

Compuestos antifúngicos en *Prosopis ruscifolia*: identificación y análisis de su utilidad en el control de especies toxigénicas de *Aspergillus*

Analía de los Ángeles Gómez^{1*}, Diego Alejandro Sampietro¹, Tsvetelina Mandova²,
Raphael Grougnet², Marina Kritsanida², Marta Vattuone¹

¹LABIFITO. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

²Laboratoire de Pharmacognosie, UMR/CNRS 8638 COMETE, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie de Paris. France.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: analiagomez_3@hotmail.com

Resumen

Se requieren nuevos agentes antifúngicos capaces de controlar a los hongos del género *Aspergillus* que provocan pudriciones en maíz especialmente en los granos almacenados, contaminándolos con aflatoxinas (Ni). La ingestión de estas micotoxinas puede ocasionar intoxicaciones en humanos y animales. El control químico de especies de *Aspergillus* se restringe al uso de preservantes de grado alimenticio, los cuales son fungistáticos, pueden alterar las características organolépticas del grano y en dosis subinhibitorias del crecimiento micelial pueden estimular la producción de aflatoxinas. Plantas autóctonas del Noroeste de Argentina (NOA) conocidas popularmente por sus propiedades antisépticas podrían proveer metabolitos secundarios capaces de detener el progreso de estos hongos. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de extractos de "vinal" (*Prosopis ruscifolia*) sobre especies de *Aspergillus* e identificar los metabolitos responsables. Partes aéreas de *P. ruscifolia* se extrajeron secuencialmente con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. La actividad antifúngica de estos extractos se ensayó sobre seis cepas de *Aspergillus* por bioautografía de siembra puntual y por microdilución, lo que permitió determinar que solo el extracto metanólico (fMeOH) presentó actividad antifúngica sobre las especies de *Aspergillus* ensayadas. Las dosis mínimas inhibitorias del crecimiento fúngico (DIM) fueron de 50-200 µg/ml y las concentraciones inhibitorias del 50 % y 100 % del crecimiento fúngico (CI₅₀ y CIM) fueron 60-297 µg/ml y 50-1500 µg/ml respectivamente. Los constituyentes del fMeOH se separaron mediante cromatografía en columna de sílica gel y por cromatografía preparativa en capa fina. Las moléculas antifúngicas se estudiaron mediante revelados específicos en cromatografía en capa fina y por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), identificándose los compuestos como alcaloides (juliflorina y juliprosineno), un ciclitol (pinitol) y una saponina triterpénica. El fMeOH de parte aéreas de *P. ruscifolia* no manifestó toxicidad sobre *Artemia salina* (CL₅₀ > 1000 ppm), lo cual indica que el extracto no presenta citotoxicidad en eucariontes.

Antifungal Compounds in *Prosopis ruscifolia*: Analysis and Identification of its Use to Control Toxigenic Species of *Aspergillus*

Summary

New antifungals are needed to control *Aspergillus* which contaminates stored maize grains with aflatoxins toxic for humans and animals. Food additives are applied against the *Aspergillus* species. Nevertheless, they

Palabras clave: *Prosopis ruscifolia* - *Aspergillus* - antifúngicos.

Keywords: *Prosopis ruscifolia* - *Aspergillus* - antifungics.

are fungistatic, can change grain organoleptic properties and can stimulate aflatoxin production at sub-inhibitory levels. Native plants used in popular medicine as antiseptics could provide antimicrobials useful in the control of *Aspergillus*. The aim of this work was to determine the antifungal activity of extracts from “vinal” (*Prosopis ruscifolia*) against *Aspergillus* species and to identify its antifungal metabolites. Aerial parts of *P. ruscifolia* were sequentially extracted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. Antifungal activity of these extracts was tested against six strains of *Aspergillus* by dot blot bioautography and the microdilution method. These data were used to calculate the minimum inhibitory dose of fungal growth (MID) and the concentrations required to inhibit 50 % (IC_{50}) and 100 % (MIC) of the fungal growth. Constituents of the bioactive extract was separated by column chromatography and preparative thin layer chromatography (PTLC) in silica gel. Antifungal molecules were preliminarily identified by TLC and subsequently by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Only the methanolic extract showed antifungal activity against *Aspergillus* strains (IC_{50} of 60-297 $\mu\text{g/ml}$; MIC 50-1500 $\mu\text{g/ml}$). **Antifungal components were identified as alkaloids (juliflorine and prosoplorine), cyclitol (pinitol) and triterpene saponins.**

Introducción

La Argentina es el segundo exportador mundial de maíz. Para la campaña 2016/2017 se estima una cosecha record de este cereal de 31,5 millones de toneladas con un área sembrada de 4,2 millones de hectáreas (USDA, 2016; Fandos y col, 2017).

Uno de los principales factores que afectan a la producción maicera es la pudrición de granos generada por especies del género *Aspergillus* de las secciones *fumigatis* (*A. fumigatus*), *nigri* (*A. niger*) y *flavi* (*A. nomius*, *A. flavus* y *A. parasiticus*) (Figura 1) (Anderson y col., 1975).

Estos organismos provocan usualmente el mayor daño en postcosecha, reduciendo el rendimiento en

grano y contaminándolo con aflatoxinas (Mitchell y col., 2016). La ingestión de estas sustancias por encima de determinadas dosis provoca toxicidad aguda con manifestación de nefritis, necrosis hepática y congestión pulmonar, o toxicidad crónica que desencadena respuestas cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas en humanos y animales (Astoreca y col., 2011; Zain, 2011).

El control químico es una de las estrategias posibles destinadas a combatir estos hongos durante el almacenamiento de los granos, para ello se emplea sales de ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, sorbatos y propionatos). Estas sustancias provocan

Figura 1.- Efectos de *Aspergillus* en la producción de maíz



a: Mazorca infectada con *Aspergillus flavus*; **b:** Granos infectados con *Aspergillus niger*.

frecuentemente alteraciones organolépticas del maíz, son fungistáticas y en dosis subinhibitorias son capaces de incrementar la acumulación de aflatoxinas (Rusul y Marth, 1988).

Por lo tanto, se necesita la incorporación al mercado de nuevos agentes antifúngicos que permitan superar estos problemas. Existen plantas autóctonas del Noroeste Argentino (NOA) cuyos usos en medicina popular sugieren que las plantas contienen metabolitos antimicrobianos que podrían ser útiles en el control de *Aspergillus*. Entre ellas se destaca el “vinal” (*Prosopis ruscifolia* Griseb., Leguminosae), una planta de porte arbóreo (Figura 2) que ocupa grandes extensiones de territorio pudiendo formar bosques o vinales y es característica de la provincia fitogeográfica Chaqueña (Cabrera, 1971; Cabrera y Willink, 1980). Su madera se utiliza principalmente en la fabricación de postes, mientras que sus vainas y semillas se emplean como forrajes dado su alto valor nutricional (Freyre y col., 2003). Esta planta se utiliza en medicina popular como antiséptico, desinflamante, para el tratamiento de la conjuntivitis y en el control de la diabetes (Hurrel y col., 2011; Rondina y col., 2008; Scarpa, 2004).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de los extractos de *Prosopis ruscifolia* sobre especies toxigénicas de *Aspergillus* e identificar los compuestos responsables de dicha actividad.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se colectaron las partes aéreas (tallos y hojas) de *Prosopis ruscifolia* en la localidad de Icaño, departamento de Avellaneda, provincia de Santiago del Estero, en el mes de febrero de 2014. Parte del material recolectado fue herborizado y depositado en el Herbario del Instituto “Miguel Lillo”, Tucumán, Argentina, donde fue identificado y clasificado taxonómicamente por Nora Muruaga (LIL:615833)

Obtención de los extractos vegetales

El material vegetal se secó a 50 °C en estufa, se trituró con un molinillo de aspas y se almacenó al abrigo de la luz y el calor. Posteriormente, 10 g del material molido seco se extrajo secuencialmente a temperatura ambiente con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Se utilizaron 100 ml de cada uno de estos solventes por cada extracción y el tiempo de inmersión del material vegetal en cada una fue de 48 horas, efectuándose agitaciones periódicas durante ese intervalo de tiempo. Cada extracto obtenido se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 4. El material vegetal se dejó secar a 50 °C durante 24 horas entre extracciones sucesivas con solventes orgánicos. El solvente se evaporó de

Figura 2.- *Prosopis ruscifolia* Griseb (Leguminosae)



a: Rama con hojas y espinas; b: Planta entera.

los filtrados con un evaporador rotatorio al vacío. Los extractos secos se pesaron y se calculó el rendimiento de la extracción.

Microorganismos

Se utilizaron cepas de *Aspergillus* sección *flavi* (*A. nomius*VSC23, *A. nomius*13137, *A. parasiticus* NRRL2999, *A. flavus*), sección *nigri* (*A. niger*) y sección *fumigatis* (*A. fumigatus*). Las mismas pertenecen a la micoteca del Laboratorio de Biología de Agentes Bioactivos y Fitopatógenos (LABIFITO – FBQF – UNT). Se conservaron a 4 °C y se activaron a 30 °C antes de cada ensayo. El medio de cultivo utilizado para su activación fue malta-peptona agar (MPA 1,5 % p/v de extracto de malta, 0,5 % de peptona y 1,8 % de agar para medio sólido y 0,6 % de agar para medio semisólido).

Determinación de actividad antifúngica

Bioautografía por siembra puntual (Quiroga y col,2001)

Se sembraron puntualmente en cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ de 4 cm x 6 cm x 0,2 mm, cantidades conocidas (200-2.000 µg) de cada extracto ensayado. El control negativo consistió en la siembra del mayor volumen de solvente utilizado en las siembras anteriormente mencionadas. Como control positivo se utilizó ketoconazol (20 µg). Los cromatofolios sembrados posteriormente se cubrieron con 3 ml de medio maltosa -peptona- agar (MPA) semisólido conteniendo una suspensión de esporas (1 x 10⁴ esporas/ml). Las bioautografías se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Luego, se aplicó sobre las bioautografías el 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio (MTT).

La ausencia de crecimiento fúngico se manifestó por la aparición de halos de color amarillo sobre un fondo azul. La superficie de estos últimos se cuantificó utilizando el programa Fiji win 32.

Mediante este ensayo se determinó la dosis de extracto requerida para inhibir el 100 % del crecimiento fúngico (DIM).

Ensayo de microdilución en medio semilíquido

Los extractos que mostraron actividad antifúngica en el ensayo de siembra puntual precedentemente descrito, se sometieron a ensayos de microdilución

siguiendo un protocolo sugerido por el Comité Nacional para Estándares Clínicos de Laboratorio NCCLS (por sus siglas en inglés, National Committee for Clinical Laboratory Standards) modificado. Se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano y medio YES semilíquido (Medina y col, 2012). La solución *stock* de cada extracto se preparó en DMSO y se utilizó para preparar la máxima concentración a ensayar. El inóculo fúngico consistió en una suspensión de esporas en medio de extracto de levadura-sacarosa (YES) semilíquido de concentración 1 x 10⁵ esporas/ml. Se obtuvo una concentración final de 2 % de DMSO por pocillo, ensayándose cada extracto en un rango de concentraciones de 3000-87,5 µg/ml. Se incluyeron un control de crecimiento consistente en medio YES (composición en g/l: extracto de levadura 20; sacarosa 150; MgSO₄ 0,5; agar 1,3) con DMSO al 2 % y controles de esterilidad de los extractos y del medio de cultivo. Como control positivo se usó ketoconazol. Las microplacas se incubaron durante 72 horas a 30 °C. Posteriormente se registró la absorbancia a 630 nm con un lector de microplacas Biotek Elx800.

Las lecturas se corrigieron utilizando las de los correspondientes controles. Cada ensayo se hizo por triplicado. La concentración de extracto requerida para inhibir el 50 % (CI₅₀) y el 100 % (CIM) del crecimiento fúngico se determinó por el método Probit usando el programa XLSTAT 2009.

Aislamiento de constituyentes antifúngicos de *P. ruscifolia*

Cromatografía en columna de sílica gel

El extracto bioactivo se secó bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. El residuo seco se disolvió en una mezcla cloroformo-metanol (8:2 v/v) y se sembró en una columna empaquetada con sílica gel la cual se eluyó con un gradiente de cloroformo: metanol (8,0:2,7:3,6:4,1:1,0; v/v). Las fracciones recuperadas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) en sílica gel, utilizando acetato de etilo/ácido fórmico/agua (65:15:10, v/v/v) como fase móvil. Los cromatogramas se visualizaron bajo luz UV (254 nm y 365 nm), y se revelaron con *p*-anisaldehído. Las fracciones se combinaron en grupos teniendo en cuenta los patrones de bandas observados en los cromatogramas. Se evaluó la actividad antifúngica de los cromatogramas por

bioautografía de siembra puntual sobre *A. flavus* y *A. niger* (Choma y Grzelak, 2011).

Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF)

La fracción antifúngica obtenida por cromatografía en columna de sílica gel se sometió a cromatografía preparativa en capa fina (CPCF) utilizando como fase fija sílica gel 60 F₂₅₄ de 2 mm de espesor. Las restantes condiciones cromatográficas fueron similares a las descritas precedentemente para CCF. Las bandas correspondientes a los componentes de diferente relación de frente (Rf) obtenidas se rasparon del cromatograma y el polvo obtenido de cada una se colocó en tubos con metanol, se homogenizó con vórtex y se dejó reposar 24 horas. Luego se centrifugó y se rescató el sobrenadante. Este último se filtró a través de 280 mg de sílica gel empaquetados en una pipeta Pasteur.

Identificación de los constituyentes antifúngicos de *P. ruscifolia*

Se determinó la naturaleza química de los constituyentes aislados mediante CCF luego de revelarlos con los siguientes reactivos cromogénicos: vainillin/ac.sulfúrico (terpenos–derivados fenilpropanoides), Dragendorff (alcaloides), *p*-anisaldehído (compuestos triterpénicos y esteroidales) AgNO₃/NaOH (azúcares y ciclitoles).

La estructura de algunos de los compuestos obtenidos fueron identificados por experimentos de espectrometría de resonancia magnética nuclear monodimensionales (1H RMN,) y bidimensionales (1H-1H COSY, 1H-13C HSQC) y experimentos de espectrometría de masa (MS).

Toxicidad sobre *Artemia salina*

Se determinó la concentración letal media (CL₅₀) del extracto bioactivo de *P. ruscifolia* sobre *Artemia salina*. Se colocaron quistes de *A. salina* en una cuba con agua de mar (con 3,8 % de NaCl). La mitad de la cuba se expuso a la luz provista por una lámpara de 60 watts. Se incubó durante 48 horas a 27 °C para la eclosión de los quistes. El residuo seco del extracto metanólico se disolvió en agua de mar ensayándose un rango de concentraciones de 3000-87,5 µg/ml. Se incluyeron un control positivo de K₂Cr₂O₇, un control de solvente y un control de viabilidad en agua de mar. Se colocaron 10 larvas en cada una de los pocillos de la microplaca con las diferentes concentraciones a ensayar y se incubó durante 18 horas a 27 °C.

El recuento de nauplis sobrevivientes se hizo bajo una lupa con un aumento de 3x, calculándose los correspondientes porcentajes de inhibición, los cuales se utilizaron para calcular CL₅₀ mediante probit. El ensayo se realizó por triplicado.

Resultados

Rendimientos obtenidos para los extractos vegetales

Se obtuvieron 4 extractos a partir del material vegetal de *P. ruscifolia*. Los rendimientos obtenidos se informan en tabla 1. La mayor recuperación de materia seca se registró para el fMeOH de *P. ruscifolia* (11,33 ± 0,05).

Tabla 1.- Rendimientos obtenidos para los extractos de las especies investigadas

Solvente	Índice de Polaridad	Rendimiento % (p/p)
n-hexano (H)	0,1	8,0
Diclorometano (dCM)	3,1	4,1
Acetato de etilo (AE)	4,4	6,4
Metanol (MOH)	5,1	11,33

Se indica en la segunda columna desde la izquierda de la tabla la polaridad de los solventes usados en la extracción de los materiales vegetales.

Tabla 2.- Actividad antifúngica del extracto metanólico de las partes aéreas de *Prosopis ruscifolia* sobre diferentes cepas de *Aspergillus*

Microorganismo	Extracto metanólico de <i>P. ruscifolia</i>			
	DIM (μg)	Halo (mm)	CI ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
<i>niger</i>	200	2,13 \pm 0,004	297,7 \pm 1	> 2000
<i>nomius</i> VSC23	200	2,28 \pm 0,004	58,7 \pm 0,4	750 \pm 0,7
<i>nomius</i> 13137	200	3,23 \pm 0,004	89 \pm 1,2	1500 \pm 1,1
<i>flavus</i>	50	1,69 \pm 0,004	63 \pm 0,4	750 \pm 1,1
<i>parasiticus</i>	200	3,03 \pm 0,004	101,1 \pm 0,6	1500 \pm 0,6
<i>fumigatus</i>	200	2,13 \pm 0,004	69 \pm 0,3	1500 \pm 0,8

Se indican las dosis inhibitorias mínimas (DIM) y sus correspondientes halos, la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y la concentración inhibitoria mínima (CIM). Control positivo: ketoconazol.

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales

El fMeOH de *P. ruscifolia* fue el único de los 4 extractos investigados que generó halos de inhibición en bioautografías de siembra puntual en todas las cepas de *Aspergillus* ensayadas, con diámetros comprendidos entre 1,69 y 3,23 mm. Las DIM asociadas a esos halos se ubicaron en el intervalo de 50-200 μg . En el rango de concentraciones ensayado, el fMeOH inhibió el 50 % del crecimiento de todas las cepas de *Aspergillus* (CI₅₀ = 58,7.-2,97 $\mu\text{g/ml}$) y suprimió totalmente el crecimiento de 5 de las cepas (CIM 750-1500 $\mu\text{g/ml}$). Los valores de DIM, CI₅₀ y CIM registrados en los ensayos de microdilución se presentan en la tabla 2.

Aislamiento e identificación de los constituyentes antifúngicos de *P. ruscifolia*

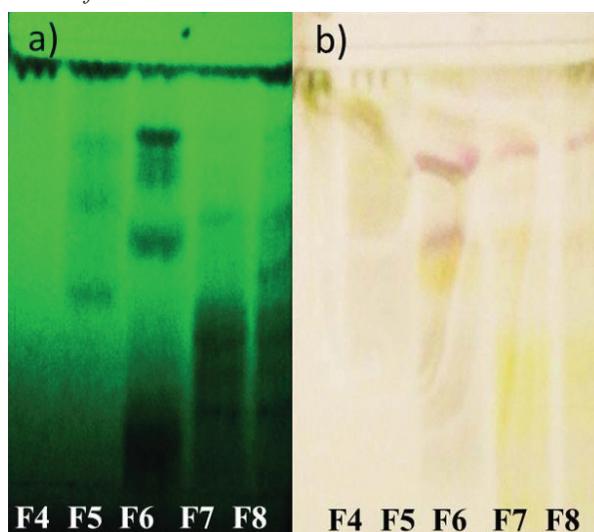
Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, se combinaron en 8 grupos, F1-F8 (Figura 3). F6 y F7 resultaron con actividad antifúngica mostrando F6 halos de mayor diámetro (6,2 mm para *A. flavus* y 6,1 mm para *A. niger*) que F7 (5,3 mm para *A. flavus* y 5,0 mm para *A. niger*) (Figura 4). El rendimiento de F6 fue de 7,48 \pm 0,03 % (p/p). La CCF de dicha fracción antifúngica, puso en evidencia la presencia de 5 bandas de diferentes Rfs (B1-B5) que fueron separados por cromatografía preparativa en capa fina. Los Rfs e identidad química de las bandas se muestran en la figura 5. El análisis por RMN permitió identificar la estructura de los

alcaloides como juliflorina (B2) y juliprosineno (B4) y el ciclitol (B5) como pinitol (Figura 6).

Toxicidad sobre *Artemia salina*

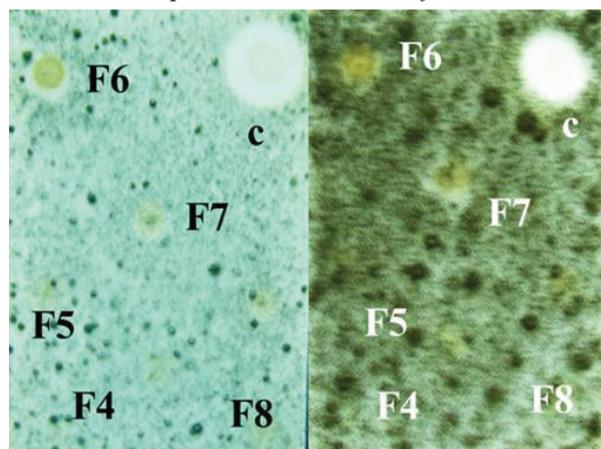
La CL₅₀ del fMeOH de *P. ruscifolia* sobre *A. salina* fue de 1829,26 $\mu\text{g/ml}$. La CI₅₀ fMeOH de *P. ruscifolia* es superior a la obtenida por preservantes alimenticios de uso comercial, lo cual significa una menor citotoxicidad que los preservantes (Tabla 3).

Figura 3.- Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de sílica gel del extracto metanólico de las partes aéreas de *P. ruscifolia*



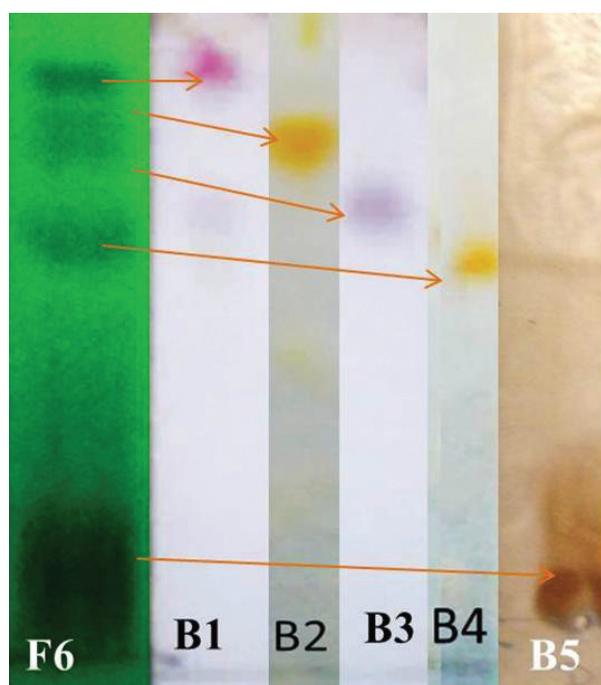
a: Observación bajo lámpara UV de 254 nm; **b:** Revelado con *p*-anisaldehído.

Figura 4.- Inhibición de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de sílica gel del extracto metanólico de las partes aéreas de *P. ruscifolia*



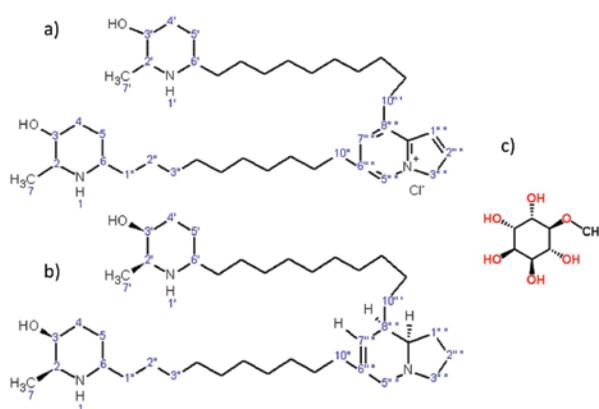
a: *Aspergillus flavus*; **b:** *Aspergillus niger*. Control (C) = ketoconazol.

Figura 5.- Cromatografía en capa fina (CCF) de los componentes obtenidos por cromatografía en CCFP de la fracción F6



F6: UV 254 nm. Revelado con *p*-anisaldehído (**B1**; Rf = 0,76) y (**B3**; Rf = 0,62). Revelado con Dragendorf (**B2**; Rf = 0,53) y (**B4**; Rf = 0,40). Revelado con AgNO₃/NaOH (**B5**; Rf = 0,20).

Figura 6.- Estructura de metabolitos los metabolitos obtenidos de la fracción F6



a: Juliflorina; **b:** Juliprosineno; **c:** Pinitol

Tabla 3.- Concentración letal 50 (CL₅₀) de los nauplii de *Artemia salina* para el extracto metanólico de *Prosopis ruscifolia* (preservantes alimenticios de uso comercial)

Muestra	CL ₅₀ (µg/ml)
Extracto metanólico de <i>P.ruscifolia</i>	1829,260 ± 0,2
Sorbato de Potasio	19,96 ± 0,3
Benzoato de sodio	< 50 ± 0,3
K ₂ Cr ₂ O ₇	25,884 ± 0,4

Se incluyeron como controles positivos benzoato de sodio, sorbato de potasio y K₂Cr₂O₇.

Discusión y Conclusiones

Si bien se conoce la actividad antibacteriana en los extractos de *P. ruscifolia*, (Salvat y col. 2004) no existen antecedentes sobre su actividad antifúngica. En nuestro trabajo se determinó que el fMeOH de *P. ruscifolia* presenta actividad antifúngica sobre todas las especies de *Aspergillus* ensayadas (DIM y CI50 50-200 µg/ml, 58,7-2,97 µg/ml, respectivamente), y suprimió totalmente el crecimiento de 5 de las cepas (CIM = 750-1500 µg/ml).

Se identificaron como posibles compuestos antifúngicos de *P. ruscifolia* dos alcaloides (juliflorina y juliprosineno), un ciclitol (pinitol) y una saponina triterpénica en la fracción bioactiva (F6) del fMeOH de *P. ruscifolia*. Juliflorina y juliprosineno fueron identificados por primera vez en *P. juliflora* y son

eficaces inhibidores de la acetilcolinesterasa en el tratamiento del Alzheimer (Choudhary y col., 2005). Existen reportes que indican su actividad antifúngica contra hongos de los géneros *Fusarium*, *Drechslera* y *Alternaria* (Raghavendra y col., 2009). Anteriormente se registró el uso efectivo del pinitol en el tratamiento de la diabetes (Sripathi y col., 2011), como larvicida (Chaubal y col., 2005) y también como antifúngico contra los hongos del género *Sphaerotheca* (Chen y Dai, 2014). No se encontraron antecedentes previos a este trabajo de actividad antifúngica frente a *Aspergillus* para ninguno de los componentes identificados.

La CL₅₀ determinada para el fMeOH de *P. ruscifolia* sobre *A. salina* fue superior a 1000 µg/ml, por lo que esta fracción carecería de citotoxicidad (Logarto Parra y col., 2001; Fernández Caliente y col., 2009).

El sorbato de potasio y el benzoato de sodio generaron valores de CL₅₀ entre 10 y 100 µg/ml, lo cual indica que ambos son más tóxicos que el fMeOH. Se está investigando la toxicidad de las sustancias identificadas y el efecto de estas sobre etapas del desarrollo fúngico que son críticas en el control de *Aspergillus*.

Los resultados sugieren que el fMeOH de *P. ruscifolia* y los metabolitos secundarios aislados de la fracción deben investigarse en mayor profundidad en cuanto a su utilidad en el control de las especies de *Aspergillus*.

Referencias bibliográficas

- Anderson, E.; Nehring, E.; Wichser, R. (1975). "Aflatoxin contamination of corn in the field". *Agric Food Chem* 23: 775-782.
- Astoreca, A.L., Dalcero, A.M., Fernández Pinto, V., Vaamonde, G. (2011). "A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section Flavi in poultry feeds". *International Journal of Food Microbiology* 146: 38-43.
- Cabrera, A. (1971). "Fitogeografía de la República Argentina". *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* XIV (1,2): 16.
- Cabrera, A.L.; Willink, A. (1980). *Biogeografía de América Latina*. 2ª edición corregida. Monografía 13. Serie de Biología. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington DC. EEUU: 120.
- Chaubal, R.; Pawar, P.V.; Hebbalkar, G.D.; Tungikar, V.B.; Puranik, V.G.; Deshpande, V.H.; Deshpande, N.R. (2005). "Larvicidal activity of Acacia nilotica extracts and isolation of D-pinitol - A bioactive carbohydrate". *Chemistry and Biodiversity* 2(5): 684-688.
- Chen, J.; Dai, G.H. (2014). "Effect of D-pinitol isolated and identified from Robinia pseudoacacia against cucumber powdery mildew". *Scientia Horticulturae* 176: 38-44.
- Choma, I.; Grzelak, E.M. (2011). "Bioautography detection in thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A* 1218: 2684-2691.
- Choudhary, M.I.; Nawaz, S.A.; Zaheer-Ul-Haq Azim, M.K.; Ghayur, M.N.; Lodhi, M.A.; Ahmad, V.U. (2005). "Juliflorine: A potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332(4): 1171-1179.
- Fandos, C.; Carreras Baldrés, J.; Scandagliaris, P.; Soria, F.; Devani, M.; Gamboa D. (2017). "Campaña de soja y maíz 2016/2017 en Tucumán: superficie cultivada y comparación con campañas precedentes". *Reporte Agroindustrial* 136: 3-12.
- Fernández-Calientes, A.; Mendiola Martínez, J.; Monzote Fidalgo, L.; García Parra, M.; Sariego Ramos, I.; Acuña Rodríguez, D.; y col. (2009). "Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L.". *Rev. Cubana Med. Trop.* 61:254-258.
- Freyre, M.; Astrada, E.; Blasco C.; Baigorria, C.; Rozycki, V.; Bernardi C. (2003). "Valores nutricionales de frutos de vinal (*Prosopis ruscifolia*): Consumo humano y animal". *Cienc. Tecnol. Aliment.* 4(1): 41-46.
- Hurrell, A.J.; Ulibarri, E.A., Puentes, J.P.; Buet Costantino, F.; Arenas, P.M.; Pochettino, M.L. (2011). "Leguminosas medicinales y alimenticias utilizadas en la conurbación Buenos Aires-La Plata, Argentina". *Blacpma* 10(5): 443-455.
- Logarto Parra, A.; Silva Yhebra, R.; Guerra Sardiñas, I.; Iglesias Buena, L. (2001). "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts". *Phytomedicine* 8(5): 395-400.

- Medina, A., Lambert, R. J. W., & Magan, N. (2012). "Rapid through put analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: A tool for screening antifungal compounds". *Fungal Biology* 116(1): 161–169.
- Mitchell, N.J.; Bowers, E.; Hurburgh, C; Wu, F. (2016). "Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination". *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 33(3): 540-550.
- Raghavendra, M.P.; Satish, S.; Raveesha, K.A. (2009). "Alkaloid extracts of *Prosopis juliflora* (Sw .) DC . (Mimosaceae) against *Alternaria alternata*". *Journal of Biopesticide* 2(1): 56-59.
- Rusul, G.; Marth, E.H. (1988). "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium at different pH values and with or without pimaricin". *Z. Lebensm Unters Forsch.* 187(5): 436-439.
- USDA Grain report: 2016 Grain and feed annual Argentina. (2016). https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Grain%20and%20Feed%20Annual_Buenos%20Aires_Argentina_4-1-2016.pdf
- Quiroga, E.N.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M. A. (2001). "Screening antifungal activities of selected medicinal plants". *Journal of Ethnopharmacology* 74(1): 89-96.
- Rondina, R.V.D.; Bandoni, A.L.; Coussio J.D. (2008). "Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica" *Dominguezia* 24(1): 47-69.
- Salvat, A.; Antonacci, L.; Fortunato, R.H.; Suarez, E.Y.; Godoy, H.M. (2004). "Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina". *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 11(2–3): 230-234.
- Scarpa, G.F. (2004). "Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco". *Journal of Ethnopharmacology* 91(1): 115-135.
- Sripathi, S.K.; Poongothai, G.; Lalitha, P. (2011). "Anti diabetic agent Pinitol from the leaves of *Pisonia grandis* (R. Br.)". *Journal of Natural Remedies*, 11(1): 39-43.
- Zain, M.E. (2011). "Impact of mycotoxins on humans and animals". *J Saudi Chem Soc.* 15: 129-144.