



## EFFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS DE *Vitex mollis* Kunth CONTRA BACTERIAS Y ESPECIES DE *Fusarium* DE IMPORTANCIA HUMANA Y AGRÍCOLA

### INHIBITORY EFFECT OF *Vitex mollis* Kunth EXTRACTS AGAINST BACTERIA AND *Fusarium* SPECIES OF HUMAN AND AGRICULTURAL IMPORTANCE

Alberto J. Valencia-Botín<sup>1</sup>, Melesio Gutiérrez-Lomelí<sup>1</sup>, Juan A. Morales-Del-Rio<sup>1</sup>, Pedro J. Guerrero-Medina<sup>1</sup>, Miguel A. Robles-García<sup>1</sup>, Saúl Ruiz-Cruz<sup>2</sup>, Francisco J. Wong-Corral<sup>3</sup>, Jesús Borboa-Flores<sup>3</sup>, Edgar O. Rueda-Puente<sup>3</sup> y Carmen L. Del-Toro-Sánchez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guadalajara, Ocotlán, Jalisco, México. <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregón, Sonora, México. <sup>3</sup>Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

\*Autor para correspondencia (carmen.deltoro@unison.mx)

#### RESUMEN

Actualmente existe la necesidad de hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos y al uso indiscriminado de fungicidas químicos en la agricultura. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de extractos acuosos, metanólicos, acetónicos y hexánicos de hoja y tallo de *Vitex mollis* Kunth (Lamiaceae) contra diferentes bacterias (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*) y especies del hongo *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. taphrinum* y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) de importancia en la salud y en la agricultura, así como determinar su composición química general. Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de todos los extractos por la técnica de microdilución, excepto del hexánico, que no presentó inhibición en las bacterias estudiadas. *S. enterica* fue la bacteria que mostró mayor sensibilidad al extracto metanólico de tallo (CIM = 28 µg mL<sup>-1</sup>), le siguieron *M. luteus* (CIM = 32 µg mL<sup>-1</sup>), *S. aureus* (CIM = 75 µg mL<sup>-1</sup>) y *E. coli* (CIM = 80 µg mL<sup>-1</sup>). Los extractos metanólicos y acuosos de tallo presentaron mayor porcentaje de inhibición contra los diferentes tipos de *Fusarium* evaluados por el método de dilución en agar. Los extractos de *V. mollis* inhibieron a *F. verticillioides* entre 62 y 91 % con 120 µg mL<sup>-1</sup> de extracto. El orden de las especies de hongos inhibidos por los extractos fue: *F. verticillioides* > *F. oxysporum* > *F. taphrinum* > *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. La composición química de las especies se determinó mediante pruebas para fenoles, taninos, flavonoides, triterpenos, alcaloides, cumarinas y saponinas. Ninguno de los extractos presentó alcaloides y saponinas. Los fenoles (37.1 mg EAG/g muestra seca) y flavonoides (26.8 mg EQ/g muestra seca) fueron los compuestos mayoritarios en los extractos metanólicos y acuosos. En conclusión, se requieren cantidades muy pequeñas de extracto para la inhibición de bacterias y de *Fusarium*; por lo tanto, *V. mollis* puede ser considerada una fuente de metabolitos para este fin y en la agricultura como control alternativo dentro de un manejo integrado de enfermedades.

**Palabras clave:** Actividad antimicrobiana, extractos, *Vitex mollis*, bacterias, *Fusarium*.

#### SUMMARY

Currently, antibiotic resistance and indiscriminate use of chemical fungicides in agriculture need to be addressed. This research evaluated the inhibitory effect of aqueous, methanolic, acetonnic and hexanic extracts from leaf and stem of *Vitex mollis* Kunth (Lamiaceae) against several bacteria (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus*) and species of *Fusarium* fungus (*F. verticillioides*, *F. oxysporum*

*rum*, *F. taphrinum* and *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*), and determined their general chemical composition. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the micro-dilution technique for all extracts, except for the hexanic extract which did not show inhibition on the bacteria studied. *S. enterica* was the bacterium that showed the highest sensitivity to the methanolic extracts from stem (MIC = 28 µg mL<sup>-1</sup>), followed by *M. luteus* (MIC = 32 µg mL<sup>-1</sup>), *S. aureus* (MIC = 75 µg mL<sup>-1</sup>) and *E. coli* (MIC = 80 µg mL<sup>-1</sup>). The methanolic and aqueous extracts from the stem presented higher percentage of inhibition against different types of *Fusarium* evaluated by the agar dilution method. Extracts of *V. mollis* inhibited *F. verticillioides* between 62 and 91 % with 120 µg mL<sup>-1</sup> of extract. The order of fungi species as inhibited by the extracts was *F. verticillioides* > *F. oxysporum* > *F. taphrinum* > *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. The chemical composition of the species was determined by tests for phenols, tannins, flavonoids, triterpenes, alkaloids, coumarins and saponins. None of the extracts presented alkaloids and saponins. Phenols (37.1 mg EAG/g dry sample) and flavonoids (26.8 mg EQ/g dry sample) were the major compounds in the methanolic and aqueous extracts. In conclusion, small amounts of extracts are required to inhibit bacteria and *Fusarium*; hence, *V. mollis* can be considered a source of metabolites for this purpose and in agriculture as an alternative control within an integrated management of diseases.

**Index words:** Antimicrobial activity, extracts, *Vitex mollis*, bacteria, *Fusarium*.

#### INTRODUCCIÓN

Diferentes especies botánicas muestran acción reguladora sobre un gran número de plagas y enfermedades que perjudican a la agricultura y a la salud humana. Actualmente existe la necesidad de hacer frente al problema de la resistencia a los antibióticos y a la disminución del uso de fungicidas químicos en la agricultura, que ha llevado a los investigadores del área de alimentos, farmacéutica y agricultura a buscar nuevas fuentes, principalmente de origen vegetal, que contengan sustancias con actividad antimicrobiana (Medina et al., 2017; Sharifi-Rad et al., 2017) que ayuden a combatir enfermedades tanto en el ser humano como en la agricultura, mostrando grandes ventajas como eficacia, seguridad, bajos costos y disminución de la contaminación ambiental (Thombre et al., 2013).

Algunas bacterias como *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* pueden ser parte de la contaminación de los alimentos o del agua, y al ser consumidos por el ser humano ocasionan enfermedades que podrían causar hasta la muerte. Según estudios publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que cada año enferman en el mundo 600 millones de personas –aproximadamente 1 de cada 10 habitantes– por ingerir alimentos contaminados y que 420 mil mueren por esta misma causa. Las infecciones diarreicas, que son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, hacen enfermar cada año a 550 millones de personas y provocan 230 mil muertes. Los principales agentes causales involucrados en casos de hospitalización son *Salmonella* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (OMS, 2017). En muchos países, sin embargo, se desconoce la incidencia exacta de las enfermedades ocasionadas por la ingestión de alimentos u otros causales, debido en parte a limitaciones del servicio de información epidemiológica y a dificultades por parte de los laboratorios para identificar los agentes causales.

La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (OMS, 2018; Solomon et al., 2002). *M. luteus* puede comportarse como patógeno oportunista en pacientes immunodeprimidos; puede causar neumonía, meningitis, artritis séptica, bacteremia, sepsis relacionada con cateterismo y peritonitis vinculada con diálisis peritoneal ambulatoria continua (Winn et al., 2006). La salmonelosis es un grupo de infecciones producidas por bacilos del género *Salmonella*. Se asocia a síndromes febriles y manifestaciones gastrointestinales o sistémicas, donde gran parte es ocasionada por *S. enterica* (OMS, 2017). *S. aureus* forma comúnmente parte de la microflora humana, puede producir enfermedad mediante dos mecanismos, uno se basa en proliferar y propagarse por los tejidos, y el otro en su capacidad para producir toxinas y enzimas celulares (Lowy, 1998).

Las especies del hongo fitopatógeno *Fusarium* son conocidas como patógenos de plantas y alimentos; sin embargo, también pueden causar infecciones oportunistas en el hombre (Benadof, 2010). Las especies de *Fusarium* se encuentran en los cultivos antes de la cosecha y también persisten en los productos almacenados, si la actividad del agua lo permite se desarrollarán causando alteraciones y pueden producir micotoxinas. En la agricultura han llegado a ser fuente de grandes pérdidas económicas puesto que generalmente pueden afectar a los cultivos contaminándolos, marchitándolos, produciendo cambios de color, pudriéndolos o induciendo necrosis vasculares; por ejemplo, *F. verticillioides* afecta al maíz (*Zea mays*), *F.*

*oxysporum* f.sp. *lycopersici* daña al tomate (*Solanum lycopersicum*), *F. tapsinum* ataca al sorgo (*Sorghum bicolor*) y *F. oxysporum* afecta al maguey tequilero (*Agave tequilana* var. azul Weber) (Carrillo-Fasio et al., 2003; Pharand et al., 2002). Por lo tanto, es necesario buscar nuevas alternativas, sobre todo de origen orgánico o alternativo, para controlar, prevenir o combatir este tipo de microorganismos y consecuentemente, evitar posibles epidemias tanto para los cultivos como para el hombre.

Bajo este contexto, las plantas de la familia Lamiaceae, a la cual pertenece el género *Vitex*, son una fuente importante de moléculas bioactivas como glucósidos iridoides, flavonoides, derivados de diterpenoides, fitoesteroides, que han mostrado tener propiedades antimicrobianas (Medina et al., 2017; Meena et al., 2010; Sharifi-Rad et al., 2017; Sharma et al., 2017). Dentro de este género se encuentra la planta nativa de México *Vitex mollis* Kunth (Lamiaceae), comúnmente conocida como uvalamo. La mayoría de los estudios relacionados con esta planta han sido enfocados a la corteza del árbol o al fruto de uvalamo (Dimayuga et al., 1998). De acuerdo con Meena et al. (2011), algunas culturas indígenas de México consumían la fruta de *V. mollis*, así como otras partes de la planta, para tratar fiebre, diarrea, disentería y cólicos abdominales; sin embargo, las hojas y los tallos tienen escasos estudios, a pesar de que son los comúnmente utilizados para el tratamiento de diversos padecimientos como diarrea y disentería (Osuna et al., 2005), como antiespasmódico (Osuna et al., 2005), antiprotozoario (Tapia-Pérez et al., 2003), antioxidante (Cuevas-Juárez et al., 2014; Ruiz-Terán et al., 2008) y antiinflamatorio (Medina et al., 2017; Meena et al., 2011; Morales-Del Río et al., 2015; Ramírez-Cisneros et al., 2015); además, se ha sugerido la uvalama para el tratamiento de picaduras de escorpión y para aliviar los dolores menstruales (Meena et al., 2011). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto inhibitorio de extractos de *V. mollis* contra diferentes bacterias y especies de *Fusarium* de importancia en la salud humana y en la agricultura, así como determinar la composición química general de los extractos de las hojas y los tallos de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y microbiológico

Las hojas y tallos de *V. mollis* Kunth se colectaron en enero de 2015 en el estado de Jalisco, México en las coordenadas 20° 21.6' N y 102° 48' O, a una altitud de 1800 m. La identificación taxonómica de la planta se realizó en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara con número de registro 192,156. Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus*

*luteus* (ATCC 9341), *Salmonella enterica* (ATCC 9270) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6638). Las diferentes especies de *Fusarium* pertenecen a la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario de la Ciénega de la Universidad de Guadalajara. Se utilizaron cuatro especies: *F. verticillioides* aislado de maíz, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* aislado de tomate, *F. taphrinum* aislado de sorgo y *F. oxysporum* aislado de agave tequilero.

### Obtención de extractos

Las hojas y los tallos recolectados se secaron en estufa a 45 °C durante 48 h para posteriormente ser pulverizados. Se pesaron 4 g de cada una de las muestras y se adicionaron 15 mL de solvente (agua, metanol, acetona o hexano) homogeneizando por 20 s (IKA, Ultra-Turrax®, T-25 DS1, China). Despues de sonicar por 20 min, las muestras se centrifugaron a 1753 × g durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se filtraron y al sedimento obtenido se le realizó una segunda extracción a la que se le adicionaron 30 mL de solvente (agua, metanol, acetona o hexano) repitiendo los pasos desde la homogeneización. Una vez reunidos los sobrenadantes de los extractos, se procedió a la concentración de éstos en un rotavapor (Heidolph, 4003 VAC Senso T, Schwabach, Alemania); posteriormente, se resuspendieron en sus respectivos solventes para tener una concentración final homogénea en cada uno de ellos de 30 mg mL<sup>-1</sup> (Morales-Del Río et al., 2015).

### Análisis fitoquímico

El análisis fitoquímico se realizó a los extractos empleando técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de fenoles y taninos (ensayo de cloruro férrico), flavonoides (ensayo de Shinoda), saponinas (prueba de espuma), alcaloides (ensayo de Dragendorff), triterpenos (ensayo de Liebermann-Buchard) y cumarinas (ensayo de Baljet) (Sánchez et al., 2010).

### Cuantificación de fenoles totales

Se realizó por la técnica de Folin Ciocalteu (Mullen et al., 2007). Se tomaron 50 µL de extracto y se agregaron 3 mL de agua desionizada y 250 µL de Folin 1 N. Se dejó reposar por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 750 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % y 950 µL de agua desionizada. Se dejó reposar por 30 min y se determinó la absorbancia a 765 nm. Se realizó una curva con ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca (mg EAG/g muestra seca).

### Cuantificación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se determinaron por el método reportado en Maksimović et al. (2005). Se tomaron aliquotas de 0.1 mL de extracto y fueron adicionadas a 1.4 mL de agua desionizada y 0.5 mL del reactivo de flavonoides (133 mg de tricloruro de aluminio, 400 mg de acetato de sodio en 100 mL de solvente constituido por 140 mL metanol, 50 mL agua y 10 mL ácido acético). Después de 30 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 415 nm. Se realizó una curva utilizando el estándar quercetina. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por g de muestra seca (mg EQ/g muestra seca).

### Actividad antibacteriana

Se utilizó la técnica de microdilución con la obtención de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Se preparó el inóculo mediante reactivación de las cepas con solución de caldo Muller Hilton (CMH) y se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se ajustó cada cepa a 1 × 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup> y se midió su densidad óptica a 600 nm con base en la escala 1 de McFarland (McFaddin, 2000). En microplacas de 96 pozos se hicieron microdiluciones de los extractos esterilizados a través de un filtro Millipore (0.45 µm); posteriormente, se adicionaron 100 µL del microorganismo en todos los pozos y se obtuvo un volumen final en cada uno de 200 µL, con concentraciones finales de extracto desde 30 × 10<sup>3</sup> hasta 3 µg mL<sup>-1</sup>. Transcurrido el tiempo de incubación se leyeron las placas a 600 nm para determinar la susceptibilidad del microorganismo, todo esto por triplicado (Peterson y Shanholzer, 1992). La CIM se determinó identificando la dilución que no presentó crecimiento microbiano en comparación con el control (caldo + microorganismo). Se consideraron también otros controles como caldo puro, caldo + solvente y caldo + extractos.

### Actividad antifúngica

Se determinó la actividad antifúngica mediante el método de dilución en agar (Del Toro-Sánchez et al., 2010). Se prepararon medios de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA 39 g L<sup>-1</sup>) en cajas de Petri a las cuales se adicionaron los respectivos extractos a cuatro concentraciones (0, 30, 60, 90 y 120 µg mL<sup>-1</sup>). Antes de inocular las especies de *Fusarium* en las cajas con extractos, éstos se sometieron a un crecimiento previo de 48 a 72 h; posteriormente, se adicionaron 5 mL de agua bidestilada estéril y se raspó la superficie del cultivo fúngico sin rayar el medio sólido. Después de la homogenización, se tomaron 20 µL de suspensión micelial y se depositaron suavemente en el centro de la caja de Petri, se dejó secar 10 min en una campana de flujo laminar de bioseguridad clase IIA y se incubó durante 4 d a 28 ± 1 °C. Se tomaron como controles cajas de Petri con medio

PDA inoculadas con el hongo sin extracto y con los solventes. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición obtenido por la comparación de los diámetros miceliales (medidos con un Vernier) de los controles con las muestras según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Halo de crecimiento control} - \text{Halo de crecimiento muestra}}{\text{Halo de crecimiento control}} \times 100$$

Adicionalmente, con los datos obtenidos se graficaron curvas de concentración contra porcentaje de inhibición y se calculó la concentración fungicida media ( $CF_{50}$ ).

### Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado fue con tres repeticiones con diseño completamente al azar y arreglo multifactorial y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba DMS, (Diferencia Mínima Significativa) ( $P \leq 0.05$ ) mediante el programa Statgraphics Centurión XV v.15.2.06.

## RESULTADOS

### Análisis fitoquímico

Los fenoles o taninos, así como los flavonoides, fueron los compuestos más abundantes en los extractos acuosos y metanólicos de hoja y tallo (Cuadro 1), estos resultados coinciden con los obtenidos por Medina *et al.* (2017), quienes reportaron que los compuestos mayoritarios presentes en extractos metánolicos de *V. mollis* corresponden a fenoles. Los resultados sugieren que la hoja presenta fenoles o taninos hidrolizables, mientras que los de tallo tienen tanto hidrolizables como del tipo catecol. Las cumarinas sólo se identificaron en los extractos acuosos y metanólicos de tallos. Las hidroxicumarinas sencillas son solubles en agua y en soluciones alcohólicas. Las pirano y furanocumarinas son solubles en los mismos solventes, pero también en disolventes orgánicos no polares; por lo tanto, de acuerdo con los resultados obtenidos, los

extractos acuosos y metanólicos presentan cumarinas del tipo hidroxicumarinas, ya que en el extracto apolar (hexánico) no se detectó la presencia de estos compuestos. Los triterpenos fueron los compuestos mayoritarios detectados en los extractos hexánicos, principalmente en los de tallo. No se lograron detectar saponinas y alcaloides en ningún extracto de las diferentes partes de la planta.

Con respecto a la cuantificación de fenoles totales, los extractos metanólicos y acuosos tanto de hoja ( $37.91 \pm 1.56$  y  $20.91 \pm 0.86$  mg EAG/g muestra seca, respectivamente) como de tallo ( $33.46 \pm 0.77$  y  $29.46 \pm 0.99$  mg EAG/g muestra seca, respectivamente) presentaron la mayor cantidad (Figura 1). Un comportamiento similar se observó en los flavonoides en los extractos metanólicos y acuosos de hoja ( $21.67 \pm 1.23$  y  $12.47 \pm 1.11$  mg EQ/g muestra seca, respectivamente) y tallo ( $26.83 \pm 0.51$  y  $22.21 \pm 0.65$  mg EQ/g muestra seca, respectivamente), donde los extractos del tallo fueron los que sobresalieron con este tipo de compuestos. Los flavonoides forman parte de los fenoles; por lo tanto, estos resultados demuestran que la mayor cantidad de los fenoles son del tipo flavonóide, ya que la cantidad de flavonoides es mayor al 50 % en todas las muestras con respecto a los fenoles, excepto en los extractos hexánicos (Figura 1).

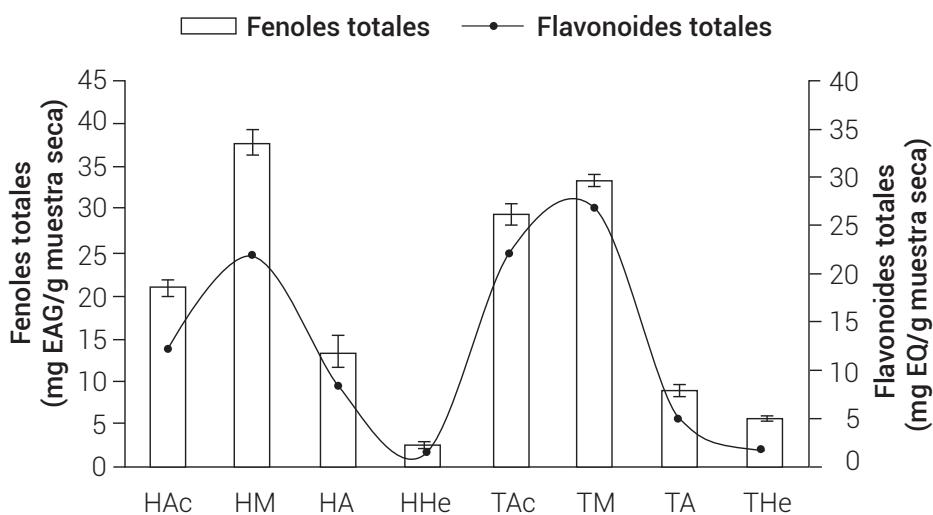
### Actividad antibacteriana

De los cuatro tipos de extractos evaluados (acuoso, metanólico, acetónico y hexánico), los extractos hexánicos no presentaron inhibición en los microorganismos analizados (*E. coli*, *M. luteus*, *S. enterica* y *S. aureus*). Los extractos metanólicos presentaron mayor inhibición contra las bacterias estudiadas, le siguieron los acetónicos y posteriormente los acuosos (Cuadro 2); por lo tanto, los diferentes extractos obtenidos presentaron diferencias significativas entre ellos ( $P = 0.00023$ ). Por otra parte, los tallos de *V. mollis* fueron más efectivos que las hojas, por lo que el factor tejido de la planta fue

**Cuadro 1. Análisis fitoquímico de los extractos de hoja y tallo de *Vitex mollis*.**

	Extractos de hoja				Extractos de tallo			
	Acuoso	Metanólico	Acetónico	Hexánico	Acuoso	Metanólico	Acetónico	Hexánico
Fenoles y/o taninos	++ <sup>a/b</sup>	+++ <sup>a/b</sup>	++ <sup>a/b</sup>	+ <sup>a/b</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
Flavonoides	+++	+++	+	+	+++	+++	++	+
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	-	-	+	++	-	-	+	+++
Cumarinas	-	-	-	-	+	+	-	-

a) Fenoles o taninos hidrolizables. b) Fenoles o taninos tipo catecol. a/b) Ambos tipos de fenoles y taninos. Presencia abundante [++], presencia moderada [++], presencia leve [+], ausencia [-].



**Figura 1. Fenoles y flavonoides totales de los extractos acuoso (Ac), metanólico (M), acetónico (A) y hexánico (He), de las hojas (H) y los tallos (T) de *Vitex mollis*. Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.**

significativo ( $P = 0.0082$ ) demostrando por la prueba DMS que los extractos de los tallos inhiben el crecimiento bacteriano con mayor actividad.

*Salmonella enterica* fue la bacteria más inhibida por el extracto metanólico de tallo ( $CIM = 28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), le siguieron *M. luteus* ( $CIM = 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *S. aureus* ( $CIM = 75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *E. coli* ( $CIM = 80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Cuadro 2). Kuete (2010) clasifica la potencia de las CIM de los extractos de plantas en significativo ( $< 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), moderado ( $100 < CIM \leq 625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y débil ( $> 625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); por lo tanto, al considerar esta clasificación, los extractos metanólicos tanto de tallo como de hoja son significativos para todos los microorganismos estudiados. Los extractos acetónicos tuvieron potencia inhibitoria moderada para todas las bacterias, los extractos acuosos tienen potencia moderada para *M. luteus*, *S. enterica* y *S. aureus*, mientras que para *E. coli* fue débil.

#### Actividad antifúngica

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que los extractos que presentaron mejor porcentaje de inhibición contra las diferentes especies de *Fusarium* fueron los metanólicos y acuosos, le siguieron los acetónicos y en menor medida los hexánicos. De forma general, la concentración más alta estudiada ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) presentó mayor inhibición en la mayoría de las especies de *Fusarium* analizadas. La parte de la planta que mejor efecto inhibitorio presentó fue la de tallo, y el *Fusarium* más afectado frente a los extractos de *V. mollis* fue *F. verticilliodes* aislado de maíz.

El efecto inhibitorio en *F. verticilliodes* de extractos de hoja y tallo de *V. mollis* se puede observar en las Figuras 2 y 3, con aproximadamente 62 y 91 % de inhibición con el extracto metanólico, respectivamente. No se observaron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre las concentraciones de 90 y  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  en los extractos metanólicos de hoja (Figura 2). En los de tallo, las concentraciones 60 y  $90 \mu\text{g mL}^{-1}$  no presentaron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) (Figura 3). Se observa el mismo comportamiento en los extractos acuosos que inhiben tan solo 7 y 12 % menos en hojas y tallos, respectivamente, en comparación con los metanólicos.

*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* presentó 39 y 51 % de inhibición de hoja (Figura 2) y tallo (Figura 3), respectivamente; en los extractos metanólicos no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones intermedias de las hojas, mientras que en las de tallo fueron las dos concentraciones mayores las que no tienen diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ). En comparación con los extractos metanólicos, los extractos acuosos presentaron 19 y 23 % menos inhibición en hoja y tallo, respectivamente. En este último solvente, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de 60, 90 y  $120 \mu\text{g mL}^{-1}$  en los extractos de hoja ( $P \geq 0.05$ ); sin embargo, todas las concentraciones analizadas de tallo fueron significativamente diferentes entre ellas ( $P \leq 0.05$ ), mostrando la mejor actividad inhibitoria la de mayor concentración.

Por otra parte, *F. tapsinum* fue otro de los hongos que se inhibió en menor proporción por los extractos de *V. mollis*, junto con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Los extractos metanólicos de hoja presentaron aproximadamente 38 %

**Cuadro 2. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos acuosos, metanólicos, acetónicos y hexánicos de *Vitex mollis* contra *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*.**

Bacteria	Solvente	Parte de la planta	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Escherichia coli</i>	Aqua	Hoja	820
	Aqua	Tallo	770
	Metanol	Hoja	95
	Metanol	Tallo	80
	Acetona	Hoja	130
	Acetona	Tallo	100
	Hexano	Hoja	ND
	Hexano	Tallo	ND
	Aqua	Hoja	410
	Aqua	Tallo	315
<i>Micrococcus luteus</i>	Metanol	Hoja	75
	Metanol	Tallo	32
	Acetona	Hoja	160
	Acetona	Tallo	110
	Hexano	Hoja	ND
	Hexano	Tallo	ND
<i>Salmonella enterica</i>	Aqua	Hoja	220
	Aqua	Tallo	180
	Metanol	Hoja	60
	Metanol	Tallo	28
	Acetona	Hoja	145
	Acetona	Tallo	115
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hexano	Hoja	ND
	Hexano	Tallo	ND
	Aqua	Hoja	610
	Aqua	Tallo	555
	Metanol	Hoja	95
	Metanol	Tallo	75

ND: no detectado.

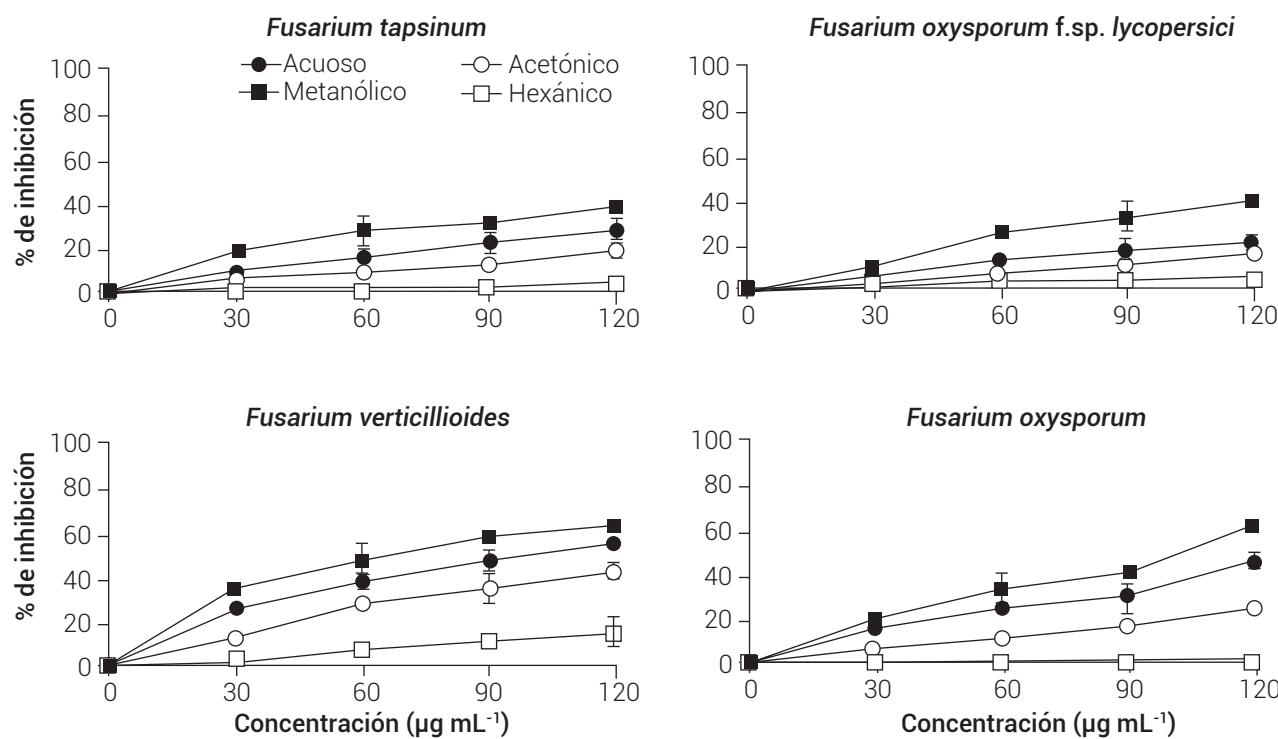


Figura 2. Porcentajes de inhibición de los extractos de hoja de *Vitex mollis* sobre las diferentes especies de *Fusarium*. Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

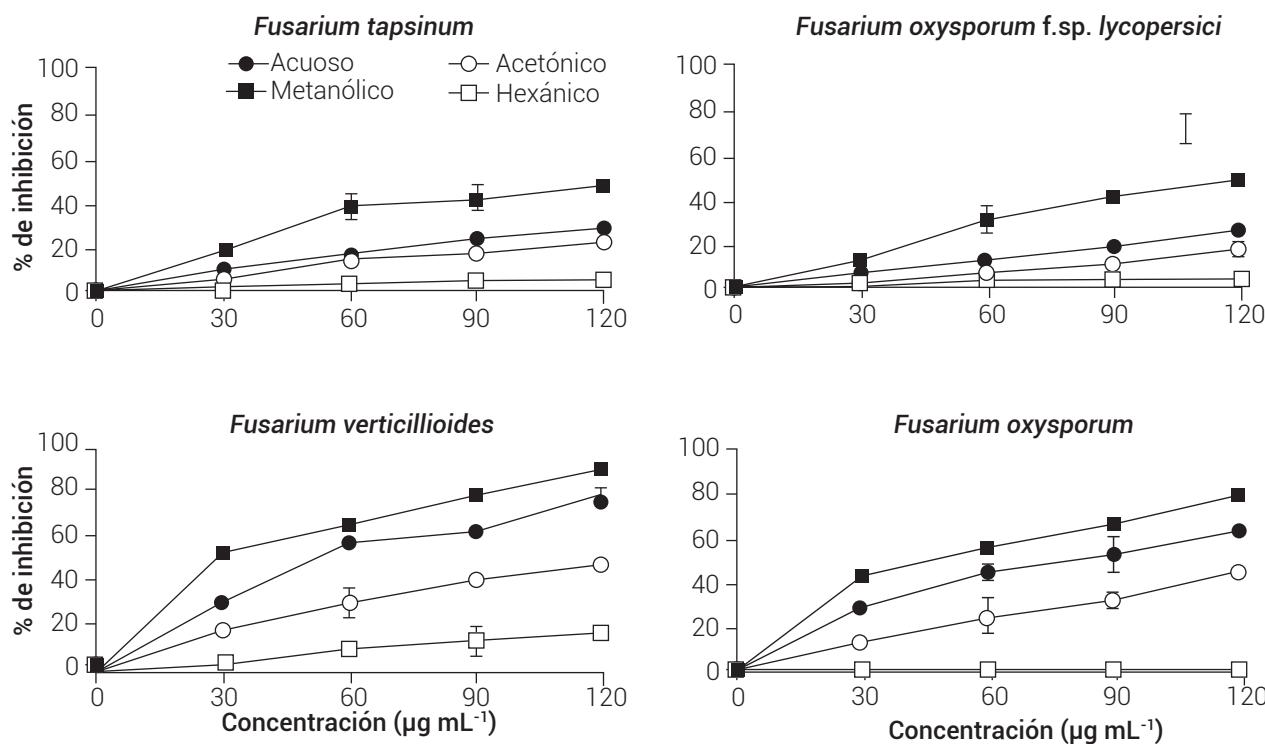


Figura 3. Porcentajes de inhibición de los extractos de tallo de *Vitex mollis* sobre las diferentes especies de *Fusarium*. Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

de inhibición (Figura 2) y los de tallo 55 % (Figura 3), no hubo diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) con respecto a *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. El mismo comportamiento fue observado en los extractos acuosos en ambos hongos.

Finalmente, *F. oxysporum* fue el segundo hongo más inhibido por los extractos de *V. mollis*, presentando 63 y 80 % de inhibición con los extractos metanólicos de hoja (Figura 2) y tallo, respectivamente (Figura 3). En este mismo solvente todas las concentraciones estudiadas mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en los extractos de ambas partes de la planta, la concentración más alta fue la que produjo mejor porcentaje de inhibición. Los extractos acuosos de hoja presentaron 17 % menos inhibición en comparación con los metanólicos, mientras que se observó 15 % menos en tallos.

El orden de los hongos inhibidos por la concentración más alta de los extractos, tanto metanólicos como acuosos de tallo de *V. mollis* fue: *F. verticillioides* > *F. oxysporum* > *F. tapsinum* > *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*; sin embargo, solo se logró determinar la concentración fungica media ( $CF_{50}$ ) de *F. verticillioides* (Cuadro 3) en hoja y tallo de los extractos acuosos y metanólicos, así como los de tallo en estos mismos solventes en *F. oxysporum*. De acuerdo con los resultados, el extracto que obtuvo la mejor actividad antifúngica fue el metanólico de tallos ( $29.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

## DISCUSIÓN

Según algunas investigaciones, el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas se debe a ciertos compuestos, entre ellos los fenólicos (Medina et al., 2017). La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos ha sido ampliamente investigada en una gran variedad de microorganismos (Delgado-Vargas et al., 2010). Los fenoles del tipo flavonoide como flavonoles y flavan-3-ol, y taninos, son los polifenoles a los que se les ha atribuido mayor actividad antimicrobiana debido a que son capaces de presentar

diversos mecanismos como suprimir factores de virulencia microbiana como la inhibición de formación de biopelículas, reducción de la adhesión de los ligandos receptores, atacan las paredes y membranas celulares, inactivan enzimas esenciales, intervienen en el sistema de síntesis de proteínas y del material genético y neutralizan toxinas, entre otros (Aron y Kennedy, 2008; Daglia, 2012).

La deducción anterior concuerda con los resultados de Rodriguez-Maturino et al. (2015) quienes atribuyen a los compuestos fenólicos la actividad antifúngica en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* mediante extractos fenólicos del chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriuscolum*). Lo anterior coincide en que los extractos metanólicos de *V. mollis* en el presente estudio tuvieron la mayor concentración de flavonoides y fueron los que dieron la mejor respuesta inhibitoria contra las bacterias y hongos estudiados, también coincide que en los extractos hexánicos la cantidad de flavonoides fue mínima teniendo muy baja inhibición contra los microorganismos; sin embargo, a pesar de este comportamiento, al ser extractos crudos los utilizados en este estudio, no se puede afirmar que estos compuestos sean los responsables de dicha actividad hasta realizar estudios más específicos con muestras más puras.

Son escasos los estudios antibacterianos realizados con *V. mollis*; sin embargo, Delgado-Vargas et al. (2010) utilizaron extractos del fruto con diferentes solventes contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas *E. coli* y *S. aureus*. La CIM más efectiva obtenida en el estudio anterior fue de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Recientemente Medina et al. (2017) evaluaron extractos metanólicos de hojas de *V. mollis* contra *S. aureus*, la concentración más efectiva fue de  $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En ambos estudios las CIMs obtenidas fueron mayores a las del presente estudio ( $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en los mismos microorganismos, lo que indica una gran diferencia en potencia de inhibición, dependiendo de la parte de la planta administrada. Otros estudios señalan que el

**Cuadro 3. Concentración fungicida media ( $CF_{50}$ ) de los extractos de *Vitex mollis* sobre hongos filamentosos del género *Fusarium*.**

Microorganismo	Acuoso		Metanólico		Acetónico		Hexánico	
	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo
<i>F. verticillioides</i>	110.01	51.3	40.5	29.8	ND	ND	ND	ND
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	ND	ND	ND	117.8	ND	ND	ND	ND
<i>F. tapsinum</i>	ND	ND	ND	109.0	ND	ND	ND	ND
<i>F. oxysporum</i>	ND	85.1	ND	52.9	ND	ND	ND	ND

Datos expresados en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . ND: no determinado debido a que no alcanzó el 50 % de inhibición en la concentración más alta utilizada ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

extracto de *V. mollis* a partir de hojas a una dosis de 16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no es activo contra las bacterias enteropatógenas (Osuna et al., 2005).

Comparando con otras plantas del género *Vitex*, Kumar et al. (2006) encontraron que los extractos metanólicos a razón de 0.2 g  $\text{mL}^{-1}$  de hojas de *V. negundo* L. presentaron un efecto antibacteriano sobre *Bacillus subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus* y *E. coli*. Similares microorganismos se estudiaron por Choudhary et al. (2011) con la misma especie de la planta, inhibiendo a una concentración de 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ , concentraciones más altas que las del presente estudio.

Con los estudios anteriores se puede deducir que existen diferencias en las cantidades de extracto para la inhibición de bacterias debido al origen de la planta, el órgano de la planta evaluada o la diferencia en la especie; por ejemplo, *V. mollis* estudiada por Delgado-Vargas et al. (2010) fue recolectada en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México, mientras que en el presente estudio la planta se recolectó en la región Ciénega del estado de Jalisco. Los diferentes tipos de clima, suelo, altitud, entre otros, podrían ser factores que propicien estas diferencias. Por otra parte, los estudios mencionados anteriormente utilizaron distintas partes de la planta, algunos fueron realizados con los frutos, otros con las hojas y con los tallos.

Es bien sabido que las distintas partes de la planta poseen compuestos diferentes, lo que puede influir en las variaciones de los estudios de bioactividad (Montes-de-Oca-Márquez et al., 2017); lo mismo ocurriría si se trata de diferentes especies, como en el caso de *Vitex negundo* L, sin embargo, *V. mollis* de la región Ciénega de Jalisco, requiere cantidades muy pequeñas de extracto para inhibir a *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus* y *M. luteus*; por lo tanto, puede considerarse una buena fuente de metabolitos para este fin.

En el presente trabajo también se planteó demostrar que *V. mollis* podría presentar actividad antifúngica analizando extractos de tallo y hoja obtenidos con solventes de distinta polaridad, dos polares (acuoso y metanólico), uno medianamente polar (acetónico) y uno no polar (hexánico). Al analizar los resultados de este estudio y conjuntarlos con los resultados de Rodríguez et al. (2000) se infiere que el efecto del extracto de *V. mollis* frente a las cuatro especies de *Fusarium* fue más eficaz cuando se utilizaron los tallos y se aplicaron los solventes acuosos o metanólicos; por lo tanto, la polaridad de los extractos fue de gran relevancia para el estudio. Bajo este contexto, De Oliveira et al. (2012) demostraron también que la polaridad de extractos de *Vitex cymosa* juega un papel importante en la inhibición del insecto *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, Curculionidae:Coleoptera) conocido como el gorgojo del

maíz. Cuando se utilizaron extractos metanólicos de ramas de esta planta, causaron la mayor mortalidad de gorgojos; sin embargo, extractos con diclorometano permitieron su supervivencia. Esto sugiere que los compuestos responsables tanto de la actividad insecticida como de la actividad antimicrobiana de plantas del género *Vitex* tienden a ser polares.

Por otra parte, el mayor efecto inhibitorio de los extractos de *V. mollis* en el desarrollo del micelio se reportó sobre *F. verticillioides*, un hongo que afecta al maíz al causar pudrición de la mazorca y puede producir micotoxinas en el grano (De la Torre-Hernández et al., 2014). Estas micotoxinas son estables durante el procesamiento de los alimentos, no se degradan durante la fermentación del maíz y son resistentes al proceso de enlatado y horneado (Castelo et al., 1998; Marasas et al., 2000; Scott y Lawrence, 1995). En consecuencia, se han estudiado extractos metanólicos de diferentes plantas inhibiéndolos en un intervalo de 28 a 90 % (Ruiz-Bustos et al., 2009; Suárez-Jiménez et al., 2007); sin embargo, las concentraciones utilizadas en estas investigaciones son entre 5 y 30 veces más altas que las utilizadas en el presente estudio; por lo tanto, *V. mollis* es un buen inhibidor del hongo *Fusarium* y representa una alternativa a considerar en el manejo integrado de enfermedades causadas por el fitopatógeno *Fusarium*.

## CONCLUSIONES

Existen diferencias en la composición química y su efecto como antimicrobiano de las diferentes partes de *Vitex mollis* (hojas y tallos). Los extractos metanólicos de los tallos de *V. mollis* fueron los inhibidores más efectivos de bacterias y del hongo *Fusarium*, por lo tanto, los tallos pueden ser una buena fuente de compuestos antimicrobianos. Dentro del campo del manejo sustentable integral de fitopatógenos de manera orgánica, puede representar un recurso natural de bajo costo, que evita la pudrición de las plantas causado por *Fusarium* y además se puede plantear la aplicación de los extractos para evitar el daño ecológico al suelo, obteniendo con ello productos orgánicos menos dañinos también para el humano.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aron P. M. and J. A. Kennedy (2008) Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* 52:79-104, doi: 10.1002/mnfr.200700137
- Benadof F. D. (2010) *Fusarium* especie. *Revista Chilena de Infectología* 27:327-328, doi: 10.4067/S0716-10182010000500007
- Carrillo-Fasio J. A., T. J. Montoya-Rodríguez, R. S. García-Estrada, J. E. Cruz-Ortega, I. Márquez-Zequera y A. J. Sañudo-Barajas (2003) Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:123-127.
- Castelo M. M., S. S. Sumner and L. B. Bullerman (1998) Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *Journal of Food*

- Protection* 61:1030-1033, doi: 10.4315/0362-028X-61.8.1030
- Choudhary K., N. Mathur, A. Chaudhary and B. L. Chaudhary (2011)** Assessment of the antimicrobial potency of leaf extracts from *Vitex negundo* and *Gloriosa superba*. *Pharmacognosy Journal* 23:80-84, doi: 10.5530/pj.2011.20.15
- Cuevas-Juárez E., K. Y. Yurir-Arredondo, J. F. Pío-León, J. Montes-Avila, G. López-Angulo, S. P. Díaz-Camacho and F. Delgado-Vargas (2014)** Antioxidant and α-glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods* 9:78-88, doi: 10.1016/j.jff.2014.04.016
- Daglia M. (2012)** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23:174-181, doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007
- De la Torre-Hernández M., E. D. Sánchez-Rangel, E. Galeana-Sánchez y J. Plasencia-de la Parra (2014)** Fumonisinas - síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* - maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 17:77-91, doi: 10.1016/S1405-888X(14)70321-3
- De Oliveira T. A., B. Ronchi-Teles, C. R. V. da Fonseca, S. L. R. da Silva, P. A. Santos and C. V. Nuñez (2012)** Insecticidal activity of *Vitex cymosa* (Lamiaceae) and *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) extracts against *Sitophilus zeamais* adults (Curculionidae). *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24:49-56.
- Del Toro-Sánchez C. L., J. F. Ayala-Zavala, L. Machi, H. Santacruz, M. A. Villegas-Ochoa, E. Alvarez-Parrilla and G. A. González-Aguilar (2010)** Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β-cyclodextrin capsules. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 67:431-441, doi: 10.1007/s10847-009-9726-3
- Delgado-Vargas F., F. Félix-Favela, J. F. Pío-León, G. López-Angulo, J. A. López-Valenzuela, S. P. Díaz-Camacho and M. J. Uribe-Beltrán (2010)** Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of *Vitex mollis* fruit. *International Journal of Green Pharmacy* 4:288-291, doi: 10.4103/0973-8258.74140
- Dimayuga R. E., M. Virgen and N. Ochoa (1998)** Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (México). *Pharmaceutical Biology* 36:33-43.
- Kuete V. (2010)** Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Medica* 76:1479-1491, doi: 10.1055/s-0030-1250027
- Kumar V. P., N. S. Chauhan, H. Padhi and M. Rajani (2006)** Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 107:182-188, doi: 10.1016/j.jep.2006.03.013
- Lowy F. D. (1998)** *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine* 339:520-532, doi: 10.1056/NEJM199808203390806
- Maksimović Z., D. Malenčić and N. Kovačević (2005)** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology* 96:873-877, doi: 10.1016/j.biortech.2004.09.006
- Marasas W. F. O., J. D. Miller, R. T. Riley and A. Visconti (2000)** Fumonisin B<sub>1</sub>. Environmental Health Criteria 219. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 150 p.
- McFaddin J. F. (2000)** Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 781 p.
- Medina M. F. E., P. A. Alaba, M. E. Estrada-Zuñiga, V. Velázquez-Ordoñez, A. Barbabosa-Pliego, M. Z. M. Salem, M. U. Alonso-Fresán, L. M. Camacho-Días and A. Z. M. Salem (2017)** Anti-staphylococcal properties of four plant extracts against sensitive and multi-resistant bacterial strains isolated from cattle and rabbits. *Microbial Pathogenesis* 113:286-294, doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.053
- Meena A. K., U. Singh, A. K. Yadav, B. Singh and M. M. Rao (2010)** Pharmaceutical and phytochemical evidences for the extracts from plants of the genus *Vitex* - A review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2:1-9.
- Meena A. K., U. S. Niranjan, M. M. Rao, M. M. Padhi and R. Babu (2011)** A review of the important chemical constituents and medicinal uses of *Vitex* genus. *Asian Journal of Traditional Medicines* 6:54-60.
- Montes-de-Oca-Márquez C., C. T. Hernández-Delgado, J. Orozco-Martínez, A. M. García-Bores, J. G. Ávila-Acevedo, M. T. Ortiz-Melo, I. Peñalosa-Castro, G. López-Moreno y R. Serrano-Parralés (2017)** Actividad antibacteriana y antifúngica de *Dalea carthagrenensis* (Jacq.). J. F. Macbr. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40:161-168.
- Morales-Del Río J. A., M. Gutiérrez-Lomelí, M. A. Robles-García, J. A. Aguilar, E. Lugo-Cervantes, P. J. Guerrero-Medina, S. Ruiz-Cruz, F. J. Cinco-Moroyoqui, F. J. Wong-Corral and C. L. Del-Toro-Sánchez (2015)** Anti-inflammatory activity and changes in antioxidant properties of leaf and stem extracts from 3s Kunth during *in vitro* digestion. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article* ID 349235, doi: 10.1155/2015/349235
- Mullen W., S. C. Marks and A. Crozier (2007)** Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:3148-3157, doi: 10.1021/jf062970x
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2017)** Inocuidad de los Alimentos. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/> (Marzo 2018)
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2018)** Temas de Salud. *Escherichia coli*. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. [http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/) (Marzo 2018)
- Osuna L., M. E. Tapia-Pérez, J. E. Jiménez-Ferrer, B. A. Carrillo-Quiroz and J. Silva-Sánchez (2005)** Screening of *Alternanthera repens*, *Boerhaavia coccinea*, *Flaveria trinervia*, *Tournefortia densiflora*, and *Vitex mollis*. Extracts to evaluate their antibacterial activity and effect on smooth muscle I. *Pharmaceutical Biology* 43:749-753, doi: 10.1080/13880200500406412
- Peterson L. R. and C. J. Shanoltzer (1992)** Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* 5:420-432.
- Pharand B., O. Carisse and N. Benhamou (2002)** Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Phytopathology* 92:424-438, doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.424
- Ramírez-Cisneros M. A., M. Y. Rios, A. B. Aguilar-Guadarrama, P. P. N. Rao, R. Aburto-Amar and V. Rodríguez-López (2015)** *In vitro* COX-1 and COX-2 enzyme inhibitory activities of iridoids from *Pestemona barbatus*, *Castilleja tenuiflora*, *Crescentia alata* and *Vitex mollis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 25:4505-4508, doi: 10.1016/j.bmcl.2015.08.075
- Rodríguez A. T., D. Morales y M. A. Ramírez (2000)** Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales* 21:79-82.
- Rodríguez-Maturino A., R. Troncoso-Rojas, A. Sánchez-Estrada, D. González-Mendoza, E. Ruiz-Sánchez, R. Zamora-Bustillos, C. Ceceña-Duran, O. Grimaldo-Juarez y M. Aviles-Marín (2015)** Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chilepín (*Capsicum annuum* var. *glabriuscum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de Microbiología* 47:72-77, doi: 10.1016/j.ram.2014.12.005
- Ruiz-Bustos E., C. Velázquez, A. Garibay-Escobar, Z. García, M. Plascencia-Jatomea, M. O. Cortez-Rocha, J. Hernandez-Martínez and R. E. Robles-Zepeda (2009)** Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *Journal of Medicinal Food* 12:1398-1402, doi: 10.1089/jmf.2008.0205
- Ruiz-Terán F., A. Medrano-Martínez and A. Navarro-Ocaña (2008)** Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. *African Journal of Biotechnology* 7:1886-1893.
- Sánchez G. Y., L. Rondón A., R. Hermosilla E. y M. Almeida S. (2010)** Tami-zaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etíereo y acuoso de las hojas, tallos y flores de la *Helychrysum bracteatum*. *Revista QuímicaViva* 1:40-45.
- Scott P. M. and G. A. Lawrence (1995)** Analysis of beer for fumonisins. *Journal of Food Protection* 58:1379-1382.
- Sharifi-Rad J., B. Salehi, Z. Stojanović-Radić, P. V. T. Fokou, M. Sharifi-Rad, G. B. Mahady, M. Sharifi-Rad, M. R. Masjedi, T. O. Lawal, S. A. Ayatollahi, J. Masjedi, R. Sharifi-Rad, W. N. Setzer, M. Sharifi-Rad, F. Kobarfard, A. U. Rahman, M. I. Choudhary, A. Ata and M. Iriti (2017)** Medicinal plants used in the treatment of tuberculosis -Ethnobotanical and ethnopharmacological approaches. *Biotechnology Advances*, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.001
- Sharma A., R. C. Flores-Vallejo, A. Cardoso-Taketa and M. L. Villarreal (2017)** Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 208:264-329, doi: 10.1016/j.jep.2016.04.045

- Solomon E. B., S. Yaron and K. R. Matthews (2002) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:397-400, doi: 10.1128/AEM.68.1.397-400.2002
- Suárez-Jiménez G. M., M. O. Cortez-Rocha, E. C. Rosas-Burgos, A. Burgos-Hernández, M. Plascencia-Jatomea and F. J. Cinco-Moroyoqui (2007) Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and fumonisin B1 production. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:134-142.
- Tapia-Pérez M. E., A. Tapia-Contreras, R. Cedillo-Rivera, L. Osuna and M. Meckes (2003) Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity – Part II. *Pharmaceutical Biology* 41:180-183, doi: 10.1076/phbi.41.3.180.15100
- Thombre R., R. Jagtap and N. Patil (2013) Evaluation of phytoconstituents, antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of *Vitex negundo* L. and *Tabernaemontana divaricata* L. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4:389-396.
- Winn, W. C., S. D. Allen, W. M. Janda, E. W. Koneman, G. W. Procop, P. C. Schreckenberger y G. L. Woods (2006) Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en Color. Traducido del inglés por O. Giovanniello, D. Klajn, A. M. Perttierra, M. V. Preciado y S. Rondinone. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1475 p.