, S. Chino, P. Jácques y M.E. López. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. México. p. 253.

Álvarez-Castellanos, P.P., Ch. D. Bishop y M. J. Pascual-Villalobos. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. Phytochemistry. 57: 99-102.

Anónimo 1980. Principales plagas de granos almacenados. Dirección General de Sanidad Vegetal, SARH. México. 74 p.

Anónimo. 1994. Catálogo oficial de plaguicidas. SAGAR. México, D.F. pp 247.

Anónimo. 1998. Catálogo Oficial de Plaguicidas. CICOPLAFEST. SECOFI, SEMARNAP, SAGAR y SSA. México, D.F. 519 p.

Aranda, H. E. 1987. Plaguicidas agrícolas: los riesgos de su utilización y la legislación mexicana. En: Plaguicidas, problemas y perspectivas. Cuadernos del CIDICAP. México, D.F. pp. 58-59.

Araujo, E.C., E.R. Silveira, M.A.S. Lima, M. Andrade N., I. L. De Andrade, M.A.A. Lima, G.M.P. Santiago y A. Lindemberg M.M. 2003. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiussi* Benth. Journal of Agricultural Food Chemistry. 51: 3760-3762.

Ariza, F., R., F. Leyva, G. y D. Noriega C. 1992. Metodología de investigación para el control físico en granos almacenados. En: Memorias del IV Simposio Nacional sobre Problemas Entomológicos de Granos Almacenados. UASLP. San Luis Potosí, S.L.P. pp. 45-50.

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

Bonifaz, A. 2000. Micología médica básica. 2ª. Edición. Méndez Cervantes. México, D.F. 459 p.

Bruce, T.J. y A. Cork. 2001. Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of African marigold, *Tagetes erecta*. Journal of Chemistry Ecology. 27: 1119-1131.

Bruneton, J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Acriba. España.

391 p.

Candan, F., M. Unlu, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sökmen y H.A. Akpulat. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. 87: 215-220.

Cárdenas O., N.C. 1998. Plantas de la familia Rutaceae con actividad fungicida en *Aspergillus flavus* Link. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. S.L.P. México. 75 p.

Carson, C.F., T.V. Riley. 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal of Applied Bacteriology. 78: 264-269.

Carvajal M., M. 2000. Subsistema: Investigación sobre aflatoxinas ¿Para qué?. En: Memorias de la VIII Reunión Anual. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México, D.F. pp. 313-316.

Cimanga, K., K. Kambu, L. Tona, S. Apers, T. De Bruyne, N. Hermans, J. Totté, L. Pieters y A.J. Vlietinck. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacology. 79: 213-220.

Chu, F.S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanics, carcinogenetic potential and preventive measures. *Mutation Research*. 259: 291-306.

Dahot, U. M. 1999. Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 64: 277-282.

Delgado, G. y M.Y. Ríos. 1991. Monoterpenes from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry*. 30: 3129-3131.

Delgado, G., M.Y. Ríos y C. Rodríguez. 1993. Additional terpenoids from *Chrysactinia mexicana*. *Planta Médica*. 59: 482.

Domínguez, X.A., D. Butruille y J. Wapinsky. 1971. Les alcaloides principaux de *Decatropis bicolor*. *Phytochemistry*. 10: 2554-2555.

Domínguez, X.A. y E. Pierantozzi. 1972. 1.8-cineol and sitosterol from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry*. 11: 2629-2630.

Domínguez, X.A. 1985. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa S.A. de C.V. México, D.F. 281 p.

Domínguez, X.A., G. Vázquez y R.N. Baruah. 1985. Constituents from *Chrysactinia mexicana*. *Journal of Natural Products*. 48: 681-682.

Downum, K.R., D.J. Keil y E. Rodríguez. 1985. Distribution of acetylenic thiophenes in the pectidinae. *Biochemical-Systematics and Ecology*. 13: 109-114.

El-Shazly, A., G. Dorai y M. Wink. 2002a. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 57c: 434-439.

El-Shazly, A., G. Dorai y M. Wink. 2002b. Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *Tanacetum santolinoides* (DC.) Feinbr. and Fertig. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 57c: 620-623.

Evans, E.C. 1991. *Tratado de Farmacognosia* Trease-Evans. 13^a edición. Interamericana McGraw-Hill. México. 901 p.

Fakhoury, A.M. y C.P. Woloshuk. 2001. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal α -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14: 955-961.

Faleiro, M.L., M.G. Miguel, F. Ladeiro, F. Venancio, R. Tavares, J.C. Brito, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso y L.G. Pedro. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letter in Applied Microbiology*. 36: 35-40.

García-Argaéz, A.N., T.O. Ramírez A., H. Parra D., G. Velásquez, M. Martínez V. 2000. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Médica*. 66: 279-281.

Gomes-Carneiro, M.R., I. Felzenszwalb y F.J. Paumgarten. 1998. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutan Research*. 416: 129-136.

Gómez, F. 1995. El papel del fitomejorador en poscosecha. En: El sistema poscosecha de granos en el nivel rural: problemática y propuesta. E. Moreno M., F. Torres e I. Chong. (Eds.). Programa Universitario de Alimentos (PUAL). UNAM. México, D.F. pp. 339-348.

González, E. M. 1984. Las plantas medicinales de Durango. Cuadernos de Investigación Tecnológicas. IPN. 1: 26-29.

González A., U. 1995. El maíz y su conservación. Trillas. México, D.F. 399 p.

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

Guo, B.Z., J.S. Russin, T.E. Cleveland, R.L. Brown y K.M. Damann. 1996. Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathology*. 86: 824-829.

Guo, B.Z., R.L. Brown, A.R. Lax, T.E. Cleveland, J.S. Russin y N.W. Widstrom. 1998. Protein profiles and antifungal activities of kernel extracts from corn genotypes resistant and susceptible to *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*. 61: 98-102.

Gutiérrez-Lugo, M.T., T. Barrientos B., B. Luna, R.M. Ramírez G., R. Bye, E. Linares y R. Mata. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extract from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*. 2: 341-347.

Guynot, M.E., A.J. Ramos, L. Setó, P. Purroy, V. Sanchis y S. Marín. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 893-899.

Guzmán, P.D. 1997. Estudios de las aflatoxinas en México. En: H.J. Ruíz, P.D. Guzmán y J.J. Peña (Eds). *Perspectivas de la Microbiología en México*. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. pp. 181-199.

Guzmán, P.D. y H.J. Ruiz. 1997. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*. 21:198-205.

Hammer, K.A., C.F. Carson, T.V. Riley. 2002. In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 195-199.

Hammerschmidt, F.J., A.M. Clark, F.M. Soliman, E.S. El-Kashoury, M.M. Abd el Kawy, A.M. El-Fishawy. 1993. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Jasonia candicans* and *J. montana*. *Planta Medica*. 59: 68-70.

Harborne, J.B. 1998. *Methods of plants analysis. phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Third edition. Chapman & Hall, London. 302 p.

Harborne, J.B., J. Greenham, J. Eagles y E. Wollenweber. 1991. 6-Hydroxyflavonol glucosides from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry*. 30: 1044-1045.

Hashimoto, K., K. Satoh, Y. Kase, A. Ishige, M. Kubo, H. Sasaki, S. Nishikawa, S. Kurosawa, K. Yakabi y T. Nakamura. 2001. Modulatory effect of aliphatic acid amides from *Zanthoxylum piperitum* on isolated gastrointestinal tract. *Planta Medica*. 67: 179-181.

Hernández del A., F. A., Y. Jasso P., N. C. Cárdenas O., B. I. Juárez F. y J. Fortanelli M. 2000. Actividad insecticida y antifúngica de dos especies de la familia Asteraceae. *Acta Científica Potosina*. 15: 40-53.

Hitokoto, H., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai y I. Ueno. 1980. Inhibitory effect of spices on growth and toxin production by toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 181-186.

Jain, S.K. y S.C. Agrawal. 2002. Fungistatic activity of some perfumes against otomycotic pathogens. *Mycoses*. 45: 88-90.

Juárez F., B.I. 1998. Especies silvestres de la familia Compositae con actividad insecticida sobre el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. UASLP. San Luis Potosí, S.L.P. México. 35 p.

Juárez P., M.A., J.A. Reyes A., y A.E. Andrade. 1996. Flora útil de tres tipos de matorral en el altiplano potosino-zacatecano. *Revista de Geografía Agrícola*. 22-23: 23-37.

Kalemba, D., D. Kusewicz, K. Swiader. 2002. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nokai. *Phytotherapy Research*. 16: 288-291.

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

Ketho, G.K., A.I. Glitho y J. Huignard. 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *Journal of Economic Entomology*. 95: 174-182.

Kouokam, J.C., T. Jahns y H. Becher. 2002. Antimicrobial activity of essential oil and some isolated sulfur-rich compounds from *Scorodophloeus zenkeri*. *Planta Medica*. 68: 1082-1087.

Lagunes T., A. 1994. Extractos, polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas de maíz y frijol en la agricultura de subsistencia. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. de México. 32 p.

Lima, E.O., O.F. Gompertz, A.M. Giesbrecht y M.Q. Paulo. 1993. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 36: 333-336.

Lindbland, C. y L. Druben, 1981. Almacenamiento del grano, manejo, secado, silos, control de insectos y roedores. Concepto. México, D.F. 331 p.

Llewellyn, G.C., M. Lee B. y T. Eadie. 1981. Potential mold growth, aflatoxin production and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. *Journal Association Official Analysis Chemistry*. 64: 955-960.

Luna-Romero, I.J., M. Carvajal M., A. Flores M. y R. Ferrera C. 2000. Possibility of biological control of *Aspergillus flavus* with *Pseudomonas fluorescens* on maize ear. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18: 50-54.

Luna-Romero, I.J., M. Carvajal M. A. Flores M. y H. Hernández. 2001. Efecto de bacterias antagónicas sobre *Phytophthora cinnamomi* y otros géneros de hongos fitopatógenos. En: Memorias del 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Mich. México. pp. 77-82.

Macchioni, F., P.L. Cioni. G. Flamini, I. Morelli, S. Perrucci. A. Franceschi. G. Macchioni y L. Ceccarini. 2002. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 50: 4586-4588.

Mahmoud, A. 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letter in Applied Microbiology*. 19: 110-113.

Markham, R.H. 1992. Control biológico en granos almacenados: metodologías de investigación. En: Memorias del IV Simposio Nacional sobre Problemas Entomológicos de Granos Almacenados. UASLP. San Luis Potosí, S.L.P. pp. 58-66.

Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. D.F. 1200 p.

Martins, A.P., L. Salgueiro, M.J. Goncalves, A. Proenca da Cunha, R. Vila, S. Canigueral, V. Mazzoni, F. Torni, J. Casanova. 2001. Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tome e Principe. *Planta Medica*. 67: 580-584.

Mimica-Dukic, N., B. Bozin, M. Sokovic, B. Mihajlovic y M. Matavulj. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*. 69: 413-419.

Mishra, A.K. y N.K. Dubey. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Enviromental Microbiology*. 60: 1101-1105.

Molina-Torres, J., R.Salgado G., E. Ramírez Ch. y R.E. del Río. 1996. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 24: 43-47.

Molina-Torres, J. y A. García Ch. 2001. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avances y Perspectivas*. 20: 377-387.

Molina-Torres, J., C.J. Salazar C., C. Armenta S. y E. Ramírez Ch. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 52: 4700-4704.

Montes B., R. y R. Figueroa B. 1995. Biocontrol de hongos en granos almacenados. En: K. Bermúdez T. y A. Jiménez P. (Eds). Plantas: biotecnología, agronomía, nutrición. Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas del IPN. México. pp. 26-30.

Moreno M., E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos almacenados. UNAM. México. 190 p.

Moreno M., E. 1991. La investigación en postcosecha de granos y semillas. En: M. Ramírez M. (Ed). Memorias de la II Reunión Nacional sobre la Problemática de Postcosecha de Granos y Semillas. A.C. Programa Universitario de Alimentos, UNAM. México, D.F. pp. 1-4.

Moreno M., E. 1995. Almacenamiento y conservación de granos en el medio rural. En: El sistema poscosecha de granos en el nivel rural: problemática y propuesta. E. Moreno M., F. Torres e I. Chong. (Eds.). Programa Universitario de Alimentos, UNAM. México, D.F. pp. 247-261.

Moreno M., E. 1996. La humedad: su importancia en la conservación de los granos y semillas. En: Curso teórico. Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Programa Universitario de Alimentos UNAM. México, D.F. pp. 44-71.

Moreno M., E. y M. Gil G. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. México, D.F. 42 p.

Moreno M., E., R.A. Rivera y F. Cruz G. 1991. Estudio sobre la fitotoxicidad de fungicidas en el tratamiento de la semilla de trigo. En: Memorias del IV Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología. Tlaxcala, Tlax. México. p. 81.

Nielsen, P.V. y R. Ríos. 2000. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*. 60: 219-229.

Ospina S., E. 1995. Secado y almacenamiento de granos en zonas rurales y centros de acopio en Colombia. En: E. Moreno M., F. Torres e I. Chong. (Eds). El sistema poscosecha de granos en el nivel rural: problemática y propuesta. Programa Universitario de Alimentos, UNAM. México, D.F. pp. 283-306.

Paranagama, P.A., K.H.T. Abeysekera, K. Abeywickrama y L. Nugaliyadde. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 86-90.

- Pattnaik, S., V.R. Subramanyam, M. Bapaji, C.R. Kole. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 89: 39-46.
- Pedras, M.S.C., N. Ismail, J. Wilson Q. y S. M. Boyetchko. 2003. Structure, chemistry and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry*. 62: 1105-1114.
- Pérez C., A.M. Agnese y J.L. Cabrera. 1999. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests. *Journal of Ethnopharmacology*. 66: 91-96.
- Pérez G., J.M. 2002. Actividad amebicida y antibacterial de cinco especies de la familia Asteraceae. Tesis profesional (Química Farmacobióloga). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P. México. 39 p.
- Pitarokili, D., M. Couladis, N. Petsikos-Panayotarou y O. Tzakou. 2002. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Savia sclarea* from Greece. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 50: 6688-6691.
- Pitarokili, D., O. Tzakou, A. Loukis y C. Harvala. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51: 3294-3301.

Rahmani M., Y.H. Taufiq-Yap, M.A. Sukari y H.B.M. Ismail. 1996. Constituents of *Acronychia laurifolia*. *Fitoterapia.* LXVII: 180.

Rai, M. y D. Acharya. 1999. Screening of some asteraceous plants for antimycotic activity. *Comp. Newsl.* 34: 37-43.

Ramírez V., E.G. 1995. Aflatoxinas: metodología analítica y sus efectos en la salud. *Revista de la Sociedad de Química de México.* 1: 48-50.

Raper, K.B. y D.I. Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams and Williams Co. U.S.A. pp. 360-379.

Rosiles M., R. 1996a. Aflatoxinas. En: Memorias del curso de actualización sobre plaguicidas y micotoxinas. UNAM. México, D.F. pp. 1-37.

Rosiles M., R. 1996b. Insecticidas organoclorados y organofosforados. En: Memorias del curso de actualización sobre plaguicidas y micotoxinas. UNAM. México, D.F. pp. 38-50.

Rovalo M., M., B. Graue W., M.E. González, D.B. Rojas, M.L. Covarrubias y E. Magallanes. 1983. La barreta o barreto, *Helietta parvifolia*, recurso vegetal desaprovechado del semidesierto del norte de México. INIREB. Xalapa, Ver. México. 19 p.

Rzedowski, J. 1955. Plantas Interesantes del Estado de San Luis Potosí. Editorial Universitaria Potosina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí. S.L.P. 2 p.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México, 2ª.ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), México. 1406 p.

Salas de L., S. 1987. La familia Compositae de la zona árida del estado de San Luis Potosí, México. Tomo I y II. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, UASLP. San Luis Potosí, S.L.P. México. 273 p.

Salazar N., N.G. 1999. Farmacoetnología del "Chilcuague" *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake. Tesis profesional (Químico Farmacobiólogo). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P. México. 72 p.

Schneider, K. (Ed.). 1995. Recomendaciones para almacenamiento (problemas y manejo). Programa Regional de Postcosecha. Cooperación Suiza para el Desarrollo. Managua, Nicaragua. 50 p.

Shahi, S.K., M. Patra, A.C. Shukla y A. Dikshit. 2003. Use of essential oil as botanical pesticide against post harvest spoilage in *Malus pumilo* fruit. BioControl. 48: 223-232.

Shin, S. 2003. Anti-Aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or anphotericin B. Archives of Pharmacal Research. 26: 389-393.

Shriner R.L., C.R. Fuson y D.Y. Curtin. 1991. Investigación sistemática de compuestos orgánicos. 10ª. Reimpresión. Limusa. México, D.F. p 57.

Sifuentes A., J.A. 1977. Plagas de los granos almacenados y su control. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. SARH. México. 25 p.

Singh. U., V. Pandey, K. Wagner y K. Singh. 1990. Antifungal activity of ajoene, a contituent of garlic (*Allium sativum*) Canadian Journal of Botany 68: 1354-1356.

Sokmen, A., G. Vandar-Unlu, M. Polissiou, D. Daferera, M. Sokmen y E. Donmez. 2003. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenissi* Hub. Mor. (Asteraceae). Phytotherapy Research. 17: 1005-1010.

Sokovic, M., O. Tzakou, D. Pitarokili, M. Couladis. 2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. Nahrung. 46: 317-320.

Soliman, K.M. y R.I. Badeaa. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigen fungi. Food and Chemical Toxicology. 40: 1669-1701.

Standley, P.C. 1923. Trees and shrubs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium. Smithsonian Institution. United States National Museum. Washington, D.C. 23: 517-848.

Tandan, S.K., S. Chandra, H.C. Tripathi, J. Awaha Lal. 1990. Pharmacological actions of seselin, a coumarin from *Seseli indicum* seeds. Fitoterapia. LXI: 360-363.

Tirillini, B., E. Rojas V. y R. Pellegrino. 1996. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. Planta Medica. 62: 372-373.

Unlu, M., D. Daferera. E. Donmez. M. Polissiou. B. Tepe y A. Sokmen. 2002. Compositions and in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). Journal of Ethnopharmacology. 83: 117-121.

Varma, J., M. Tripathi, V.J. Ram, V.B. Pandey y N.K. Dubey. 2002. Asarone the fungitoxic principle of the essential oil of *Caesulia axillaris*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 277-279.

Vázquez, A.M. 2001. El ecosistema de los granos almacenados. Avance y Perspectiva. 20: 407-413.

Vila, R., L. Valenzuela, H. Bello, S. Cañigüeral, M. Montes y T. Adzet. 1999. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. *Planta Medica*. 65: 178-179.

Villavicencio, M., A. Pérez y B. Ramírez. 1995. Actividad insecticida de aceites esenciales de especies de compuestas. En: *Memorias del XIII Congreso Mexicano de Botánica*. Sociedad Botánica de México. Cuernavaca, Mor. México. p. 111.

Wicklow, D.T., B.K. Joshi, W.R. Gamble, J.B. Gloer y P.F. Dowd. 1998. Antifungal metabolites (monorden, monocillin IV and cerebrosides) from *Humicola fuscoatra* Traaen NRRL 22980, a mycoparasite of *Aspergillus flavus* sclerotia. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4482-4484.

Zavalza S., A. 2001. Actividad de plantas medicinales contra dermatofitos y su uso alternativo en dermatofitosis de tratamiento tópico. Tesis de Maestría en Salud Pública. Facultad de Enfermería. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S:L:P: México. 59 p.

Zeringue, H.J., Jr. 2000. Identification and effects of maize silk volatiles on cultures of *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48: 921-925.

Zweig, G. y J. Sherma. 1984. *CRC Handbook of Chromatography: General Data and Principles*. 7ª. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. USA. 344 p.

De: "Willis Wheeler" <jafc@comcast.net> 

Para: <normac@uaslp.mx>

Fecha: 04/02/2005 01:55 PM

Asunto: Manuscript JF040372H

Dra. Cardenas,

This is to notify you that your manuscript has been accepted and sent to our Columbus, Ohio office for completion of the publication process. That office will contact you regarding galley proofs and publication schedules. Should you have any questions, please contact me or Eileen Richardson of the Columbus office (614-447-3600 ext. 2364; erichards@acs.org).

It has been a pleasure working with you. I hope you will consider the "Journal of Agricultural and Food Chemistry" for your future publications.

Sincerely,

Willis

Willis B. Wheeler

Associate Editor

Journal of Agricultural and Food Chemistry

Chemistry Department

George Mason University

4938 Hampden Lane, #298

Bethesda, MD 20814

USA

301-664-6402

301-664-6433 (Fax)

Norma C. Cárdenas-Ortega,^{1*} Miguel A. Zavala-Sánchez,² J. Rogelio Aguirre-Rivera,³

Cuauhtémoc Pérez-González,² Salud Pérez-Gutiérrez²

Affiliation

¹Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr.

Manuel Nava No. 6. C.P. 78290. San Luis Potosí, S.L.P. México. Doctorado en Ciencias Biológicas UAM.

²Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana A.P. 23-181 México D.F.

³IIZD. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Altair No. 200. Fraccionamiento Del Llano. C.P. 78377 San Luis Potosí, S.L.P. México.

Correspondence

Norma C. Cárdenas-Ortega. Laboratorio de Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas.

Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava No. 6. Zona

Universitaria. C.P. 78290. San Luis Potosí, S.L.P. México. Tel: (52)444 8262440;

(52)444 8174125. Fax: (52)444 8262372. E-mail: normac@uaslp.mx

Abstract

The chemical composition of the essential oil of *Chrysactinia mexicana* was analyzed by gas-chromatography-mass spectrometry. Seventeen compounds were characterized; eucalyptol (41.3%), piperitone (37.7%), and linalyl acetate (9.1%) were found as the major components. The essential oil of leaves and piperitone completely inhibited *Aspergillus flavus* growth at relatively low concentrations (1.25 and 0.6 mg/mL, respectively).

Keywords

Chrysactinia mexicana; Piperitone; Essential oil composition; antifungal activity; *Aspergillus flavus*

Introduction

Specific conditions of temperature and humidity during storage may contribute to promoting fungal growth in grains and feeds (1). Fungi may discolor grains, change their chemical and nutritional characteristics and most importantly, some species also generate mycotoxins such as aflatoxins, which may produce carcinoma, mainly in liver and lung (2,3).

Chemicals are one of the main methods used to control phytopathogenic fungi; however, synthetic fungicides may produce resistant plagues and might be carcinogenic and teratogenic (4). Pesticides derived from plants have been found non-toxic with mammals and easily biodegradable (5,6). Many essential oils from plants have shown to be effective against fungi contamination (7–9). The essential oil isolated from *Calamintha nepeta* has activity against *Aspergillus niger* (10) as same as the essential oil isolated from *Nepeta cataria* (11), in both one of the main constituents is piperitone, however no reports about the effect of this compound against fungi were found.

Chrysactinia mexicana Gray (Asteraceae), commonly known as St. Nicholas's herb or "false Damiana" is a small shrub distributed throughout central and northern Mexico (12). This plant is used in folk medicine for treatment of respiratory ailments and skin infections (13). Previous studies on the chemical constituents of *C. mexicana* reported flavonoid glycosides (14), thiophenes (15), and terpenes (16–18). However, a survey of the literature showed no studies done with regard to neither chemical composition nor antifungal activity of essential oil.

In an earlier work, we found that hexane extract of this plant has antifungal activity on *Aspergillus flavus* Link (19). Based on these antecedents, our objectives in the present work consisted first of determining the chemical composition of the essential oil by GC-MS analysis and second, of evaluating its activity on *Aspergillus flavus* growth.

Materials and Methods

Plant material. *C. mexicana* leaves were collected in September 2003, 2 km from the cross-roads of 57 highway to Guadalcázar in the central Mexican state of San Luis Potosí. Material was authenticated by Taxonomist José García-Pérez and a voucher specimen (SLPM 37571) was deposited at the Isidro Palacios Herbarium of the Universidad Autónoma de San Luis Potosí's (UASLP) Desert Zone Research Institute.

Isolation and analysis of essential oil. Leaves of fresh plants were used and essential oil was extracted by steam distillation. The oil and steam was condensed in a refrigerant system followed by extraction with ethyl ether. We obtained a yellow oil: $\eta_D^{20^*} = 1.4790$; $p^{20^*} = 0.9290 \text{ g/cm}^3$; yield was 0.94% v/w. Analysis of the essential oil was performed using a Hewlett-Packard 6890 GC equipped with DB Wax (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25- μm film thickness) and a Jeol GC-mate as detector in EI mode at 70 eV. The carrier gas was helium, at a flow rate of 1 mL/min; split ratio was 1:10. Column temperature was initially 50°C and gradually increased to 85°C at 4°C/min; subsequently, it increased to 130°C at 1°C/min, and finally increased at 4°C/min to 220°C for 10 min. 0.1 μL was injected. The relative time retention obtained in gas chromatography for the components of essential oil were compared with those obtained at the same conditions with commercial compounds, as well their mass spectra were compared with those of pure samples and with mass spectra from the National Institute of Standards and Technology/National Bureau of Standards (NIST/NBS) Library (USA).

Antifungal screening. Antifungal screening was performed using Czapek agar (DIFCO). Nutrient media was prepared according to manufacturer-recommended procedures and sterilized for 15 min at 120°C. *Aspergillus flavus* Link SRRC 1273 from The National Center for Agricultural Utilization (Peoria, IL, USA) was used for determination of antifungal activity; diffusion method consisted of well plates on agar (20). Each culture was prepared to turbidity equivalent to a Wikerham scale cross and spread on the test plate. A total of 1.25, 2.5, 5.0, 10, or 20 mg of essential oil in DMSO was placed in a well 6 mm in diameter made on the test plate and cultured for 72 h at 28 ± 1°C; all determinations were repeated five times. Five µg of daconil (tetrachloroisophthalonitrile) (Coraza) was used as positive control and DMSO (50 µL) as negative control. Inhibition diameters were determined after incubation.

Minimum inhibitory concentration (MIC). MIC determination was made using dilution technique (21). Tests were performed in dextrose Sabouraud broth. Different concentrations of essential oil or one of its compounds were prepared in 4 mL of broth to obtain final concentrations of 0.125–1.5 mg/mL. These solutions were placed in culture tubes and then inoculated with approximately 1,000 spores per 0.1 mL of suspension of *A. flavus*. Tubes were incubated at 28° ± 1°C for 72 h. Minimum inhibitory concentration was determined when no evident growth of the microorganism was demonstrated. When it was considered necessary, concentrations were increased or decreased accordingly.

Fungicidal or fungistatic activity. 0.1 mL of the suspension with the microorganism was inoculated to a tube of dextrose Sabouraud broth containing the same concentration of the essential oil or one of its compounds at which growth was not detected in the MIC and incubated for 72 h at $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. After this time a sample (0.1 mL) was dispersed on agar Czapek plate and incubated for 72 h at the same conditions. The concentration that shown growth inhibition of *A. flavus* in the dextrose Sabouraud broth with growth on Czapek agar was considered as fungistatic activity. When there was not growth in both (dextrose Sabouraud broth and Czapek agar), a fungicidal activity was considered (minimum fungicidal concentration MFC).

Results and Discussion

Leaves of *C. mexicana* (1.6 kg) were extracted and 15 mL of crude essential oil were obtained. The composition of *C. mexicana* essential oil was determined by comparing relative retention times and mass spectra of oil components with those of authentic samples and mass spectra from the data library. Seventeen components of *C. mexicana* essential oil were identified; nonetheless, it is characterized by the dominant presence of two substances—eucalyptol (41.3%) and piperitone (37.7%)—but analysis revealed an additional 30 constituents (Table 1). Among these the following were detected: linalyl acetate (9.1%); α -myrcene (1.2%); α -thujone (1.2%), and 3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol (1.4%). The remaining 24 compounds detected by GC-MS were present in very low proportions (<1%).

The antifungal screening showed that the essential oil of *C. mexicana* caused inhibition of *A. flavus* growth. Inhibition diameters were 17.8 ± 0.017 , and 25.2 ± 0.022 mm with 1.25 and 2.5 mg of the oil, respectively. When we used 5.0, 10.0, and 20.0 mg, no growth of fungi was observed.

Essential oil of *C. mexicana* (Table 2) was fungistatic and fungicidal against *A. flavus* at 1.0 and 1.25 mg/mL concentrations, respectively, in liquid culture media. Several reports are available on the effect of essential oils on growth and aflatoxin formation of *A. flavus* (22,23). It was found that lemongrass essential oil was fungistatic and fungicidal against this fungus at 0.6 and 1.0 mg/mL concentrations, respectively (7). Daferera and co-workers (24) reported the effect of oregano, thyme, dictamus, and marjoram essential

oils, which completely inhibited conidial germination of *Penicillium digitatum* at a concentration of ~250 µg/mL. A study carried out by Bankole (25) revealed complete inhibition on growth and aflatoxin production of *A. flavus* at 1,000 parts per million (ppm) of *Morinda lucida* and at 500 ppm of *Azadirachta indica* seed oil.

Pure commercial eucalyptol, linalyl acetate, and piperitone, the major constituents of *C. mexicana* oil, were tested against *A. flavus* (Table 3) under identical conditions to compare its activity with that of the investigated oil. Only piperitone effectively inhibited mycelial growth, and complete inhibition was observed at a concentration of 0.6 mg/mL. Pitarokili (26) found that linalyl acetate presented inhibitory action on *Sclerotinia sclerotiorum* at EC₅₀ (concentration causing 50% inhibition of mycelial growth on control media) of 569.62 µL/L, whereas with other soil-borne pathogen fungi EC₅₀ values exceeded 1,500 µL/L. However, at a similar concentration (600 mg/mL), this compound had no effect on *A. flavus*.

On the other hand, it was found that piperitone possesses electrophysiologic and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* (27) that could have affected the survival of two insect species (28) and also can also have antimicrobial activity (29) and antispasmodic action (30); in addition, piperitone is used as flavoring agent.

Nevertheless, this is the first time that the fungicidal activity of this compound has been reported, its efficacy against *A. flavus* is evident from the current study. Therefore, use of piperitone could be recommended for protecting grains with further investigations in field trials.

References

1. Christensen, C.M.; Saucer, D.B. *Microflora. In storage of cereal grains and their products*. Saucer D.B., editor. MI, USA: American Association of Cereal Chemists; 1992. pp. 219-240.
2. Blum, E. Molecular targets for prevention of hepatocellular carcinoma. *Dig. Des.* **2002**, 20(1), 81-90.
3. Van Vleet, T.R.; Klein, P.J.; Coulombe, R.A. Metabolism and cytotoxicity of aflatoxin in cytochrome p-450-expressing human lung cells. *J. Toxicol. Environ. Health* **2002**, 65(12), 853–86.
4. Diop, Y.M.; Diuf, M.A.; Fall, A.; Thiam, B.; Ndiaye, M.; Ciss, D. Pesticide bioaccumulation: measurement and levels of organochloride residues in products of vegetables origin. *Dakar Med.* **1999**, 44(2), 153–157.
5. Rao, G.P.; Singh, H.N. Fungitoxic evaluation of essential oil extracted from higher plants against some sugarcane pathogens *in vitro*. *Trop Sci.* **1992**, 32, 377-382.
6. Montes-Belmont, R. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. *Rev. Mex. Fitopatol.* **1996**, 16(1), 9-14.
7. Paranagama, P.A.; Abeysekera, K.H.T.; Abeywickrama, K.; Nugaliyadde, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbapogon citratus* (DC) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link isolated from stored rice. *Lett. Applied Microbiol.* **2003**, 37, 86-90.

8. Bamkole, S.A. Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B₁ production in maize by a toxigenic *Aspergillus flavus*. *Lett. Applied Microbiol.* **1997**, 24, 190-192.
9. Kalemba, D.; Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current. Med. Chem.* **2003**, 10, 813-829.
10. Kitic D.; Jovanovic T.; Ristic M.; Palic R.; Stojanovic G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* Subsp glandulosa (Req.) P.W. Ball from Montenegro. *J. Essent. Oil Res.* **2002**, 10, 813-829.
11. Bourrel, C.; Perineau, F.; Michel, G.; Bessiere, J.M. Catnip (*Nepeta cataria* L.) essential oil: analysis of chemical constituents, bacteriostatic and fungistatic properties. *J. Essent. Oil Res.* **1993**, 5(2), 159-167.
12. Rzdowski, G.C.; Rzdowski, J. *Flora fanerogámica del Valle de México*, 2a ed. México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México; 2001. p. 17.
13. Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*. 6a ed. México, D.F.: Ediciones Botas; 1968. pp. 136-137.
14. Harbone, J.B.; Greenham, J.; Eagles, J.; Wollenweber, E. 6-Hydroxyflavonol glycosides from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry* **1991**, 30(3), 1044-1045.
15. Domínguez, X.A.; Vázquez, G.; Baruah, R.N. Constituents from *Chrysactinia mexicana*. *J. Nat. Prod.* **1985**, 48(4), 681-682.
16. Domínguez, X.A.; Pierantozzi, E. 1,8-cineole and sitosterol from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry* **1972**, 11, 2629-2630.

17. Delgado, G.; Ríos, M.Y. Monoterpenes from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry* **1991**, 30(9), 3129-3131.
18. Delgado, G.; Ríos, M.Y. Additional terpenoids from *Chrysactinia mexicana*. *Planta Med.* **1993**, 59(5), 482.
19. Cárdenas O., N.C.; Pérez G., S.; Zavala S., M.A.; Pérez G., C.; Aguierrre R., J.R. Actividad antifúngica de cinco plantas sobre *Aspergillus flavus*. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **2003**, 34, 124.
20. Cárdenas O., N.C. Plantas de la familia Rutaceae con actividad fungicida sobre *Aspergillus flavus* Link. M.Sc. Thesis, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P., México; 1998. pp. 53-54.
21. Sydney, M.F.; William, J.M.; Elvyn, G.S. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. St. Louis, MO, USA: Moseby; 1978. pp. 385-403.
22. Montes-Belmont, R.; Carvajal, M. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J. Food Proteccion* **1998**, 61, 616-619.
23. Adegoke, G.O.; Iwahashi, H.; Obuchi, K.; Iwahashi, Y. Inhibition of food spoilage yeast and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum danielli*. *Flavor Frag. J.* **2000**, 15, 147-150.
24. Daferera, J.D.; Ziogas, N.B.; Polissiou, G.M. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicilium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2576- 2581.
25. Bankole, A.S. Effect of essential oils from two Nigerian plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B, production in maize grain by a toxigenic *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **1997**, 24, 190-192.

26. Pitarokili, D.; Couladis, M.; Petsikos-Panayotarou, N.; Tzakou, O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(23), 6688-6691.
27. Bruce, T.; Cork, A. Electrophysiological and behavioral responses of female *Helicoverpa armigera* to compounds identified in flowers of African marigold, *Tagetes erecta*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27(6), 1119-1131.
28. Ketoh, G.K.; Glitho, A.I.; Huignard, J. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. *J. Econ. Entomol.* **2002**, 95(1), 174-182.
29. Sokmen, A.; Vardar-Unlu, G.; Polissiou, M.; Daferera, D.; Sokmen, M.; Donmez, E. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintonissi* Hub. Mor. (Asteraceae). *Phytother. Res.* **2003**, 17(9), 1005-10.
30. Huang, T.T.; Li, H.L.; Ch'Iao, T.F. Vitamin K-3 in experimental relaxation of ileum spasm and clinical treatment of biliary colic in biliary ascariasis. *Chinese Med. J. Peking* **1975**, 11, 710-716.

Table 1. Composition of the essential oil isolated from *Chrysactinia mexicana*

Retention Time (min)	Compound	Composition (%)
11.58	α -Phellandrene	0.25
13.07	α -Myrcene	1.20
13.46	α -Thujone	1.17
15.22	1-Methyl-4-(1-methylethenyl) cyclohexanol acetate	0.63
17.51	Eucalyptol	41.30
19.34	2-Ethyl-6-methyl benzenamine	0.47
43.02	3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol	1.39
46.11	<i>Trans</i> -limonene	0.69
49.55	4-Methyl-1-(1-methyl ethyl)-3-cyclohexen-1-ol	0.10
52.58	<i>Cis</i> -limonene	0.44
57.05	S-(tetrahydro-2H-pyran-3-yl) ethanethioic ester	0.04
59.23	Linalyl acetate	9.08
62.06	Piperitone	37.74
63.43	<i>Exo</i> -2-hydroxy cineole acetate	0.11
67.14	<i>Exo</i> -2-hydroxy cineole	0.87
71.59	Phenol	0.06
75.37	3-Phenyl-2-propenyl ethyl ester	0.29

Table 2. Determination of MIC and MFC with essential oil

	Concentration (mg/mL)						
Essential oil	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5
DSB	+	+	+	+	-	-	-
Czapek	+	+	+	+	+	-	-

DSB, dextrose Sabouraud broth; +, growth; -, no growth.

Table 3. Antifungic activity of eucalyptol, linalyl acetate, and piperitone (mg/mL) on *A.*

flavus

Compound	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Eucalyptol	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Linalyl acetate	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Piperitone	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-

+/+ growth in DSB/growth in Czapek agar; CMI +/- no growth in DSB/growth in Czapek agar; CMF -/- no growth in DSB/no growth in Czapek agar.