

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**INFLUENCIA DE EXTRACTOS DE *Agavaceas* SOBRE
EL CRECIMIENTO DE *Aspergillus flavus* LINK ex.
FRIES y *A. parasiticus* SPEARE**

T E S I S

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIR PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA.

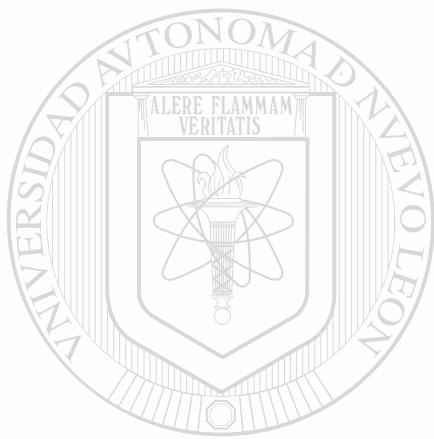
POR

I.B.A. SUSANA LOZANO MUÑIZ

San Nicolás de los Garza, N. L.

Enero 2000

TM
QP941
.A3
L69
2000
c.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**INFLUENCIA DE EXTRACTOS DE Agavaceas SOBRE EL CRECIMIENTO
DE *Aspergillus flavus* LINK ex FRIES y *A. parasiticus* SPEARE**

VERITATIS

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

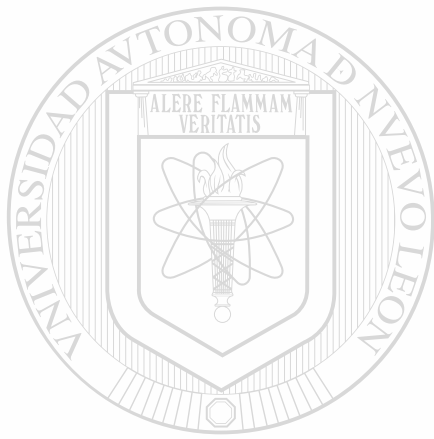
ELABORADA POR

I.B.A. SUSANA LOZANO MUÑOZ

San Nicolás de los Garza, N. L.

En Enero, 2000

TM
9P941
R3
L69
2000
C1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**INFLUENCIA DE EXTRACTOS DE *Agavaceas* SOBRE EL CRECIMIENTO
DE *Aspergillus flavus* LINK ex FRIES y *A. parasiticus* SPEARE**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA POR

I.B.A. SUSANA LOZANO MUNIZ

APROBADA
COMISION DE TESIS


Dr. José Santos García Alvarado

Director de Tesis


Dra. Norma Laura Heredia

Co-Director de Tesis


Dr. Rafael Castro Franco

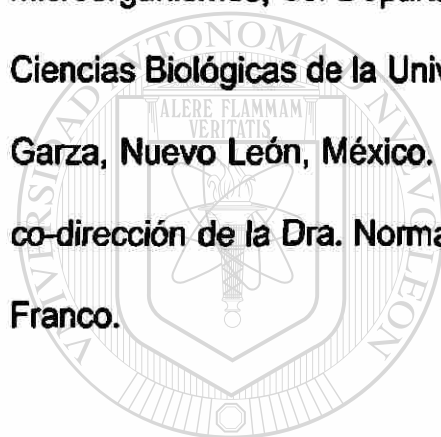
Asesor

San Nicolás de los Garza, N. L.

Enero 2000

**INFLUENCIA DE EXTRACTOS DE *Agavaceas* SOBRE EL CRECIMIENTO DE
Aspergillus flavus LINK ex. FRIES y *A. parasiticus* SPEARE**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado, la co-dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas, y la asesoría del Dr. Rafael Castro Franco.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el convenio No. 4092P-B9608 y la tesista recibió beca del mismo organismo para realizar estudios de Maestría en Ciencias con la Especialidad en Microbiología

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Sr., te dedico este trabajo, ya que mi existir es por tu gracia divina en mis padres, y gracias a ellos y a ti me he dado cuenta de ello, en todo lo que pasa en mi existir, me acompañas siempre. En cada mirada, sonrisa o desaliento estás ahí, para recordarme que nada existe si tu no lo deseas y nada es por si mismo si no es contigo. Creo en ti, que me inspiras día a día, claro que esta creencia no justifica mis actos, porque muchos de ellos no lo demuestran, pero sigues ahí a mi lado, para recordarme que soy contigo, y vuelvo siempre mi mirada hacia ti, que no dejas nunca de esperarme cada momento a que tenga alguna confianza contigo. Porque estas en todo lugar para apoyarme y reprenderme, para darme la oportunidad de reflexionar y de hacerme a ti aún con mi temperamento. Gracias Sr. porque nunca me abandonas estas en mi padre, asesor, y jefe de trabajo, compañero de alegrías y desalientos, almohada que recoge mis lagrimas y amigo que limpia de las mejillas enrojecidas las lagrimas, que no valen más que las alegrías que me has brindado en esta corta vida, en la que agradezco tanto amor que me brindas, en el cariño que me da mi madre, en las ganas de seguir adelante que me da mi amiga, en el apoyo moral y espiritual que me da mi asesora, en el plato que no falta en la mesa gracias a mi amigo incondicional, en la alcoba que no me hace falta gracias a mis familiares y amigos, hasta hoy me has brindado tanto amor, que corto se me hace el tiempo para brindarle palabras de apoyo a mi amigo que he humillado, actos de humildad al que le he fallado, darle tiempo al que se lo he quitado, darle afecto al que se lo he robado.

Me has enseñado a través de mi padre que todo lo que uno deja de dar se le quita en multitud, y que lo que das se te regresa en multitud también. Te pido señor la humildad para saber agradecer con actos de fe tus bondades a través de mis compañeros de vida, también te pido serenidad ante las adversidades, y sabiduría para descubrirte en cada cosa que hay sobre la tierra animada y desanimada, así no dejaré nunca de hacer tu gracia.

Quiero dedicar este trabajo también a mi hijo Alex, que ha demostrado ser fuerte ante la adversidad. Alex ha estado lejos de mi, por tres años, durante los cuales a mostrado tener un gran corazón, así como nunca desistir de sus mas profundos anhelos, lección que ha aprendido como yo de sus abuelos maternos, quienes junto con sus abuelos paternos así como su papá han llenado sus días de bellos recuerdos. Sin el apoyo de todos ellos sería imposible hubiera realizado éste sueño, así como mis familiares y amigos en Monterrey, les agradezco su apoyo y paciencia.

Quiero agradecer especialmente, a mi esposo todo lo que el ha hecho por mi en los 7 años que llevamos de matrimonio. Sin el amor de Amado, el apoyo y la tolerancia no hubiera podido lograrlo. Le agradezco a el y a Alex el sacrificio de mudarse a Monterrey para continuar mí preparación y la de ellos en ésta Cd.

Agradezco la amistad sincera e incondicional de la M. C. Ma. De los Ángeles Verástegui Montemayor, Dra. Liset Villarreal Treviño, Dra. Ma. Julia Verde Star, M. C. Genoveva Alvares Ojeda, Q. B. P. Ginebra Alarcón, Q. B. P. Eduardo Sánchez García, Q. F. B. Adriana Yan de Peón, Hiram Peón, M. C. Myriam de la Garza Ramos, M.C. Robbin Fematt, Q. F. B. Claudia Leos Guevara, Jisela Dávila Muñoz y Luz Silva López.

Agradezco el apoyo técnico brindado por el Dr. Hiram Medrano en la Unidad de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Durango, el Biólogo Marco Antonio del Departamento de Botánica de la Facultad de C. Biológicas, al M.C. Jorge Luis Hernández Piñeiro responsable de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de C. Biológicas, al Ing. Omar Jesús Garza responsable de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica.

Profesionalmente hablando hay mucha gente a la que debo agradecer. Sin embargo, por el espacio limitado disponible en este documento. Solo mencionaré a tres personas. Al Dr. José Santos García Alvarado, la Dra. Norma L. Heredia R. y al Dr. Rafael Castro Franco. El Dr. Santos como la mayoría de sus estudiantes y colegas lo llaman me introdujo al estudio de los hongos aflatoxigénicos y me dio todo su apoyo para realizar los estudios de postgrado en el laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos. Aún sin conocerme apoyado en los antecedentes académicos y laborales con los que en ése tiempo contaba. Es una persona muy especial, yo soy solo una de las muchas personas que se han beneficiado grandemente por su consejo, asesoría y entrenamiento que junto con su apreciable esposa nos han proveído. Ellos nunca están ocupados como para parar lo que inician y observar sus últimos descubrimientos, están verdaderamente enamorados de su trabajo y su entusiasmo es contagioso. Yo siempre estaré agradecida de que me hayan aceptado como estudiante. El Dr. Castro me ayudó grandemente, apoyando esta investigación con una de las partes fundamentales de éste, como lo fueron los extractos de Agaves y Yuccas en un inicio y se limitó posteriormente dicha investigación a Agaves para lo cual no escatimó esfuerzos en todo aspecto para la colecta de plantas en la Universidad Autónoma de Chapingo y su extracción en el Instituto Tecnológico de Durango. Gracias por el apoyo técnico y la asesoría brindada por la Dra. Juliana Morales.

Finalmente, agradezco la ayuda brindada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que recibí durante 2 años bajo el convenio No. 113535. Y más recientemente al Comité para el Fomento y Protección Pecuaria.

A todos ellos gracias por su apoyo y paciencia.

ÍNDICE

Página de título	I
Comisión de tesis	II
Localización	III
Dedicatoria y Agradecimientos	IV
Índice	VII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Abreviaturas y simbología	XI
Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Biología del Género <i>Aspergillus</i>	5
2.2. Biología de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasíticus</i>	8
2.3. Biología de Aflatoxinas	9
2.3.1. Estructura y biosíntesis	9
2.3.2. Toxicidad de AF	10
2.3.3. Mecanismo de acción	11
2.3.4. Detección de toxina	11
2.3.5. Ocurrencia de AF	12
2.3.6. Factores que afectan el crecimiento y producción de AF	13
2.3.7. Inactivación	13
2.3.8. Control	13
2.4. Inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos	14
2.5. Inhibidores del crecimiento de <i>Aspergillus</i> y producción de AF	16
2.5.1. Plantas	16
2.5.2. Especies	17
2.5.3. Aceites esenciales	17
2.5.4. Compuestos volátiles	18
2.5.5. Oleaginosas	18
2.5.6. Fitoalexinas	19
2.5.7. Compuestos orgánicos	19
2.6. Biología del Género <i>Agave</i>	20
2.6.1. <i>Agave americana</i>	21
2.6.2. <i>Agave asperrima</i>	22
2.6.3. <i>Agave lecheguilla</i>	22
2.6.4. <i>Agave striata</i>	23
2.6.5. <i>Agave tequilana</i>	23
3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
3.1. Hipótesis	24
3.2. Objetivo general	24
3.3. Objetivos específicos	24
4. MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1. Inóculo	25

4.2.	Plantas	25
4.3.	Obtención de extractos	25
4.4.	Análisis preliminar de inhibición	26
4.5.	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	26
4.6.	Separación parcial del compuesto activo	27
4.6.1.	Cromatografía en capa delgada (CCD)	27
4.6.2.	Autobiografía	27
4.6.3.	Cromatografía en capa preparativa (CCP)	28
4.6.4.	Determinación de saponinas	29
4.6.4.1.	Prueba de Salkowski.	29
4.6.4.2.	Prueba de Libermann-Burchard.	29
4.7.	Determinación del efecto del 25, 50, 75 y 100% de la CMI	29
4.7.1.	Observación por microscopía de luz de cultivos desarrollados en portaobjetos excavados	30
4.7.2.	Observación de cultivos por microscopía electrónica de barrido.	31
5	RESULTADOS	32
5.1.	Obtención de extractos	32
5.2.	Análisis preliminar de inhibición	33
5.3.	Concentración mínima inhibitoria	34
5.4.	Separación parcial del compuesto activo	35
5.4.1.	Cromatografía en capa delgada (CCD)	35
5.4.2.	Autobiografía	36
5.4.3.	Cromatografía en capa preparativa (CCP)	38
5.4.4.	Determinación de saponinas	40
5.5.	Determinación del efecto del 25, 50, 75 y 100% de la CMI	41
5.5.1.	Observación por microscopía de luz de cultivos desarrollados en portaobjetos excavados	41
5.5.2.	Observación de cultivos por microscopía electrónica de barrido.	43
6	DISCUSIÓN	56
7	CONCLUSIONES	60
8.	BIBLIOGRAFÍA	61

No.	LISTA DE FIGURAS	Pag.
1	Estructuras de las aflatoxinas	9
2	Biosíntesis de aflatoxinas B1 y B2	9
3	Halos de inhibición del crecimiento de <i>A. parasiticus</i> 148 y <i>A. flavus</i> 1299, 1273 por extractos metanólicos de: 1) <i>A. striata</i> , 2) <i>A. aspergilla</i> y 3) <i>A. americana</i> , en presencia de agua destilada estéril usada como control.	33
4	Separación del compuesto activo de los extractos metanólicos de 1) <i>A. americana</i> 2) <i>A. aspergilla</i> y 3) <i>A. striata</i> , por cromatografía en capa fina en placas de 2.5 x 7.5 cm, utilizando cloroformo : metanol 5:1 como fase móvil.	35
5	Ilustración de la técnica de autobiografía.	36
6	Identificación de la fracción activa contra el crecimiento de <i>A. flavus</i> 1273 y <i>A. parasiticus</i> 148, de las CCD hechas a los extractos metanólicos de 1) <i>A. striata</i> , 2) <i>A. aspergilla</i> y 3) <i>A. americana</i> por la técnica de autobiografía.	37
7	Separación del extracto metanólico de 1) <i>A. striata</i> , 2) <i>A. aspergilla</i> y 3) <i>A. americana</i> por CCP eluida con cloroformo:metanol 5:1 como fase móvil observado con luz UV de 254-366 amp.	38
8	Efecto de la variación de la CMI del crecimiento de <i>A. flavus</i> 1273 fotografiado al microscopio de contraste de fases a 100X	42
9	Efecto del extracto etanólico de <i>A. americana</i> en la morfología de <i>A. parasiticus</i> 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control	43
10	Efecto del extracto etanólico de <i>A. americana</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control.	44
11	Efecto del extracto etanólico de <i>A. americana</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 30X, comparado con el control	45
12	Efecto del extracto etanólico de <i>A. americana</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 200X el control y 400X el tratamiento.	46
13	Efecto del extracto etanólico de <i>A. americana</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control.	47
14	Control de <i>A. flavus</i> 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000 X	48
15	Efecto del 75 % de la CMI del extracto metanólico de <i>A. aspergilla</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000 X	49
16	Efecto del 50 % de la CMI del extracto metanólico de <i>A. aspergilla</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000 X	50

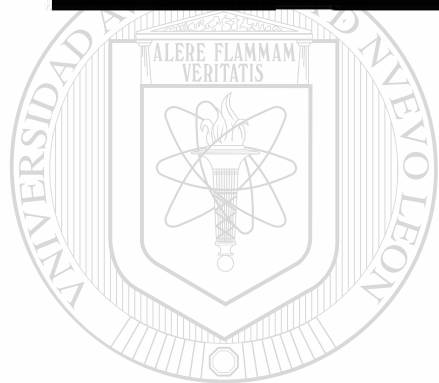
17	Efecto del 25 % de la CMI del extracto metanólico de <i>A. aspergilla</i> en la morfología de <i>A. flavus</i> 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000 X	51
18	Control de <i>A. parasiticus</i> 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X	52
19	Efecto del 75 % de la CMI del extracto metanólico de <i>A. aspergilla</i> en la morfología de <i>A. parasiticus</i> 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X	53
20	Efecto del 50 % de la CMI del extracto metanólico de <i>A. aspergilla</i> en la morfología de <i>A. parasiticus</i> 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X	54
21	Efecto del 25 % de la CMI del extracto metanólico de <i>A. aspergilla</i> en la morfología de <i>A. parasiticus</i> 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X	55

No.	LISTA DE TABLAS	Pag.
1	Micotoxinas, toxicidad y especies productoras.	7
2	Diferencias y homologías de morfología entre especies productoras de AF.	8
3	Rendimiento de extractos macerados.	32
4	Concentraciones Mínimas Inhibitorias del crecimiento de cepas de <i>Aspergillus</i>	34
5	Rendimiento de la obtención de la fracción activa.	39
6	Colores de bandas, R _f y efecto inhibitorio de las fracciones separadas.	39

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA	
NA	Acido norsolirinico
A ₆₀₀	Absorbancia 600 nm
ADN	Acido Desoxi Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
AF	Aflatoxina
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AVN	Averantina
AVF	Averufina
AVNN	Averufanina
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CCP	Cromatografía en Capa Preparativa
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CD	Caldo Czapek Dox
cm	Centímetro
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	días
DHST	Dihidroesterigmatocistina
DHOMST	Dihidroortometilesterigmatocistina
DMDHST	Dimetildihidroesterigmatocistina (ST)
DMST	Dimetilesterigmatocistina
<i>et al</i>	Y colaboradores
FDA	Admón. de Alimentos y Drogas de Estados Unidos
°C	Grados Centígrados
HAVN	5'-hidroxiaverantina
g	Gramo
G	Guanina
h	Hora
I	Inhibición
IE	Inhibición de la esporulación
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
m	metros
μl	Microlitros
μm	micrómetros
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mm	Milimetro
min	Minutos
nm	Nanometros
NI	No Inhibición
OMST	Orto metil esterigmatocistina
OsO ₄	Tetraóxido de osmio

APD	Agar Papa Dextrosa
PHC	Carcinoma Hepatocelular Primario
pH	Potencial de hidrógeno
p.p.m.	Partes por millon
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
%	Por ciento
Rf	Relación de frentes
SRRC	Southern Regional Research Center
ST	Esterigmatocistina
UV	Luz Ultravioleta
VERA	Versicolorina A
VERB	Versicolorina B
VAL	Versiconal
VHA	Versiconal hemiacetal acetato
X	Aumentos



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Las aflatoxinas son micotoxinas policetónicas de *Aspergillus* bien caracterizadas que frecuentemente contaminan oleaginosas y granos. En esta investigación evaluamos la hipótesis de que los extractos de agavaceas tienen actividad inhibitoria contra el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Colectamos cinco plantas ampliamente distribuidas en la vegetación del desierto Chihuahuense: *A. americana*, *A. asperrima*, *A. lecheguilla*, *A. tequilana* y *A. striata*.

Se estudió el crecimiento fúngico en presencia de los extractos activos de plantas en agar papa dextosa (APD). Estudiamos el efecto del 25, 50, 75 y 100 % de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI) de los extractos en los hongos usando medio líquido Czapek Dox (CD). Mediante microscopio electrónica de barrido (MEB) se pudo observar que los extractos de plantas inhiben la producción de la esporulación en cultivos con 7 d de incubación, con los extractos de plantas y los hongos.

Los extractos de *A. asperrima* y de *A. striata* inhibieron el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Los extractos de *A. americana* no tuvieron efecto inhibitorio del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* pero sí alteraron la esporulación. Los extractos de *A. lecheguilla* y *A. tequilana* no mostraron efecto inhibitorio del crecimiento de las cepas analizadas. Así, los extractos activos encontrados en este trabajo, pueden ser una alternativa para el control de estos hongos.

ABSTRACT

Aflatoxins (AF) are well characterized *Aspergillus* polyketide mycotoxins frequently found contaminating oilseed and grain crops.

In this investigation we tested the hypothesis that extracts of agavaceas have an inhibitory activity against growth of *A. flavus* and *A. parasiticus*. We collected five widely distributed plants from the vegetation of Chihuahuan desert: *A. americana*, *A. asperrima*, *A. lecheguilla*, *A. tequilana* and *A. striata*.

Fungal growth in the presence of active plant extracts was studied on potato dextrose agar medium (PDA). The effect of 25, 50, 75 and 100% of the minimal inhibitory concentration (MIC) of plant extracts on growth of fungi was determined using liquid Czapek Dox media (CD). Scanning electron micrographs (SEM) of culture with extracts after 7 days of incubation showed inhibition of fungal sporulation.

A. asperrima and *A. striata* extracts inhibited growth of *A. flavus* and *A. parasiticus*. On the other hand, extracts of *A. americana* did not inhibit growth of *A. flavus* and *A. parasiticus*, but the sporulation process was altered. The *A. lecheguilla* and *A. tequilana* extracts did not show inhibition of growth or sporulation of *A. flavus* and *A. parasiticus*.

The inhibitory activity of extracts of *A. asperrima* and *A. striata* suggests that could have good potential use as natural fungicides.

1. INTRODUCCIÓN

A principios de 1960 los hongos del grupo de *A. flavus* fueron reconocidos como productores de aflatoxinas (*Aspergillus flavus* toxins). Estas últimas envenenaron a miles de aves de corral, puercos y truchas (Cotty, P. J., et al, 1994). Estas micotoxinas son un serio problema para la salud humana y animal (Villarreal, M. H., 1992). Debido a su estructura se les clasifica dentro de las difuranocoumarinas. Los estudios toxicológicos han demostrado su actividad carcinogénica, hepatotóxica, mutagénica, teratogénica e inmunosupresora (Acuña, A. K., 1991).

Las micotoxinas abarcan un amplio espectro de diferencias químicas y estas pueden afectar muchos órganos y sistemas blancos, notablemente al hígado, riñón, sistema nervioso o sistema endocrino y sistema inmune. Su presencia puede algunas veces ser reducida por mejoramientos en prácticas agrícolas, tales como por modificaciones de semillas, proveyendo mejores condiciones de almacenamiento o por procesos de manufactura. No hay evidencia de que los humanos se hayan adaptado a la presencia de estas sustancias químicas naturales en alimentos no más que a la presencia de químicos hechos por el hombre, tales como pesticidas u otros contaminantes químicos de los alimentos (Kuiper-Goodman, T., 1995).

La contaminación de productos agrícolas por mohos es un fenómeno muy frecuente, ya que las esporas de estos microorganismos están ampliamente distribuidos en el ambiente (Garza, R. J. S., 1976). En un principio, los hongos del género *Aspergillus*, eran considerados como de almacén. Posteriormente se ha comprobado su presencia en campo, y más recientemente se ha encontrado que es sistémico en maíz (Villarreal, M. H., 1992).

El maíz es un grano básico en la alimentación de millones de mexicanos. La presencia de AF como contaminantes del maíz es un reto que impone revisar los métodos empleados en su erradicación y crear procesos que liberen a ese cereal del contagio (Peña, D. S., y B. M. Durán, 1990). Se ha demostrado que altos niveles de AF pueden presentarse debido a la contaminación de un número pequeño de semillas. Por ejemplo, se ha estimado que solo una nuez contaminada en 28,250 una almendra en 26,500 y un pistacho en 25,000 pueden originar altos niveles de contaminación de AF. Así, un solo pistacho con una concentración de AF de 60,000 p.p.m. puede contaminar 4.5 Kg. aproximadamente 3,000 nueces. El nivel máximo permitido por la F.D.A. es 20 p.p.m. (Mahoney, N. E. and S. B. Rodriguez, 1996). Tanto la industria como la medicina se interesan respectivamente en estos hongos, por las pérdidas económicas debido a la contaminación del grano, o por las enfermedades que producen (Taylor, J. W., 1995).

Las plantas son una gran fuente de nuevos compuestos activos biológicamente. Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de las plantas estimadas entre 400,000-500,000 alrededor del mundo ha sido investigado fitoquímicamente y la búsqueda de su efecto biológico aún menor (Hostettmann, K. & J. L. Wolfender, 1997).

Estos componentes pueden ser usados en la preservación de comida almacenada y para el control microbiológico de enfermedades de plantas en cultivos de importancia económica (March, C., *et al*, 1991).

El presente trabajo se realizó para investigar el efecto de varias especies de *Agave* de la región. con el fin de aportar alternativas para obtención de agentes biocidas contra los hongos aflatoxigénicos.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Biología del Género *Aspergillus*.

Por siglos ha sido bien conocido que comer especies particulares de hongos pueden causar daño o muerte, pero es relativamente reciente el reconocimiento de que algunos hongos que dañan los alimentos son responsables de enfermedad o muerte de animales o humanos. Aunque ha sido bien conocido desde 1940 que especies de *Penicillium* fueron la fuente de toxicidad en arroz "amarillo" en Japón. Las toxinas fúngicas y otros agentes semejantes ya se conocían desde hacía tiempo, pero la gran importancia de estas sustancias no fue del todo apreciada, sino hasta la famosa epidemia X del pavo entre 1960 y 1961. En Inglaterra, primero los pavos y después los cerdos, pollos y ganado bovino, fueron afectados con diversas deformaciones y disfunciones de sus sistemas orgánicos (Rippon, J. W., 1990).

La causa de este desastre fue por trazas de harina de cacahuete en el alimento, el cual estaba muy contaminado con *A. flavus*. Los análisis del alimento revelaron que un grupo de compuestos más tarde denominados AF, fueron responsables de este brote, por la muerte de un gran número de patos en Kenya, y por hematoma ampliamente distribuido en tortugas en California los cuales ocurrieron más o menos simultáneamente (Hocking, A. D., 1997).

Aspergillus fue descrito apenas hace 300 años y es un género importante de hongos. Aunque algunas especies han sido usadas en la producción de alimentos (ej.: *A. oryzae* en la elaboración de la soya), los miembros del grupo *A. flavus* se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y son regularmente aislados del suelo (particularmente de áreas tropicales y subtropicales), de forraje y vegetación en

descomposición, de semillas almacenadas y granos, y de varios tipos de productos alimenticios (Raper, K. B., and D. I. Fennell.,1965).

Existen alrededor de 900 especies dentro del género *Aspergillus*, siendo los hongos más comunes en todos los ambientes. En forma común están en el suelo y en la vegetación en descomposición de todo el mundo, pero también en todo tipo de desechos orgánicos: alimentos descompuestos, pinturas mojadas, bolsas de diálisis rotas, lentes de contacto blandos, medicamentos cuyo recipiente se abrió, paredes de refrigeradores, líquidos para aseo, polvo de las construcciones, interior de los conductos de aire, aderezos usados, etc. (Rippon, J. W., 1990).

La habilidad del *Aspergillus* de crecer en diferentes substratos bajo un rango amplio de condiciones del medio ambiente le ha permitido a algunos de ellos colonizar tejidos de animales vivos y muertos. Su invasión a tejidos vivos es responsable de muchas formas de enfermedad en animales de sangre fría y caliente incluyendo al hombre, pero su parasitismo debe siempre ser referido como un incidente de su ciclo de vida saprofítico normal en la naturaleza, el cual involucra germinación de la espora, colonización del substrato fructificación y diseminación por aire.

Para que los hongos sobrevivan no es necesario la producción de metabolitos tóxicos para animales o humanos cuando son ingeridos por éstos, ni la reacción alérgica cuando son inhalados o por contacto, ni la colonización del hospedero (Raper, K. B., and D. I. Fennell.,1965).

Casi 50 especies de *Aspergillus* han sido enlistadas como capaces de producir metabolitos tóxicos, pero las micotoxinas de *Aspergillus* de mayor importancia en alimentos para consumo humano y animal son las AF (Hocking, A. D., 1997).

Las AF son derivados de difuranocoumarinas. Las AF B₁, B₂, G₁, y G₂ son producidas en la naturaleza por hongos discutidos anteriormente. Las letras B y G se refieren a los colores con que fluorescen azul (blue) y verde (green), respectivamente observados bajo ondas largas de luz UV, y los sufijos 1 y 2 son referidos de acuerdo a su patrón de separación en placas de CCD. Las AF M₁ y M₂ son producidas de su respectiva AF por hidroxilación en animales lactantes y son excretadas en leche (Fig. No. 1) (Ellis, W. O., *et al*, 1991).

Tabla No.1. Micotoxinas, toxicidad y especies productoras.

Micotoxinas	Toxicidad	Especies productoras
AF B ₁ y B ₂	Daño en el hígado, cirrosis, carcinogenesis (hígado), teratogénesis, inmunosupresor	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
AF G ₁ y G ₂	Efecto similar a las AF B: La toxicidad de G ₁ es menos que la de B ₁ pero mayor que la de B ₂	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Acido ciclopiazónico	Degeneración y necrosis de varios órganos, tremogénicos, baja toxicidad oral.	<i>A. flavus</i>
Ocratoxina A	necrosis de riñón (especialmente en puercos), teratogenico, inmunosupresivo, carcinogénico.	<i>A. ochraceus</i> y especies relacionadas
Esterigmatocistina	Daño agudo al hígado y al riñón, carcinogénico.	<i>A. versicolor</i> , <i>Emericella spp.</i>
Fumitremorgenos	Tremorgénicos a ratas y ratones	<i>A. fumigatus</i>
Territrems	Tremogénicos a ratas y ratones	<i>A. terreus</i>
Triptoquivalinas	Tremorgénicos	<i>A. clavatus</i>
Equinulinas	Pérdida de apetito en puercos	<i>Euritium chevalieri</i> , <i>E. ambstelodami</i>

2.2. Biología de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

Sin duda, el grupo más importante de *Aspergillus* toxigénicos son los hongos aflatoxigénicos, *A. flavus*, *A. parasiticus* y el recientemente descrito pero mucho menos común la especie *A. nomius*, las cuales todas son clasificadas en *Aspergillus* sección *Flavi*. Aunque estas tres especies son muy relacionadas y tienen muchas similitudes, un número determinado de características pueden ser usadas en su diferenciación (Tabla No 2) (Klich, M. A., and I. Pitt., 1988). *A. flavus* puede producir AF B₁ y B₂ y ácido ciclopiazónico, pero solo una proporción de los aislados son toxigénicos. *A. parasiticus* produce aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂ pero no ácido ciclopiazónico, y casi todos los aislados son toxigénicos. *A. nomius* es morfológicamente similar a *A. flavus* pero, así como *A. parasiticus* produce AF B y G sin ácido ciclopiazónico (Hocking, A. D., 1997).

Tabla No 2.

Diferencias y homologías de morfología entre especies que productoras de AF.

Especies	Conidios	Esclerocios	Toxinas
<i>A. flavus</i>	Suaves a moderadamente rugosas, variables en tamaño	Largas y globosas	AFB ₁ , AFB ₂ , ácido ciclopiazonico
<i>A. parasiticus</i>	Frecuentemente rugosas, ligera variación en tamaño	Largas y globosas	AFB y AFG
<i>A. nomius</i>	Similar a <i>A. flavus</i>	Pequeñas, elongadas (forma de bala)	AFB y AFG

2.3. Biología de Aflatoxinas.

2.3.1. Estructura y Biosíntesis.

Fig. No. 1. Estructura de las AF.

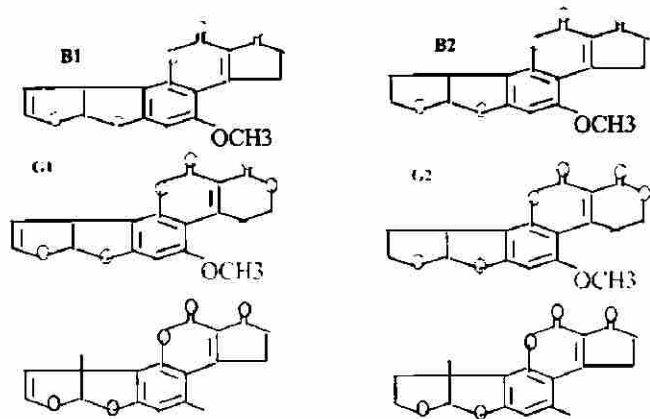
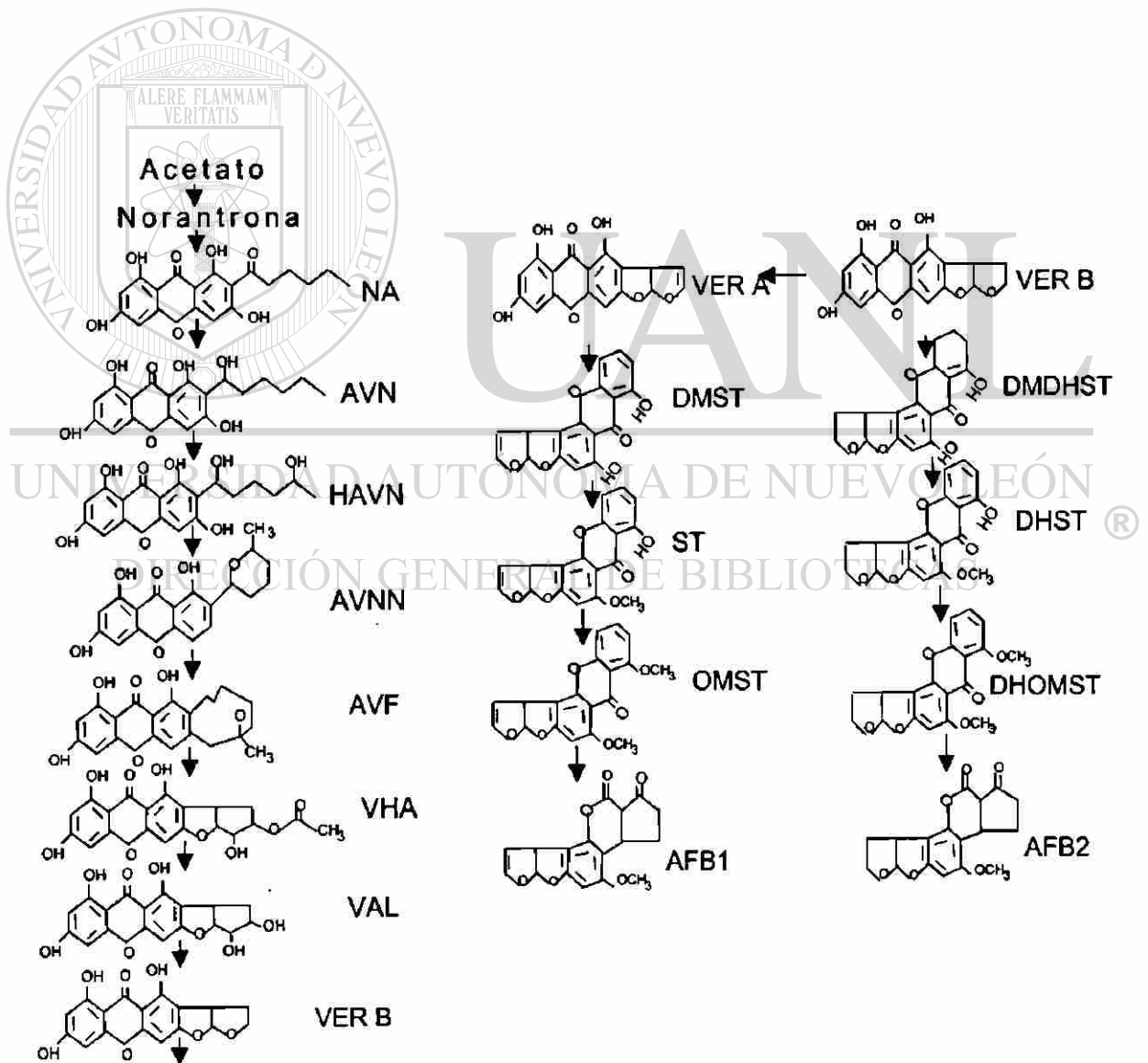


Fig. No. 2. Biosíntesis de las AF.



2.3.2. Toxicidad de AF:

Los efectos de las AF pueden ser divididos en bioquímicos y biológicos. Bioquímicamente las AF pueden afectar al metabolismo energético, al de carbohidratos y lípidos, y al de Ac. Nucleicos y proteínas. Los efectos biológicos (carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos y aflatotóxicos) de las AF son influenciados por la variación de la especie, sexo, edad, nivel nutricional y los efectos de otros químicos.

Las AF son tóxicas aguda o crónicamente tanto para animales como humanos, producen daño agudo al hígado, cirrosis hepática, inducen tumores, son teratogénicas, tienen efectos inmunosupresivos. La aflatoxicosis es el mayor síndrome asociado con AF y puede presentarse en aflatoxicosis primaria (aguda o crónica) y secundaria, las cuales se diferencian en cuanto a las concentraciones de AF ingeridas y los periodos de estas: si son frecuentes, moderados, si causan muerte o daño a órganos (Ellis, W. O., *et al*, 1991). Raramente se da la aflatoxicosis aguda en humanos; sin embargo, se han reportado algunos brotes en 1967, 26 personas en dos comunidades granjeras en Taiwan tuvieron daño con un alimento aparentemente envenenado, 19 fueron niños, 3 de los cuales murieron (Hocking, A. D., 1997).

Indiscutiblemente, el mayor impacto de las AF en la salud humana es por su potente inducción al cáncer hepático. Las AF y el virus de la hepatitis B son aparentemente co-carcinógenos, y la ocurrencia de ambos predispone grandemente la ocurrencia de cáncer de hígado en humano. Hay una correlación positiva entre el nivel de AF en la dieta y el carcinoma hepatocelular primario (PHC) (Chu, F. S., 1991).

2.3.3. Mecanismo de Acción:

La aflatoxina B1 es metabolizada por el sistema de función de oxidación microsomal en el hígado, permitiendo la formación de intermediarios altamente reactivos (carcinogénicos potentes que forman aductos con ADN), frecuentemente resultan mutaciones por transversiones de G a T (Jae-Hyuk, Y., *et al*, 1996), interrumpiendo la transcripción y proliferando células anormales, permitiendo la mutagénesis o carcinogénesis. Las AF también inhiben la toma de oxígeno en los tejidos por actuar en la cadena transportadora de electrones e inhibir varias enzimas, resultando en el decrecimiento de la producción de ATP.

2.3.4. Detección de Toxina:

Las AF pueden ser detectadas por métodos químicos o biológicos. La determinación de AF ha sido estandarizada. Las muestras son extraídas con solventes orgánicos tales como cloroformo o metanol en combinación con pequeñas cantidades de agua. Para su limpieza los extractos son pasados por columnas de silica gel o por cartuchos de separación apropiados. Los extractos son entonces concentrados, usualmente por evaporación bajo nitrógeno, y separados por cromatografía en capa delgada (CCD) o por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

En los últimos años se ha simplificado la detección de micotoxinas, debido al reconocimiento oficial de los métodos inmunológicos. La cuenta de hongos son aún incluidas en los requerimientos de control de calidad para muchos alimentos. Los métodos tradicionales han sido usados para determinar la presencia de hongos que son tardados, trabajosos, y caros; requiere de micólogos expertos; y sobre todo no permite la especificación de las cepas micotoxigénicas. La detección de hongos aflatoxigénicos

en granos por PCR es relativamente rápida, reproducible y altamente específica (Shapira, R., *et al*, 1996).

2.3.5. Ocurrencia de AF:

A. flavus está mas ampliamente distribuido en la naturaleza que *A. parasiticus*. Ambos tienen una gran afinidad por nueces y aceites esenciales. Entre los que figuran de mayor importancia son maíz, cacahuate, y semillas de algodón (Diener, U. L., *et al*, 1987), y en muchas instancias, la invasión toma lugar antes de la cosecha y no durante el almacenaje como se creía.

Los cacahuates se contaminan cuando están aun en el campo, sobre todo si sufren algún estrés o factores relacionados. El daño por insectos de los granos de maíz, permite la entrada de hongos aflatoxigénicos, pero la invasión puede también ocurrir a través de gusanos. Las semillas de algodón son infectadas a través de néctares.

Los niveles de AF son raramente significantes en los cereales y especias, pero la producción de AF en estos productos se facilita por un secado, manejo, o almacenaje deficiente. Cantidades significantes de AF pueden ocurrir en cacahuates, maíz, y otras nueces y semillas de oleaginosas (Diener, U. L., and N. D. Davis, 1966), particularmente en algunos países tropicales donde el maíz puede crecer bajo condiciones marginales y donde las facilidades de secado y almacenaje son limitadas.

2.3.6. Factores que afectan el crecimiento y la producción de AF:

A. flavus y *A. parasiticus* tienen patrones de crecimiento similares. Las AF pueden ser producidas entre 12 a 40 °C, en grandes cantidades a altos valores de Aw (0.98 a 0.99) (Diener, U. L., and N. D., 1970), y a un pH entre 3.0 y 8.9 para *A. parasiticus* y entre 3.0 y 11.2 para *A. flavus*. La reducción de oxígeno disponible en el empaquetado en atmósferas controladas puede inhibir la formación de AF por *A. flavus* y *A. parasiticus* en alimentos. La luz inhibe la producción de AF (Bennett, J. W., et al, 1978).

2.3.7. Inactivación:

Las AF pueden ser particularmente destruidas por varios tratamientos químicos. Se ha demostrado que los agentes de oxidación tales como ozono y peróxido de hidrógeno remueven AF de harina de cacahuate contaminada. El tratamiento con peróxido de hidrógeno resultó en una destrucción de 97% de AF en harina de cacahuate desgrasada.

El método químico con gas de amoníaco anhidro a elevadas temperaturas y presión es el más práctico para destrucción de AF, con un 95 a 98 % de reducción de AF total en harina de cacahuate.

2.3.8. Control.

Las AF son una de las pocas micotoxinas verificadas por legislación. En los Estados Unidos la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) prohíbe el comercio de derivados de la leche con más de 20 p.p.b. de AF y que se venda la leche conteniendo más de 0.5 p.p.b. de AF (Bhatnagar, D., et al, 1995).

Los límites impuestos por muchos países son de 5 a 20 mg de AF B1 por Kg. en algunos alimentos para humanos, incluyendo cacahuates y productos de cacahuete. La cantidad permitida en alimentos para carne de vaca varía, pero es permitido arriba de 300 mg/Kg en alimento para ganado y oveja en Estados Unidos. No hay límites establecidos para AF en alimentos para humano como animales en el sur oeste de Asia.

2.4. Inhibidores del crecimiento de microorganismos patógenos

En la actualidad, grupos de investigadores han reportado componentes naturales con actividad antifúngica y antibacteriana.

Buddleja cordata (loganiaceae), conocida como tepozan en México, es un árbol el cual puede crecer hasta 20 m. Sus raíces, corteza y hojas son usados ampliamente en la medicina tradicional para diferentes tipos de enfermedades, tales como disentería e inflamación de ojos y piel, así como diurético y antiséptico, y tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Avila, J. G., et al, 1999).

Byrsonima crassifolia (L) H.B.K. es un árbol tropical de la familia *Malpigiaceae* ampliamente distribuido en algunas regiones de México, América central y Sur y es popularmente conocida como "nache". Su corteza y hojas son usadas en medicina tradicional para tratar la tos, desorden gastrointestinal, infección de piel y piquete de serpiente. El extracto de hojas y corteza tiene actividad antifúngica, antibacteriana y contra dermatofitos, en particular contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus* y *Micrococcus luteus* (Martínez-Vázquez, M., et al, 1999).

También los extractos etanólicos de *Garcinia gummi-gutta*, *Anisomeles malabarica*, *Aegle marmelos*, *Alangium salviifolium* *Zizyphus jujuba* y *Terminalia belberica* mostraron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y los de *T. Bellerica*, *G. gummi-gutta* y *A. salviifolium* mostraron además actividad contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Valsaraj, R., et al, 1997).

El extracto con butanol de *Ononis spinosa* y *Bryonia syriaca* con 4 mg/ disco tuvieron actividad moderada antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme* y *Candida albicans* relativamente igual al control de nitrato de miconazol a 40 mg/ disco (Mahasneh, A. M., and A. A. El-Oqlah, 1999).

En 1996 Verástegui (Verástegui, M. A., et al, 1996), demostró que los extractos etanólicos de *Agave lecheguilla*, de *Larrea tridentata* y de *Baccharis glutinosa* inhibían el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias. Recientemente se demostró el efecto antifúngico de extractos de *Yucca shidigera* y *Larrea tridentata* contra cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*. También se observó que esos extractos inhibían la producción de toxina, probablemente como resultado de la falta de crecimiento del hongo (Lozano, G. L., 1997).

2.5. Inhibidores del crecimiento de *Aspergillus* y producción de AF.

2.5.1. Plantas.

Muchos compuestos en la naturaleza han mostrado la inhibición de microorganismos. El reciente incremento de la demanda por extender la vida de los alimentos ha renovado el interés en la explotación de antimicrobianos naturales para el uso como preservadores de estos productos. Por siglos se han utilizado como sazonadores de alimentos y bebidas los extractos de algunas plantas con actividad antimicrobiana. Los ancianos egipcios utilizaban extractos de especias y aceites para conservar alimentos. Plinio, Virgilio e Hipócrates mencionaron que para aliviar enfermedades como indigestión, neumonía, heridas e infecciones se podía utilizar el ajo. Así también civilizaciones antiguas reconocían el potencial antiséptico o antimicrobiano de muchos extractos de plantas (Conner, E. D., 1993).

Más recientemente se han realizado estudios científicos que validan la actividad antimicrobiana de un sinnúmero de plantas. Con respecto a la actividad antifúngica podemos mencionar los siguientes trabajos.

El extracto obtenido con diclorometano de gobernadora (*Larrea tridentata*), inhibió en un 92% y 86% el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* respectivamente (Lozano, G. L., 1997). El extracto de epazote rojo (*Chenopodium amrosiodes*) obtenido con diclorometano eliminó en 100% la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* (Vargas-Aispuro, I., et al, 1998).

2.5.2. Especies.

En 1974 se observó el efecto inhibitorio de la canela en un hongo productor de AF, reportándose que con un nivel de 1-2% de la concentración de extracto de canela en un caldo de cultivo se permitía el crecimiento de *A. parasiticus* pero se inhibía aproximadamente el 99% de la producción de AF (Bullerman, L. B., 1974). La pimienta negra, clavo y semillas de anís estrella tienen efectos fuertemente inhibitorios en los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* (Hitokoto, H., et al, 1978).

2.5.3. Aceites esenciales.

El aceite esencial de semillas de neem (*Azadirachta indica*) inhibió la producción de AFB₁ y el crecimiento de *A. flavus* a 1000 p.p.m., así como el aceite esencial de hojas de *Morinda lucida* (Bankole, S. A., 1997). El aceite esencial de pimienta a una concentración de 200 p.p.m. inhibió el crecimiento y la producción de toxina de *A. parasiticus* (Bullerman, L. B., et al, 1977). *A. flavus* fue totalmente inhibido por aceites esenciales de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, *Teloxys ambrosioides*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* y *Mentha piperita* (Montes-Belmont, R., and M. Carvajal, 1998).

2.5.4. Compuestos volátiles.

Se encontraron compuestos volátiles altamente tóxicos para *A. flavus* en granos de maíz Híbridos Pioneer 3136 obtenidos de la zona media de una planta de maíz, tales como aldehídos C₄-C₆, benzotiazol, metil jasmonato, y 2-furancarboxaldehido (Zeringue, H. J., Jr., 1997). Compuestos volátiles de hojas frescas de neem particularmente aldehídos monoinsaturados C₃ a C₉ resultaron ser altamente antifúngicos; su efecto en el crecimiento de *A. parasiticus* como en la producción de AF resultó diferente del obtenido cuando se licuó o cuando se hirvió las hojas de neem (Zeringue, H. J., Jr., and Bhatnagar, 1994). El alqueno C₆-C₉, trans-2-hexanal, mostró efecto inhibitorio en el crecimiento de *A. flavus*. Este es liberado como compuesto volátil de hojas de algodón sanas y su concentración se incrementa con el daño mecánico de tejidos (Zeringue, H. J., and S. P. McCormick, 1989). El 3-metil-1-butanol es uno de los olores característicos de colonias vivas de *A. flavus*, es también una sustancia volátil de hojas de algodón, y es un compuesto que estimula la producción de AF (Zeringue, H. J., Jr., and S. P. McCormick, 1990).

2.5.5. Oleaginosas.

Las semillas de *Sorghum* contienen pequeñas proteínas en cantidades mínimas las cuales son diferentes de otras proteínas almacenadas y pueden inhibir *in vitro* la germinación de esporas y la extensión de la hifa de la especie aflatoxigénica de *A. flavus* (Ghosh, M. And K. Ulaganathan, 1996). Hay un factor (proteína extraída de la fracción acuosa) que es soluble en agua en el tejido del maíz en la variedad resistente a *A. flavus* (yellow creole) que no está en la variedad susceptible (huffman) (Neucere, J. N., 1996).

2.5.6. Fitoalexinas.

Los compuestos de bajo peso molecular producidos por tejidos de plantas en respuesta al estrés, trauma o infección llamadas fitoalexinas tienen actividad antimicrobiana (Beuchat, L. R., and D. A. Golden, 1989). Los extractos de tejido de óvulo de algodón inoculado con *A. flavus* causó una inhibición significativa de la síntesis de AF por *A. flavus* ya que contiene concentraciones considerables de sesquiterpenos que es un metabolito de estrés antifúngico denominado comúnmente como fitoalexinas (Mellon, J. E. 1992).

2.5.7. Compuestos orgánicos:

El fungicida chlobentiazon a concentraciones arriba de 8 mg/ml inhibió la producción de AF por *A. flavus*. Por otra parte a esta misma concentración *A. parasiticus* continuó produciendo AFB₁ y otras AF y a 15 mg/ml de concentración la producción de AFB₁ se vió incrementada (Wheeler, M. H., et al, 1991). El "pentachlorobenzyl alcohol", "phtalide" y "pyroquilon" se requieren a bajas concentraciones para inhibir la biosíntesis de AF y no inhiben fuertemente el crecimiento de *A. flavus* de 1 a 8 mg/ml (Wheeler, M. H. and D. Bhatnagar, 1995).

2.6. Biología del Género *Agave*.

A la Familia *Agavaceae* pertenece el género *Agave* el cual es rico en especies, originario de la América central y profusamente difundido por todo el mundo, particularmente en las regiones soleadas de clima árido o semiárido. La planta es de aspecto típicamente xerófilo y está generalmente constituida por un tronco cortísimo o ausente y por una roseta de hojas muy compactas mas o menos ocultas y alargadas, casi siempre dotadas de robustas espinas. Las flores, en gran numero, se hallan sostenidas por un escapo carente de hojas y reunidas en forma de espiga con ramas multiformes. La floración puede acaecer al cabo de diez años desde el nacimiento de la planta y, una vez que ha florecido esta, generalmente muere. Son profusamente cultivadas en América central y en África para aprovechar la fibra obtenida del parénquima foliar (sisal). Algunas especies, como *A. tequilana* es cultivado cerca de Tequila, Jalisco, el cual es fuente del famoso licor destilado llamado tequila, mediante la extracción de la gema central, de un liquido azucarado de agradable sabor, que fermentado se emplea para obtener bebidas con graduación alcohólica variada, muy difundidas en México (Danae, 1981).

De sobra conocida es la gran importancia económica de las plantas supeditadas al género *Agave* cuyo foco principal de vegetación se halla en México, pero si alguna duda cupiese a este respecto, para desvanecerla bastaría mencionar el henequén, el sapupe, la lecheguilla, el pulque, el tequila, el mezcal, muchos amoles y la mayor parte de los magueyes con las tenaces fibras textiles que se extraen de ellos.

La zona noreste de México corresponde a regiones áridas y semiáridas en donde existe una gran variedad de plantas que presentan una diversidad de adaptación a la

sequía, destacando las del género *A. lecheguilla* el cual se desarrolla en condiciones ecológicas que presentan un suelo con una textura que va de migajón arenoso a limoso, con una cantidad de materia orgánica pobre y un pH moderadamente alcalino. *A. asperima* se encuentra en asociación con *A. lecheguilla* Torrey (Villarreal-Rivera, L., et al, 1991). El *A. lecheguilla* del que se extrae una importante fibra textil, es muy abundante en los cerros calizos de Chihuahua, Tamaulipas, Durango y Zacatecas. También se usa como amole para lavar, merced a su abundancia en saponina y sus hojas son un valioso sustituto del jabón. El *A. americana* es una planta que se usa como ornamental y se reproduce naturalmente en California (Sonora) y Arizona (Shreve, F., and I. L. Wiggins, 1980). *A. striata* se distribuye en los Estados de Puebla y Nuevo León, y en el Desierto Chihuahuense.

2.6.1. *Agave americana*:

Es una planta fibrosa de hojas grises, agudas encorvadas hacia arriba en la extremidad, de 2.5 m o menos de largo por 15 o 20 cm. de ancho, provista de una espina seduzca, cónica y algo curva (2.5 cm por 5 mm). Y de dientes triangulares más o menos encorvados, sobre prominencias carnosas, con una separación variable de 1.5 a 5 cm entre uno y otro.

2.6.2. *Agave asperima*:

Magüey de cerro, se describe con muy pocas hojas, verdes-glaucas, acanaladas, de ambas caras, hasta de 130 cm de alto por 15 o 20 cm de ancho, terminadas en una espina morena, acanalada y punzante de 6 cm o menos de largo, y provista de dientes marginales y encorvados de 1 cm o menos de largo por una separación variable entre ellos de 1.5 a 3 cm, sentados en prominencias carnosas más o menos pronunciadas, flor de 7 a 8 cm en un quíote de 3.5 m. de alto, filamentos insertos en la medianía del tubo tan largo como sus segmentos.

2.6.3. *Agave lecheguilla* también conocida comúnmente como *A. lecheguilla*:

Hojas poco numerosas, azuladas o verde claras, muy fibrosas, con una faja pálida en la cara superior y líneas angostas y verdes-oscúras en el dorso, de 50 cm de largo como promedio por 2 o 3 cm de ancho, termina en una punta acanalada de punta aguzada y pardusca que mide 5 cm o menos de largo, dientes reflejos, triangulares en avanzada edad cenicientos y desprendibles con el margen caloso y recto que los une: miden 7 mm de largo por una separación de 2 a 4 cm; quíote de 3 a 4 m de largo; espiga de 40 a 50 cm; flores amarillentas de 3.5 a 4 cm de largo; semillas pequeñas y lustrosas.

2.6.4. *Agave striata*:

Esta especie se describe con hojas grisáceas, extendidas, rómbicamente biconvexas, algo ásperas en unas orillas, de 60 a 90 cm de largo por unos 5 cm de ancho, con su superficie provista de espacios redondos separados por excavaciones angostas, así como de una espina acicular de 1.5 cm de largo; ovario fuerte, prolongado en el interior del periantilo.

2.6.5. *Agave tequilana*:

Se describe como cortamente caulecente, de hojas azulado-verdosas o glaucas delgadas y casi planas, de 125 cm o más de largo por 8 o 10 cm de ancho, provistas de una espina rojo-obscura, hasta de 2 cm de largo y de dientes rojizos ganchudos y triangulares, de 3 o 4 mm. de largo con una separación de 1 a 1.5 cm uno del otro. Es utilizado para producir por destilación tequila.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis:

Los extractos de *A. americana*, *A. lecheguilla*, *A. tequilana*, *A. striata*, y *A. asperrima* inhiben el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

3.2. Objetivo General:

Determinar la actividad de diferentes extractos de *A. americana*, *A. lecheguilla*, *A. tequilana*, *A. striata*, y *A. asperrima* sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

3.3. Objetivos Específicos:

- 1) Determinación de la actividad de los extractos crudos en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- 2) Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto que inhiba el crecimiento de los hongos.
- 3) Determinar el efecto de los diferentes extractos de plantas en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- 4) Separar las diferentes fracciones de los extractos que presenten actividad antifúngica por cromatografía en capa delgada.
- 5) Aislar y caracterizar parcialmente las fracciones con actividad antifúngica

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1. Inóculo:

Las cepas utilizadas fueron *A. flavus* Link ex Fries SRRC 1299, 1273 y *A. parasiticus* Speare SRRC 148. Estas se cultivaron en APD por 7 días a 28°C. Las esporas se cosecharon en solución salina al 0.85% con Tween 20 al 0.05%. La suspensión de esporas se ajustó a 1×10^3 esporas / ml. La cuenta de esporas se hizo en cámara de Neubauer (Lynch, M. J., *et al*, 1972).

4.2. Plantas:

Las plantas de *A. americana*, *A. lecheguilla*, *A. tequilana*, *A. striata*, y *A. asperima* fueron colectadas en Mayo 1998 del desierto Chihuahuense e identificadas por personal de la Universidad Autónoma Chapingo y del Departamento de Botánica de la Facultad de C. Biológicas de la U.A.N.L.

4.3. Obtención de extractos:

10 g de hoja limpiada y cortada se licuó con 50 ml de cada uno de los siguientes solventes: agua, metanol, y etanol. La muestra se mantuvo en reposo por un periodo de 24 h a 60°C, con excepción el acuoso que se mantuvo a 4°C. La suspensión obtenida se filtró con papel Whatman No 5. (Hitokoto, H., *et al*, 1978). Las muestras se secaron a 55°C, se obtuvieron cristales de cada extracto, los cuales se colocaron en viales estériles y se mantuvieron a temperatura ambiente en lugar seco. Para analizar el extracto se diluyó en agua destilada estéril en proporción 1:10.

4.4. Análisis preliminar de inhibición:

La actividad inhibitoria del crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* se evaluó utilizando cajas con medio agar papa dextrosa (APD), las cuales fueron inoculadas con los microorganismos en la superficie del agar. Después se realizaron perforaciones en el agar de 0.5 cm de ancho y profundidad. Estos posteriormente se rellenaron con distintos extractos disueltos en agua destilada estéril 1:1. Se consideró como prueba positiva aquellos extractos que presentaron un halo de inhibición o que no permitieron crecimiento sobre el orificio (Verástegui, M. A., 1995).

4.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI):

La concentración mínima de los extractos que inhibieron el crecimiento de los hongos en el análisis preliminar de inhibición se determinó en tubos con 1.8 ml de caldo CD con 0.2 ml de una suspensión de esporas a una concentración final de 1×10^3 esporas/ml. El extracto se probó a diferentes concentraciones desde 0.25 mg/ml hasta 20 mg/ml en intervalos de 0.25. Los experimentos por duplicado se realizaron con tres repeticiones. El medio de cultivo utilizado fue Caldo CD para producción de micelio y AF. El cultivo se mantuvo inclinado y sin mezclarse, y se incubó a 28°C por 7 días. La CMI se definió como la concentración más pequeña del extracto que inhibió el crecimiento del hongo (Verástegui, M. A., *et al*, 1996).

4.6. Separación parcial del compuesto activo.

4.6.1. Cromatografía en capa delgada (CCD):

Se realizó CCD preparando placas de vidrio de 2.5 x 7.5 (portaobjetos) con silica gel 60G, preparando una mezcla con 10 gr de silica y 35 ml de agua destilada se cubrieron los portaobjetos uniformemente, las placas se secaron en estufa a 45°C por 30 min. y se activaron manteniendo una temperatura de 180°C por 1 h, posteriormente se dejaron enfriar en cubas de vidrio con carbonato de calcio como desecante. Por otra parte se prepararon suspensiones de cada extracto a analizar con agua destilada a una concentración de 1:10 y cada suspensión se inoculó en las placas para CCD con ayuda de capilares en forma de banda delgada. Una vez seca la banda inoculada se procedió a colocar las placas en cubas y correr la cromatografía utilizando una mezcla de metanol:cloroformo 1:5 como fase móvil. Se usó éste método con el objeto de separar por diferencia de polaridad los extractos acuosos, metanólicos, y etanólicos de *A. americana*, *A. asperima* y *A. striata*.

4.6.2. Autobiografía:

Esta prueba se realizó con el objeto de identificar la banda del extracto activa contra el crecimiento *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las placas cromatográficas con los extractos metanólicos ya separados se colocaron sobre una base dentro de cajas Petri. Sobre la placa se agregó una capa uniforme de APD, y para evitar la deshidratación del medio de cultivo se agregó una torunda de gasa humedecida con glicerol al 10%. Por otra parte se preparó una suspensión de esporas de cada hongo a una concentración de 1×10^3 esporas/ml y se inoculó 1 ml sobre la capa de agar y se incubó a 28°C por 7 días. Se tomó como banda bioactiva de la placa cromatográfica la que ocasionara una banda

de inhibición visible capaz de evitar el crecimiento del hongo en cuestión (Hamburger, M. O., and G. A. Cordell, 1987).

4.6.3. Cromatografía en capa preparativa (CCP):

Se utilizaron placas de vidrio de 20x20 para cubrirlas homogéneamente con una mezcla de silica gel 60 G al 30%, se secaron a 45°C por 30 min. y se activaron a 180°C por 1 h. Para enfriarse se depositaron en cubas con carbonato de calcio como desecante. Se prepararon soluciones de los extractos metanólicos de *A. americana*, *A. asperrima* y *A. striata* con agua destilada 1:10, para inocular las placas cromatográficas mediante el uso de capilares en forma de banda. Una vez seco el inóculo de extracto en las placas, se procedió a correr la cromatografía utilizando como fase móvil metanol:cloroformo 1:5. Se raspó la banda identificada como fracción activa en la autobiografía y se mezcló con metanol y se procedió a filtrar para eliminar la silica gel. Posteriormente se vació el filtrado en una caja Petri para secar a 50°C en estufa y obtener cristales los cuales se mantuvieron en un desecador, hasta la realización de pruebas posteriores.

4.6.4. Determinación de saponinas:

4.6.4.1. Prueba de Salkowski:

Similar a la prueba de Liebermann-Buchard, la muestra (1-2 mg) en 1 ml de cloroformo se puso en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, en el caso de saponinas se obtienen coloraciones que van de amarillo a rojo.

4.6.4.2. Prueba de Liebermann-Burchard:

Ha experimentado numerosas modificaciones; así, se mezcló 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió a 0 °C y se les añadió una gota de ácido sulfúrico.

Una porción de este reactivo se puso en contacto con la sustancia. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etcétera los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva (Domínguez, A. X., 1988)

4.7. Determinación del efecto del 25, 50, 75 y 100% de la CMI.

Se inocularon tubos con caldo CD con diferentes concentraciones del extracto acuoso, metanólico o etanólico de *A. americana*, *A. asperrima* o *A. striata* y 1×10^3 esporas de *A. flavus* o *A. parasiticus* por ml de medio. Se incubó por 7 días a temperatura ambiente. Los efectos de las diferentes concentraciones de extracto en el crecimiento normal del hongo se monitorearon por diferentes bioensayos microbiológicos, y mediciones de parámetros.

4.7.1. Observación por microscopía de luz de cultivos desarrollados en portaobjetos excavados.

Se esterilizaron cajas Petri de 150 x 10 con portaobjetos excavados y cubreobjetos sobre una base de gasa. Por otra parte se preparó una solución de extracto metanólico de *A. striata* diluido en agua destilada a concentración de 1:10 y una suspensión de esporas de *A. flavus* 1273 de tal manera que al inocular 50 ml de caldo CD diera una concentración de 1×10^3 esporas.

Se llenaron los portaobjetos excavados con 50 μ l de caldo CD, agregando el extracto a diferentes concentraciones 100, 75, 50 y 25 % de la CMI para el crecimiento del hongo y se inoculó con las esporas.

Para evitar una desecación del medio se utilizó glicerol al 10% para humedecer la gasa en el fondo de la caja Petri. Se incubó a temperatura ambiente (28°C) por 7 días en obscuridad, debido a que la luz inhibe la producción de AF (Bennett, J. W., *et al*, 1978).

El control se sembró de igual manera pero con ausencia total del extracto. Una vez cumplido el tiempo de incubación se llevaron los portaobjetos excavados al microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss standard 25). Las muestras se observaron con el objetivo de 40X, por medio de un fototubo con 2.5X se tomaron fotografías con un aumento final de 100X para ilustrar la actividad de los extractos en contra del crecimiento del hongo.

4.7.2. Observación de cultivos por microscopía electrónica de barrido

Se prepararon tubos de 13x100 con 2 ml de caldo CD. Por otra parte se preparó una solución de extracto etanólico de *A. americana* diluido en agua destilada a una concentración de 1:10. También se preparó el inóculo de esporas de tal manera que en un volumen de 2 ml diera una concentración de 1×10^3 esporas. Finalmente se agregó el extracto a diferentes concentraciones desde 5 hasta 50 mg/ml a intervalos de 5, y se inocularon con esporas de tres cepas diferentes, en bioensayos por separado. Se incubó a temperatura ambiente (28°C) por 7 días en oscuridad.

Para observar el efecto del 75, 50 y 25 % de la CMI de los extractos metanólicos de *A. striata* y *A. asperrima* en el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* se prepararon tubos con volúmenes de caldo CD de 10 ml, utilizando un inóculo a una concentración final de 1×10^3 esporas/ml, posteriormente se incubó a 28°C por 7 días. Se prepararon cultivos con extractos metanólicos de *A. americana* aunque éstos no mostraran efecto inhibitorio para compararlos con los extractos que si tuvieran efecto inhibitorio, así como un control sin extracto.

Los cultivos fueron observados por microscopía electrónica de barrido por la técnica de fijación con vapores de osmio, para observar los efectos de los extractos en la morfología del hongo en comparación con el crecimiento del control. Los especímenes se colocaron en un contenedor de vidrio con cristales de OsO_4 o solución de éstos, sin permitir que el osmio se ponga en contacto directo con el objeto (Rosenbauer, K. A, and B. Kegel, 1978).

5. RESULTADOS:

5.1. Obtención de extractos:

Se obtuvieron extractos macerados en agua, etanol y metanol, con diferentes rendimientos (Tabla No. 3).

Planta	Extracto	Rendimiento %*
<i>A. striata</i>	Metanólico	6.5
	Etanólico	5.43
	Acuoso	5
<i>A. asperima</i>	Metanólico	4.82
	Etanólico	4.11
	Acuoso	4
<i>A. americana</i>	Metanólico	4
	Etanólico	3.05
	Acuoso	3

* g de extracto seco por 100 g de planta fresca.

5.2. Análisis preliminar de inhibición:

Se observó efecto inhibitorio del crecimiento de las 5 cepas de *Aspergillus* por el extracto metanólico de *A. aspergillum*. El extracto metanólico de *A. striata* produjo un efecto inhibitorio de la esporulación y del crecimiento de los hongos. El extracto

metanólico de *A. americana* no tuvo efecto inhibitorio aparente del crecimiento.

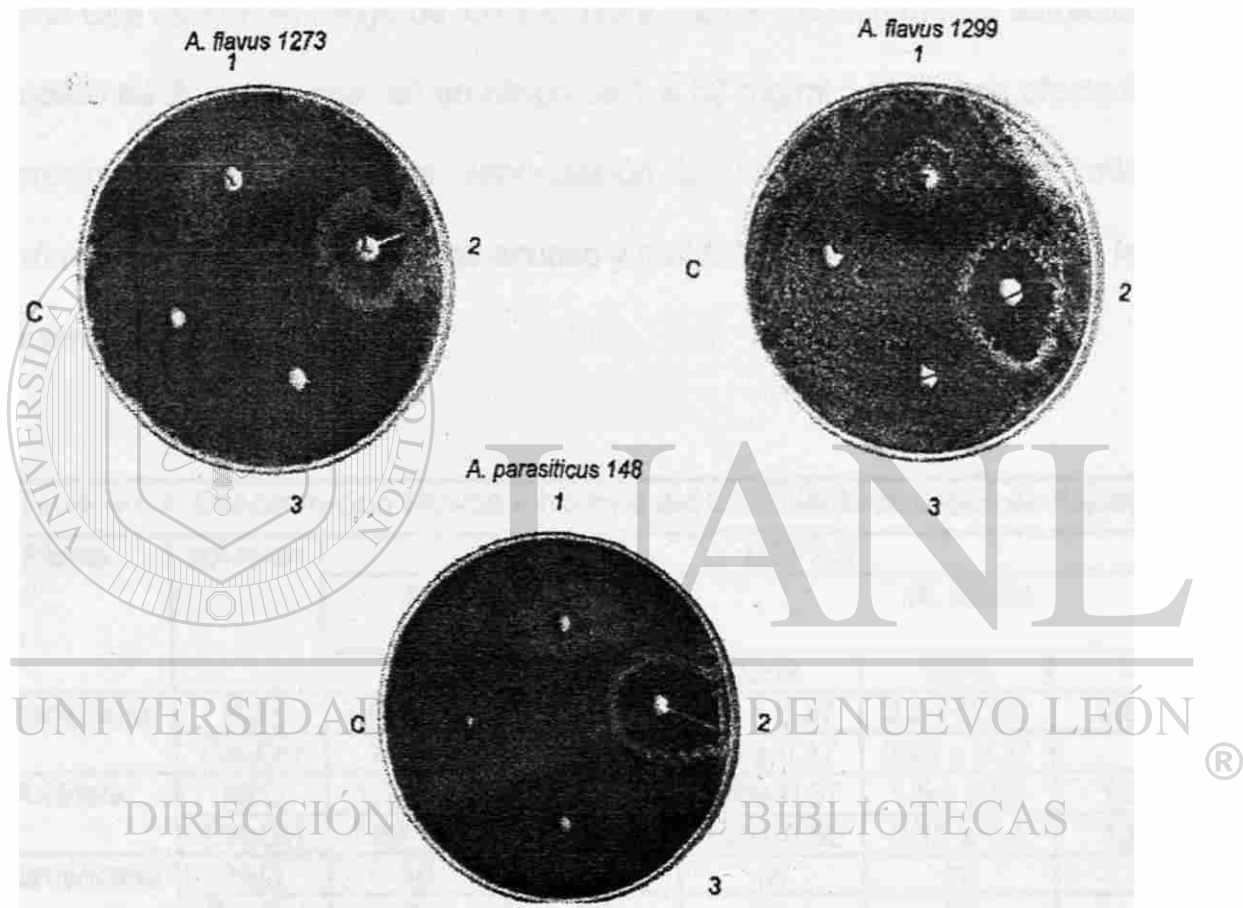


Figura No. 3. Halos de inhibición del crecimiento de *A. parasiticus* 148 y *A. flavus* 1299, 1273 por extractos metanólicos de: 1) *A. striata*, 2) *A. aspergillum* y 3) *A. americana*, en presencia de agua destilada estéril usada como control.

5.3. Concentración mínima inhibitoria.

El extracto acuoso de *A. aspergillum* tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria dentro del rango de 1.96 ± 0.9 a 2.8 ± 0.25 mg/ml, el extracto metanólico tuvo una CMI dentro del rango de 0.95 ± 0.37 a 1.5 ± 0.37 mg/ml; el extracto acuoso de *A. striata* tuvo una CMI dentro del rango de 1.3 ± 0.5 a 1.62 ± 0.37 mg/ml, el extracto metanólico tuvo una CMI dentro del rango de 1.8 ± 0.625 a 2.25 ± 0.62 mg/ml; los extractos acuoso metanólico de *A. americana* en un rango de 1 a 50 mg/ml no tuvieron efecto inhibitorio del crecimiento pero sí de la esporulación la cual se observó por microscopía electrónica de barrido; los extractos acuoso y metanólico de *A. tequilana* y *A. lechuguilla* no tuvieron efecto inhibitorio.

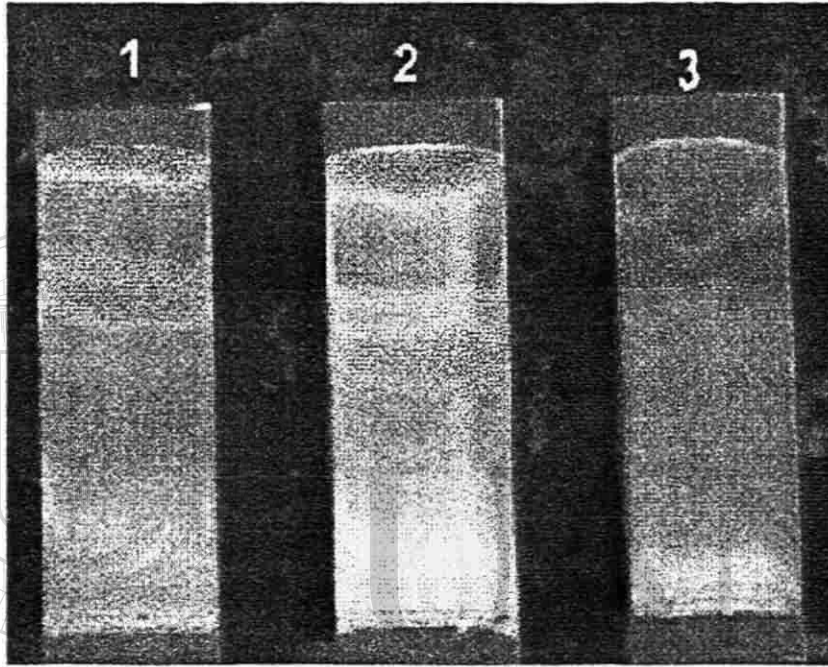
Tabla No. 4. Concentración Mínima Inhibitoria del crecimiento de cepas de *Aspergillus*

Planta	solvente	CEPAS				
		<i>A. parasiticus</i>		<i>A. flavus</i>		
		148	SU-1	1299	1273	1059
<i>A. aspergillum</i>	H ₂ O	2.6 ± 0.37	1.96 ± 0.9	2.6 ± 0.37	2.8 ± 0.25	2.6 ± 0.37
	CH ₃ OH	1 ± 0.5	1.3 ± 0.37	1.5 ± 0.37	0.95 ± 0.37	1
<i>A. striata</i>	H ₂ O	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.75	1.62 ± 0.37	1.5 ± 0.25	1.3 ± 1.25
	CH ₃ OH	$1.89 \pm .87$	2.12 ± 0.62	2.25 ± 0.62	2.15 ± 0.4	1.8 ± 0.62
<i>A. americana</i>	H ₂ O	NI	NI	NI	NI	NI
	CH ₃ OH	NI	NI	NI	NI	NI

5.4. Separación parcial del compuesto activo.

5.4.1. Cromatografía en capa delgada (CCD).

Se ilustra la CCD del extracto metanólico de los tres agaves con actividad inhibitoria después de iluminarlos con luz UV de 254-366 amp.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura No. 4. Separación del compuesto activo de los extractos metanólicos de 1) *A. americana* 2) *A. asperima* y 3) *A. striata*, por cromatografía en capa fina en placas de 2.5 x 7.5 cm, utilizando cloroformo : metanol 5:1 como fase móvil.

5.4.2. Autobiografía:

Después de realizar la CCD con ésta técnica se determinó cual de las bandas formadas era la que contenía el compuesto activo. La banda bioactiva fue la que causó un halo de inhibición en el crecimiento normal del hongo



Figura No. 5. Ilustración de la técnica de autobiografía

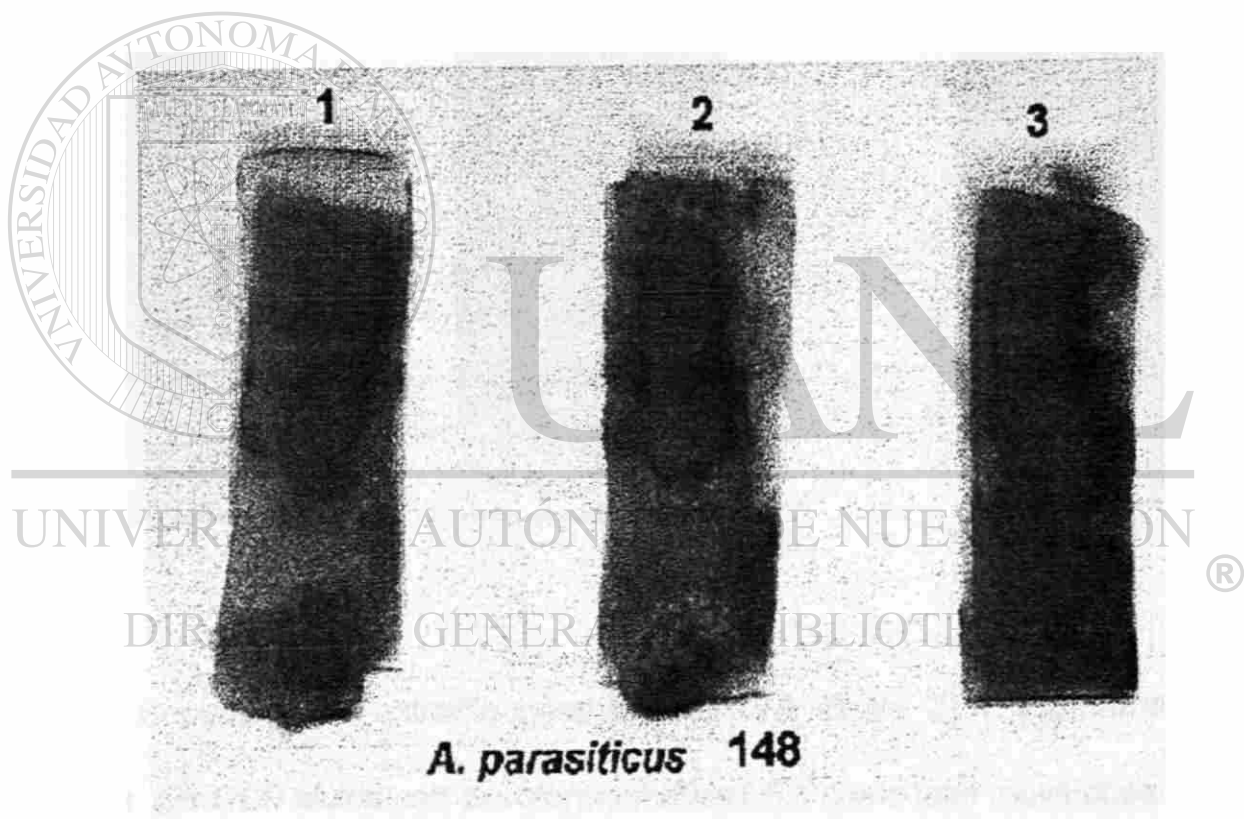
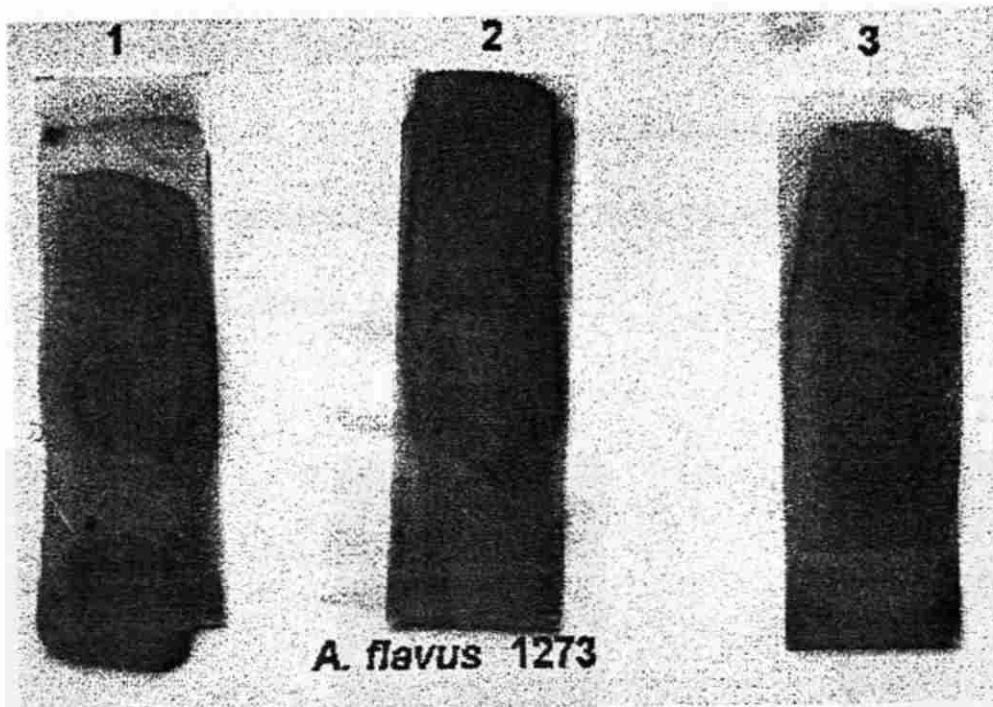


Figura No. 6. Identificación de la fracción activa contra el crecimiento de *A. flavus* 1273 y *A. parasiticus* 148, de las CCD hechas a los extractos metanólicos de 1) *A. striata*, 2) *A. asperima* y 3) *A. americana* por la técnica de autobiografía.

5.4.3. Cromatografía en capa preparativa (CCP).

Con esta técnica se obtuvo mayor cantidad del compuesto activo para pruebas posteriores. A continuación se ilustra la separación de los extractos metanólicos de *A. americana*, *A. asperima* y *A. striata*, por CCP.

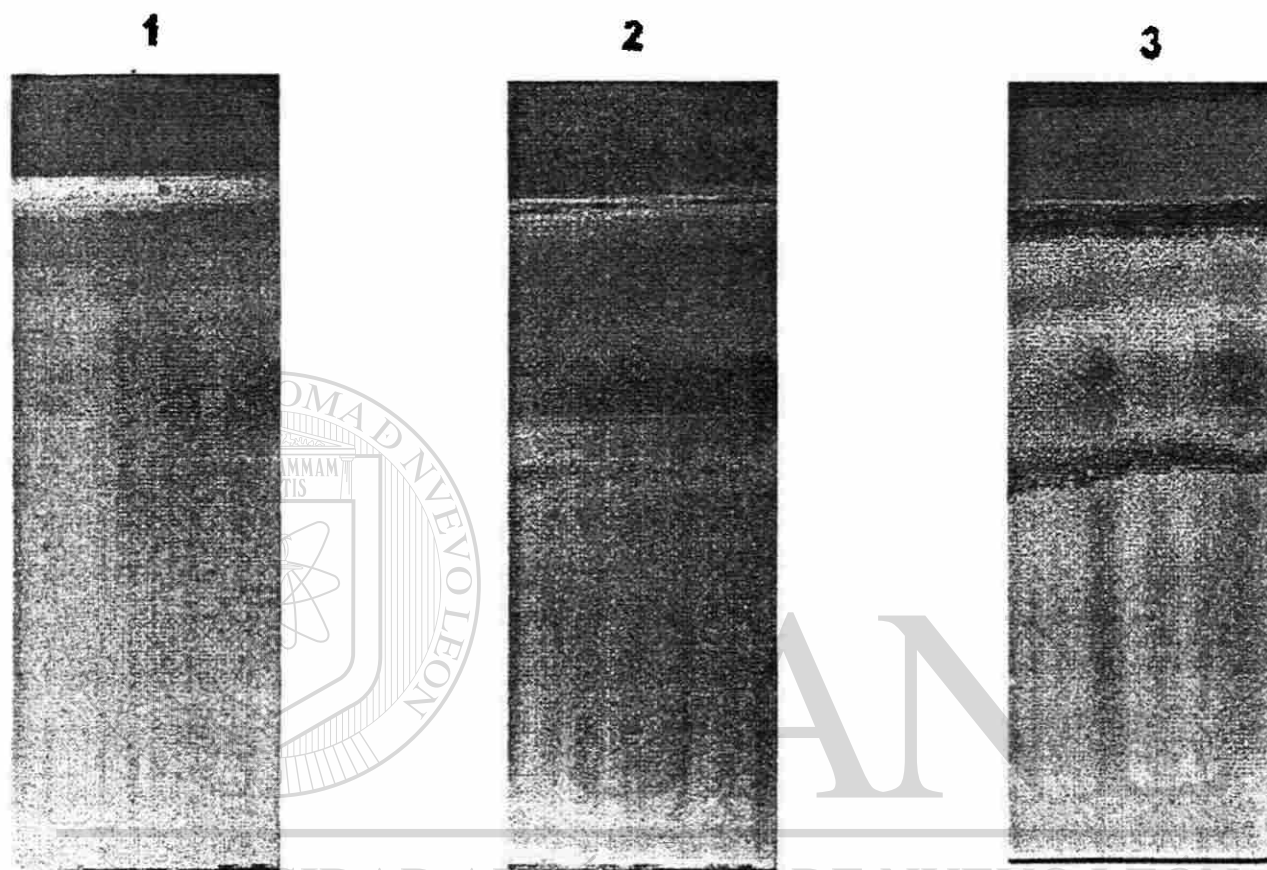


Figura No. 7. Separación del extracto metanólico de 1) *A. striata*, 2) *A. asperima* y 3) *A. americana* por CCP eluida con cloroformo:metanol 5:1 como fase móvil observado con luz UV de 254-366 amp.

Tabla No. 5. Rendimiento de la obtención de la fracción activa.

Planta	Extracto	Rendimiento %*
<i>A. striata</i>	Metanólico	2.5
<i>A. asperima</i>	Metanólico	1.6
<i>A. americana</i>	Metanólico	2.26

* mg de fracción activa por 100 g de extracto seco.

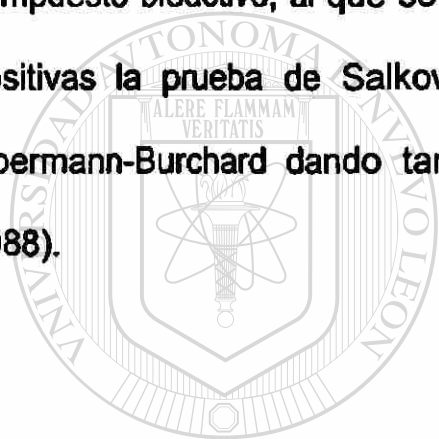
Tabla No. 6. Colores de bandas, Rf y efecto inhibitorio de las fracciones separadas.

Planta	Fracción	Color		Rf (%)	Efecto en el crecimiento
		UV	Luz Visible		
<i>A. asperima</i>	1	Blanca	Café	0.25	I
	2	Blanca	Blanca	0.33	NI
	3	Rosa	Blanca	0.56	NI
	4	Blanca	Blanca	0.66	NI
	5	Rosa	Blanca	0.72	NI
	6	Blanca	Amarillo	0.77	NI
	7	Blanca	Blanca	0.87	NI
	8	Rosa	Verde	0.95	NI
<i>A. americana</i>	1	Blanca	Café	0.24	IE
	2	Rosa	Verde	0.65	NI
	3	Rosa	Blanca	0.73	NI
	4	Blanca	Café	0.89	NI
	5	Rosa	Verde	0.97	NI
<i>A. striata</i>	1	Blanca	Café	0.4	I
	2	Rosa	Blanca	0.77	NI
	3	Rosa	Blanca	0.91	NI
	4	Rosa	Blanca	0.98	NI

Nota: I: Inhibición del crecimiento, NI: No Inhibición del crecimiento, IE: solo inhibición de la esporulación del hongo.

5.4.4. Determinación de saponinas.

De los tres tipos de macerado que se realizaron: acuoso, etanólico y metanólico con *A. asperima*, *A. americana*, y *A. striata*, el extracto metanólico fue el que provocó mayor inhibición del crecimiento normal del hongo. Además en las diferentes etapas de obtención de los macerados se producía el efecto de burbuja que perdura como panal de abejas y dura más de 5 min. en desaparecer. Una vez identificada la fracción activa por autobiografía, se realizó CCP para obtener mayor cantidad de este compuesto bioactivo, al que se le realizó dos pruebas para confirmar saponinas dando positivas la prueba de Salkowski con una coloración rojo ladrillo y la prueba de Libermann-Burchard dando también una coloración rojo ladrillo (Domínguez, A. X., 1988).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.5. Determinación del efecto del 25, 50, 75 y 100% de la CMI

5.5.1. Observación por microscopía de luz de cultivos desarrollados en portaobjetos excavados.

Los extractos de *A. aspergilla* y *A. striata* tuvieron efecto inhibitorio del crecimiento de *A. flavus* 1273 y *A. parasiticus* 148 y su comportamiento en la variación de la CMI fue muy parecido. El control típicamente muestra gran cantidad de conidioforos, en donde la vesícula es de tamaño normal cubierta con esterigmas que a su vez sostienen cadenas de conidios o esporas. Al 100% de la CMI de los dos extractos obviamente no hubo crecimiento del hongo. A 75 % de la CMI se observó extensas hifas vegetativas entrelazadas y entrecruzadas, sin producción de cabeza conidial, ni esporas. A 50 % de la CMI se observó cabezas conidiales reducidas en tamaño comparadas con el control, los esterigmas se observan deformados, y estos sostienen a lo mucho entre 5 y 10 conidios. A 25 % de la CMI se observó una cabeza aspergilar bien formada. Sin embargo no aparecen diferencias en la morfología o el tamaño de un conidioforo individual entre las cepas control y los bioensayos del 50 y 25% de la CMI.

El extracto de *A. americana* no inhibe el crecimiento de los hongos permitiendo crecimiento de micelio vegetativo a diferentes concentraciones, se probaron desde 0 mg/ml hasta 50 mg/ml con intervalos de 5 mg. En las siguientes ilustraciones se observan los efectos del 75, 50 y 25 % de la CMI de *A. striata* comparado con el control *A. flavus* 1273.

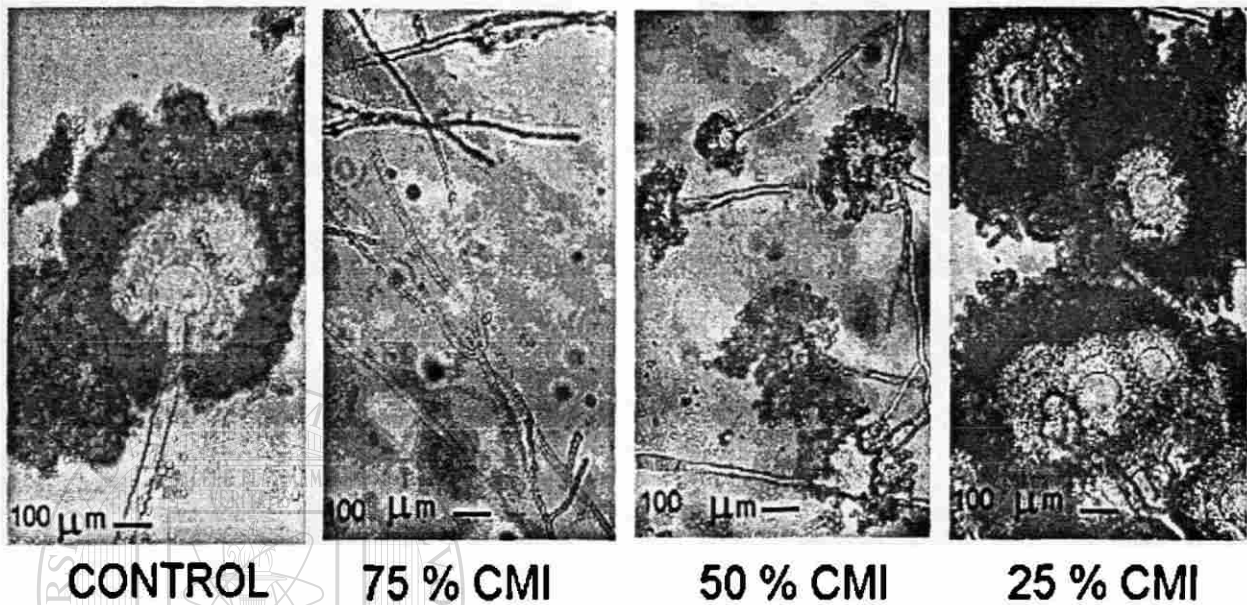


Figura No. 8. Efecto de la variación de la CMI del crecimiento de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio de contraste de fases a 100X

El control *A. flavus* 1273 mostró gran esporulación, grandes cadenas de conidios sostenidas por esterigmas unidos a la vesícula de tamaño normal. Se observaron extensas hifas vegetativas entrelazadas con gran reducción en la formación de conidióforos y ausencia de conidios. En el 50% de la CMI del crecimiento, se observó una morfología alterada, con una vesícula pequeña, reducción del número de esterigmas, elongados anormalmente, sosteniendo un número pequeño de conidios. En el caso de el 25% de la CMI, se observó una cabeza conidial bien formada, con esterigmas de tamaño normal y esporas.

5.5.2. Observación de cultivos por microscopía electrónica de barrido

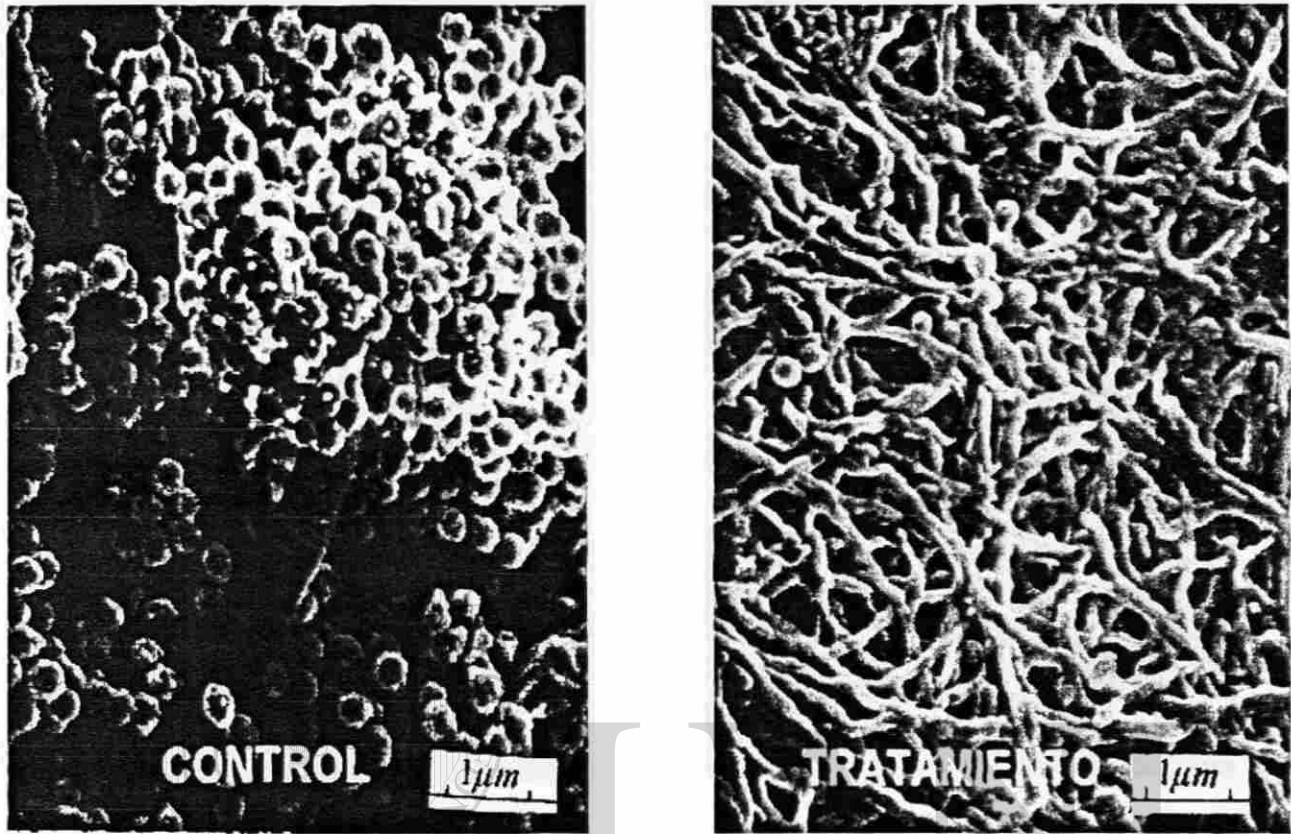


Figura No. 9. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control

Se observó el control *A. parasiticus* 148 con grandes cadenas de conidios que enmascaran los conidióforos y el micelio que está debajo. La producción total del tubo germinativo, la formación de cabeza conidial, como de esterigmas y esporas de *A. parasiticus* 148 se inhibió a 5 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana*, solo se observó crecimiento de micelio vegetativo. El extracto etanólico de *A. americana* no inhibió el crecimiento y desarrollo del hongo como micelio vegetativo pero si el proceso de esporulación.

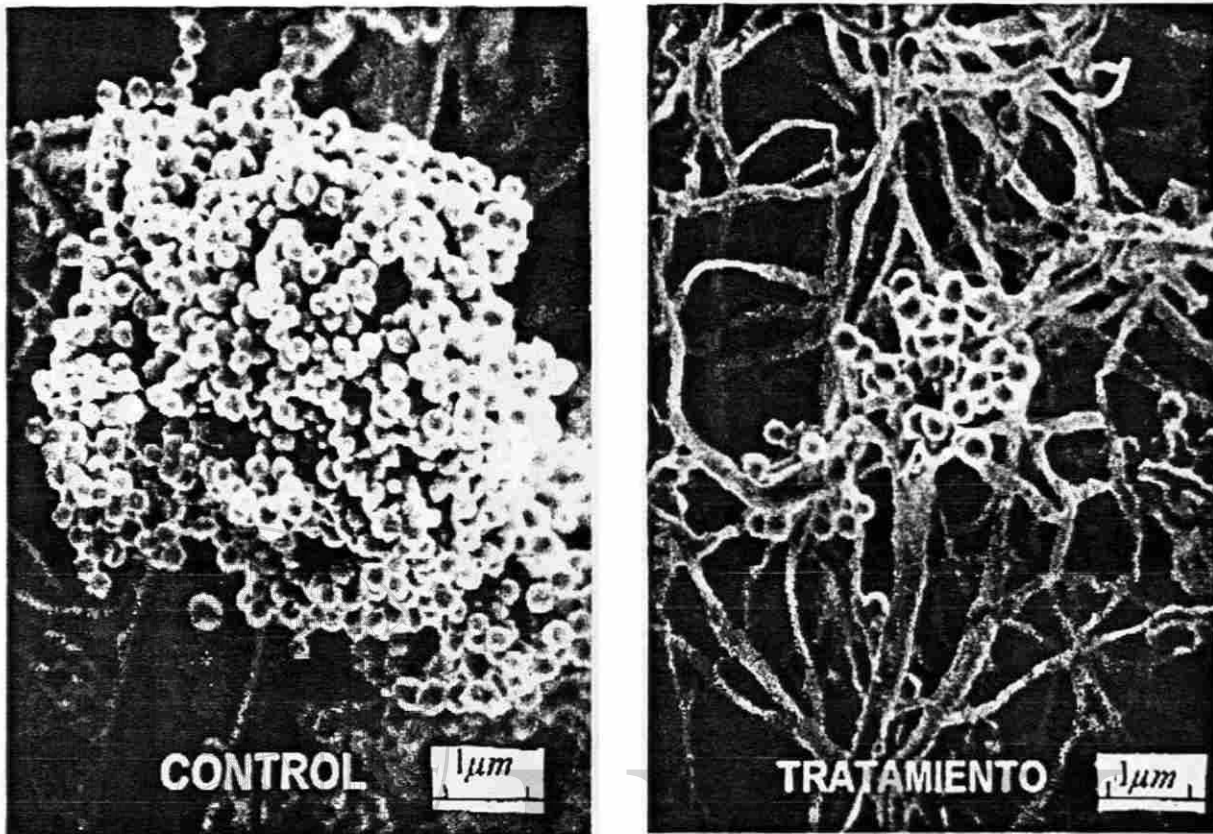


Figura No. 10. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La producción de esporas por *A. flavus* 1273 se inhibió a 50 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana*, solo se observó crecimiento de micelio vegetativo y en forma muy aislada se observó la formación de una cabeza conidial muy pequeña en tamaño comparada con el control, en el cual la forma de la cabeza conidial es radial y globosa, lo cual lo dicta el arreglo de las fialides o esterigma sobre la vesícula, y su tamaño, es decir, el tamaño de la cabeza conidial es determinado por el tamaño de la vesícula y la longitud de las cadenas conidiales.

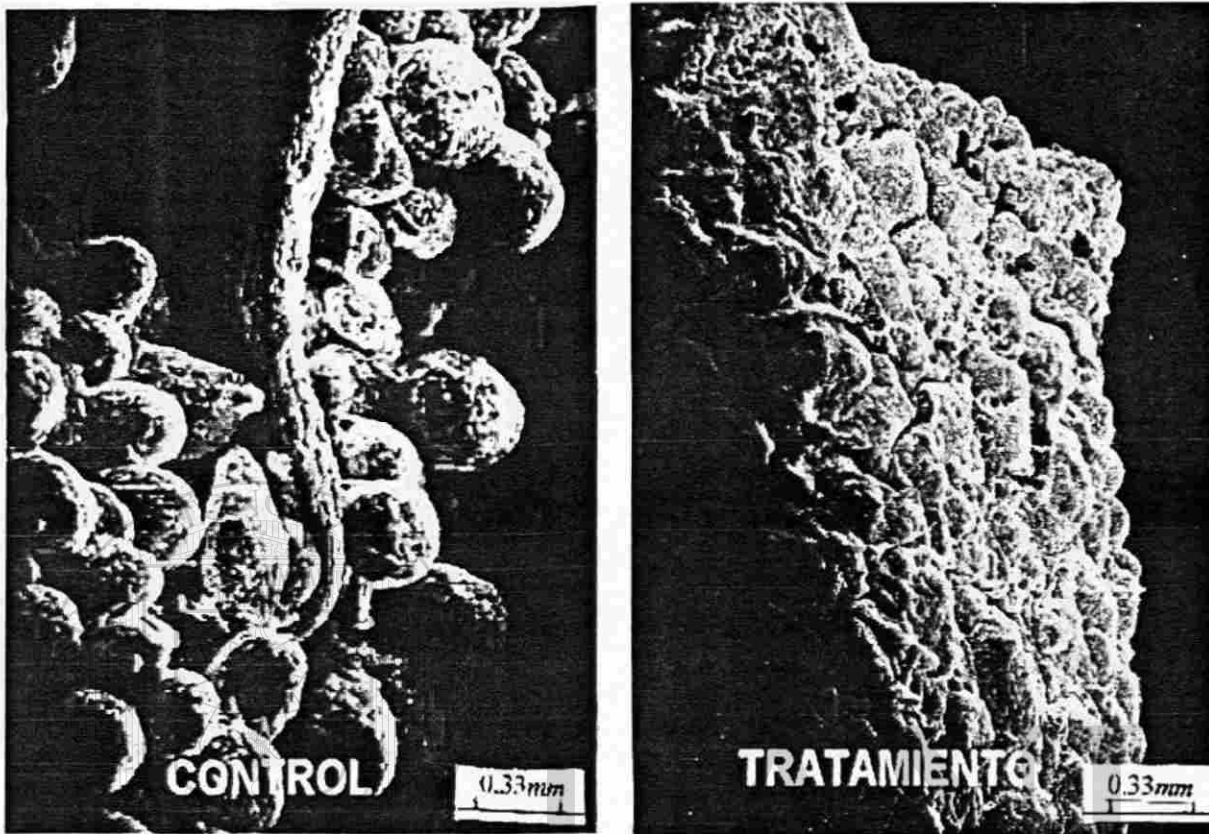


Figura No. 11. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 30X, comparado con el control.

El control *A. flavus* 1299 desarrolló esclerocios, los cuales son estructuras de sobrevivencia, que son utilizadas por los hongos para viajar con el polvo en el viento, formados por aglomeración de micelio, masas duras de micelio, compactos, redondos, varían en tamaño y forma (Gourama, H., and L. B. Bullerman, 1995). Se observó que *A. flavus* 1299 con concentraciones de 10 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana* desarrolló hifas vegetativas y una morfología alterada de lo que son los esclerocios.

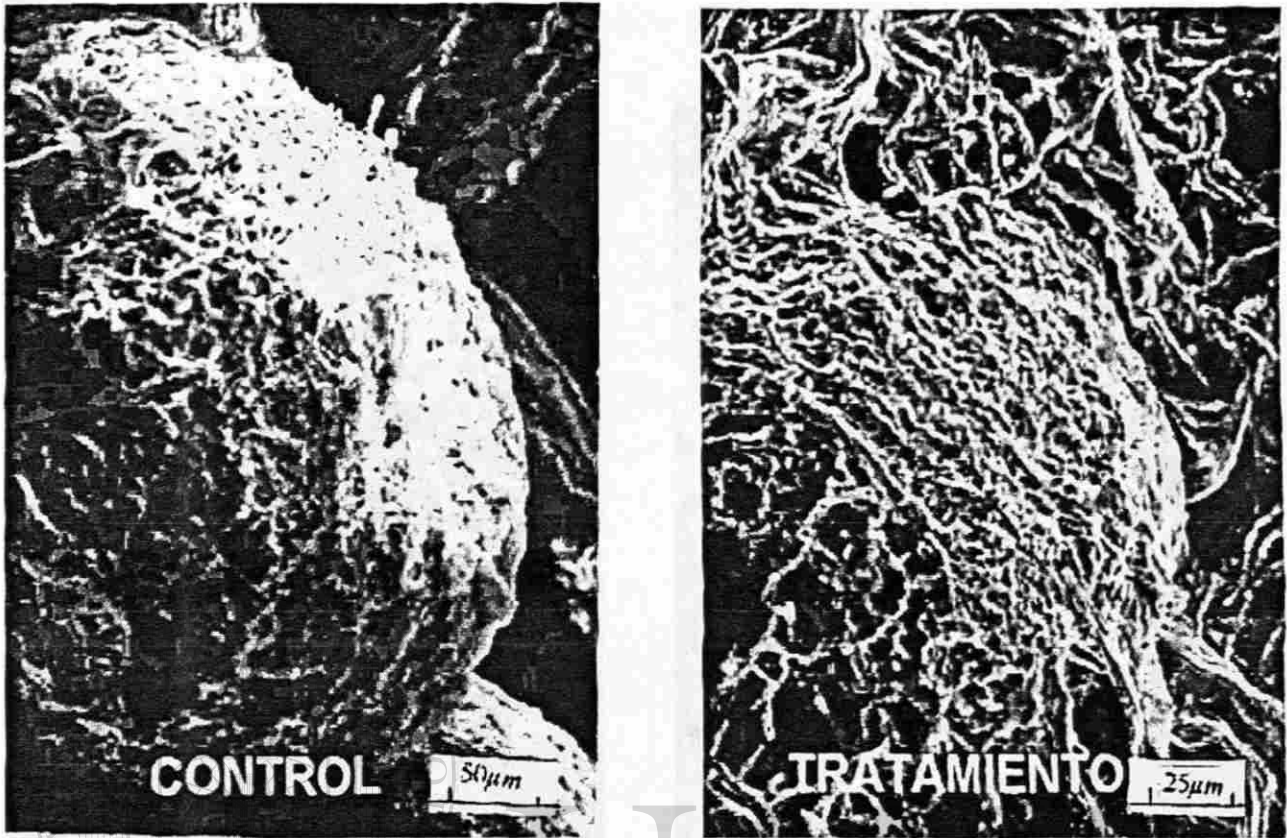


Figura No. 12. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 200X el control y 400X el tratamiento.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Esta es una magnificación mayor a la de la figura anterior, es decir, en un acercamiento que se hizo a 200X, se observó como el control desarrolló esclerocios firmes, redondos, estructuras multicelulares en reposo que normalmente no tienen esporas, también se observó que a 400X *A. flavus* 1299 con concentraciones de 10 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana* solamente desarrolló micelio vegetativo.

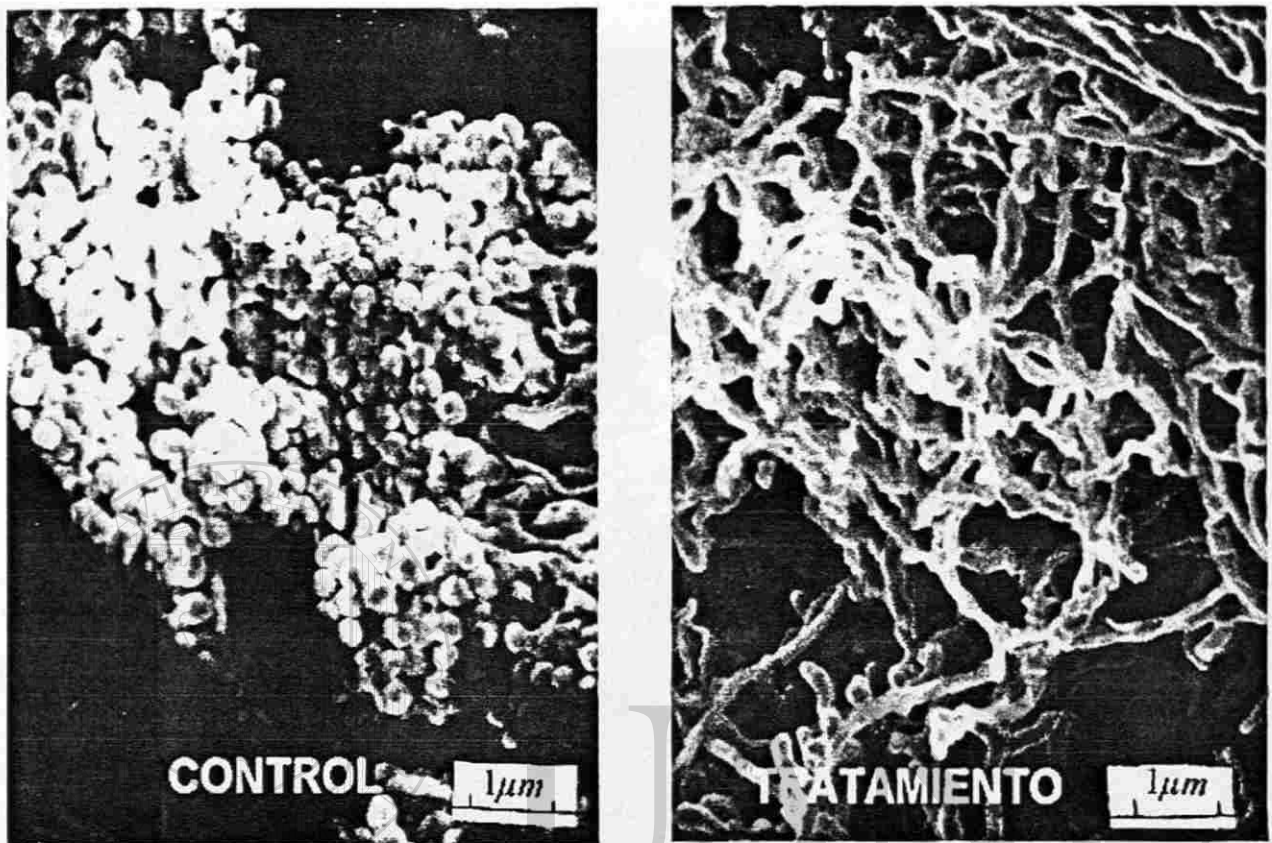


Figura No. 13. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control. DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Haciendo una magnificación mayor aún de las dos figuras anteriores, y enfocando la imagen en las partes de tejido contiguas a un esclerocio, se observó como en el control se llevó a cabo el proceso de esporulación, así como *A. flavus* 1299 creciendo con 10 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana* no lo desarrolló.

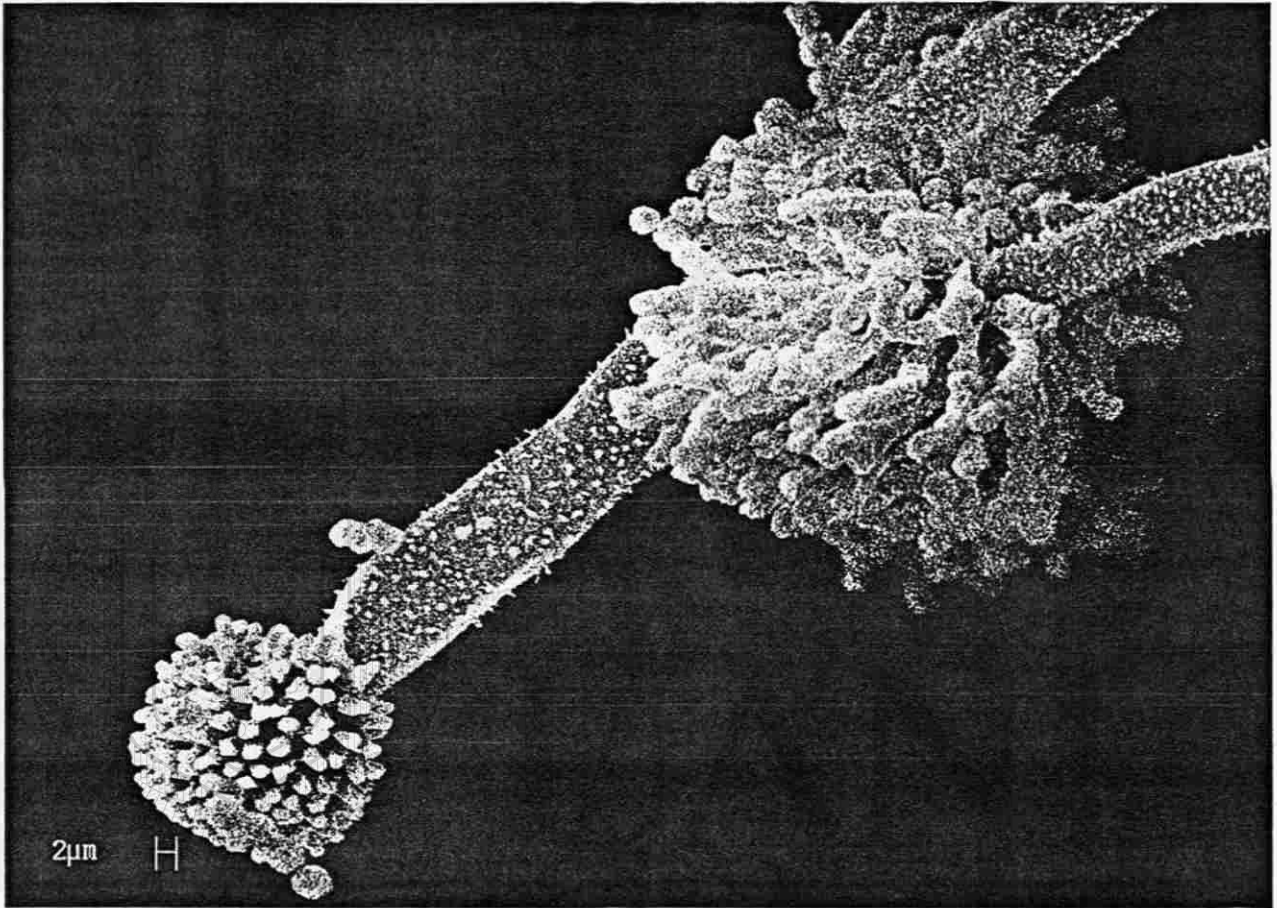


Figura No. 14. Control de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000 X.

La cepa de *A. flavus* 1273 fué inoculada en caldo CD por 7 días a 28°C, permitiendo el tiempo adecuado para completar el ciclo de reproducción asexual. Se tomaron fotografías al microscopía electrónica de barrido y se observó a una magnificación de 3000X gran esporulación, grandes cadenas de conidios.

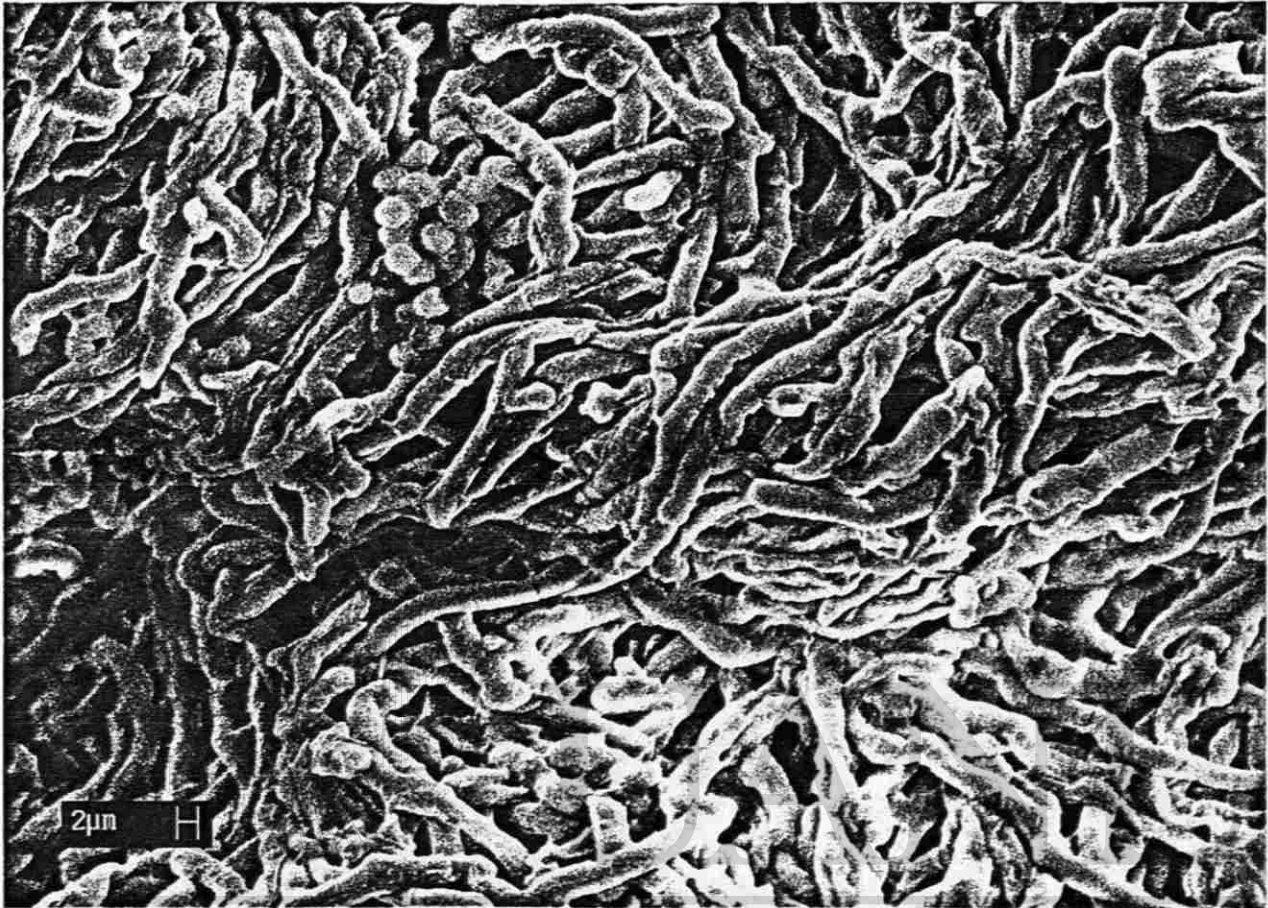


Figura No. 15. Efecto del 75 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperissima* en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000X.

Se observó extensas hifas vegetativas entrelazadas y entrecruzadas. No hay presencia de cabezas aspergiliares, ni esterigmas o esporas.

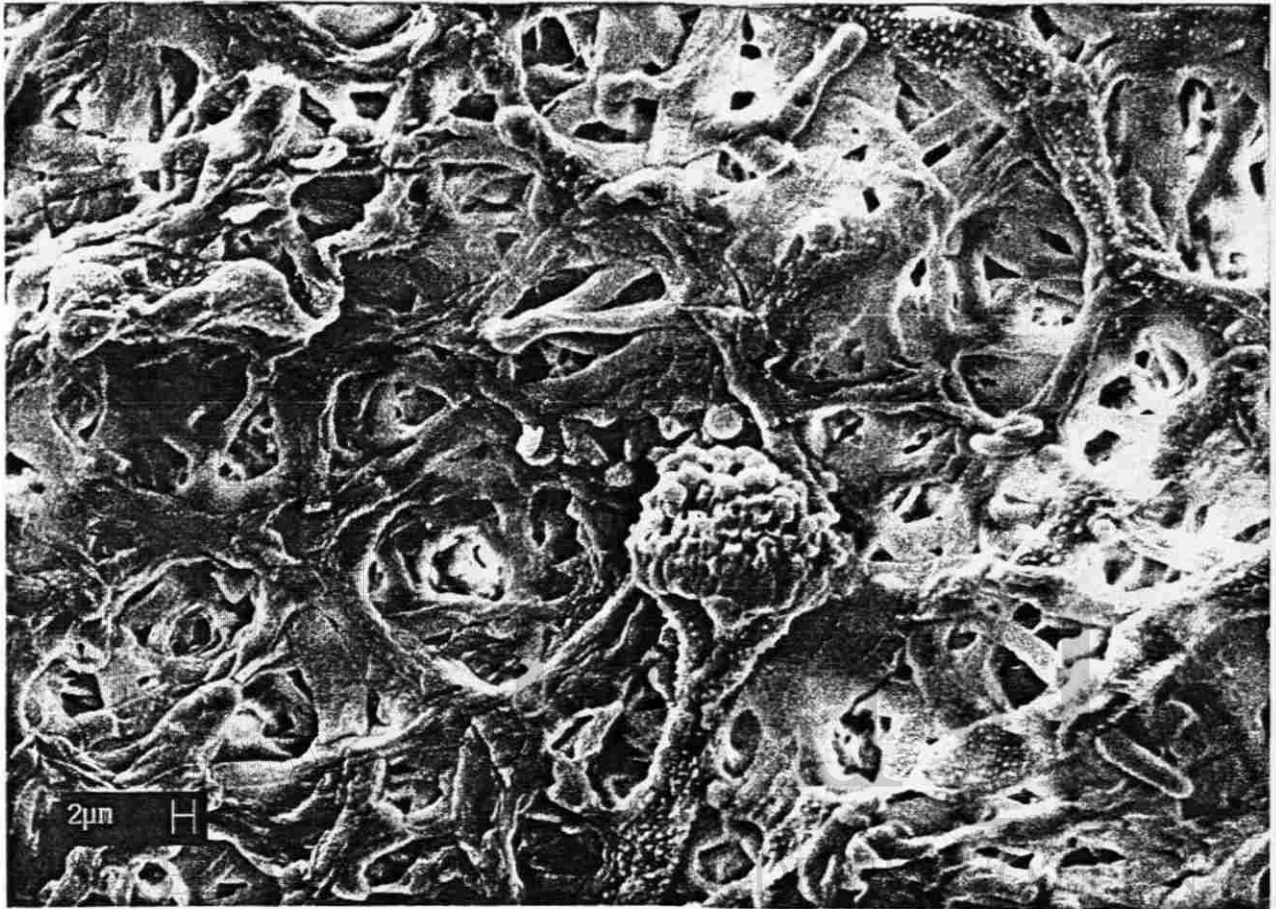


Figura No. 16. Efecto del 50 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrius*® en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000X.

Se observó una morfología alterada de micelio vegetativo, combinado con cabezas aspergiliares irregulares y alguna espóra aislada.

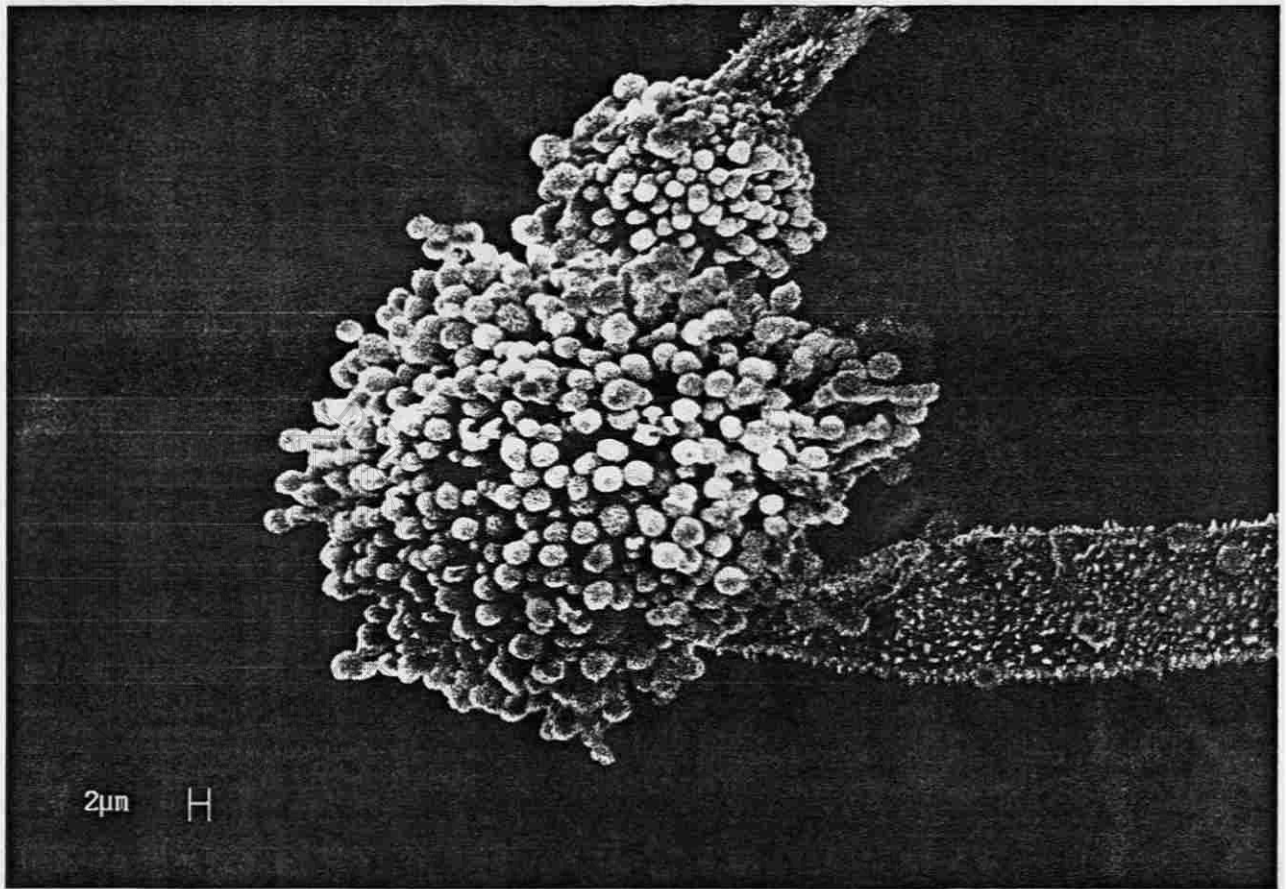


Figura No. 17. Efecto del 25 % de la CMI del extracto metanólico de *A. aspergillum*® en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000X.

Se observó cabezas aspergiliares, cadenas de esporas no muy largas, en esta concentración de extracto ya no causa demasiado daño al desarrollo de la morfología característica de *A. flavus*.

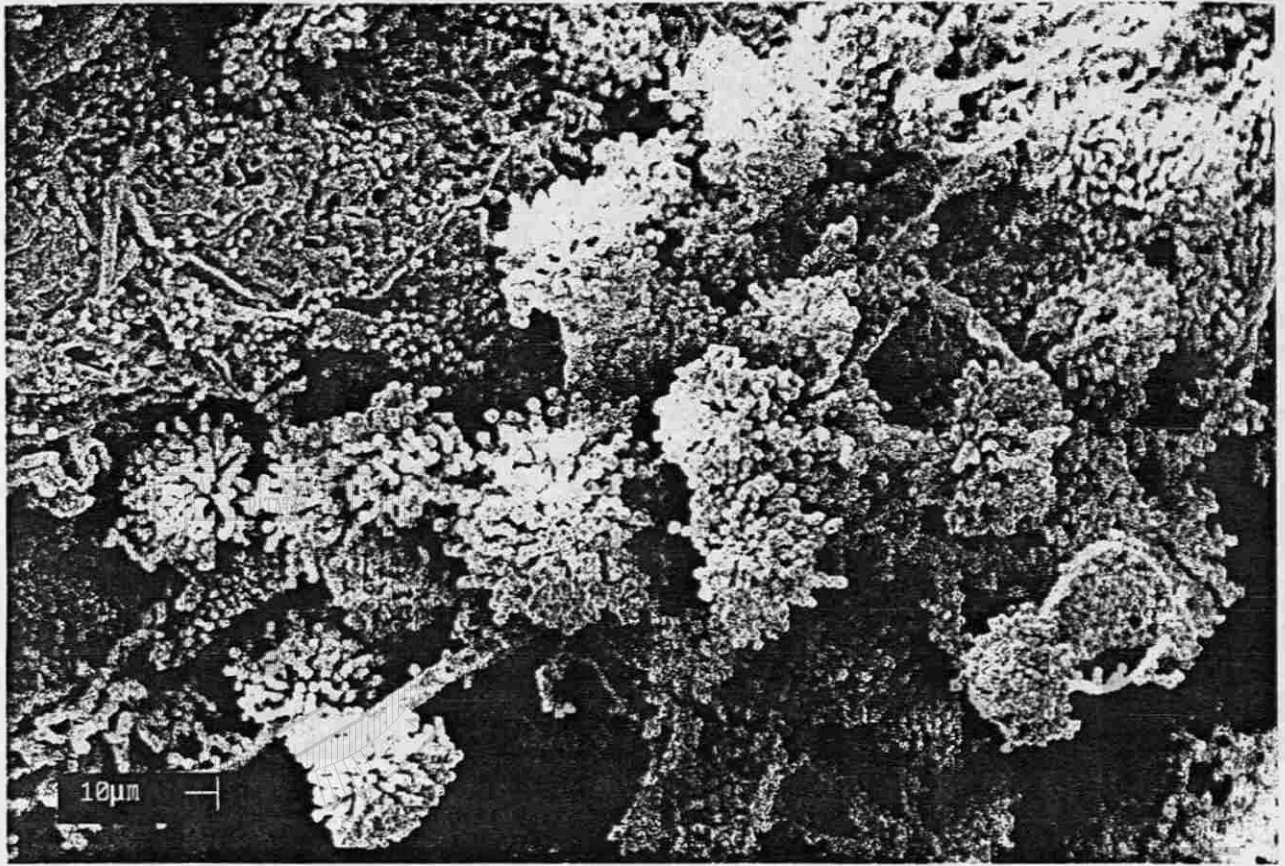


Figura No. 18. Control de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X.

La cepa de *A. parasiticus* 148 fué inoculada en caldo Czapek Dox por 7 días a 28°C, una vez transcurrido este tiempo, el cual es adecuado para completar el ciclo de reproducción asexual, se tomaron fotografías al microscopio electrónico de barrido y se observó a una magnificación de 1000X, aglomeración de cabezas aspergílicas con gran esporulación, cadenas de conidios que enmascaran los esterigmas de que están sostenidos, la vesícula y el micelio.

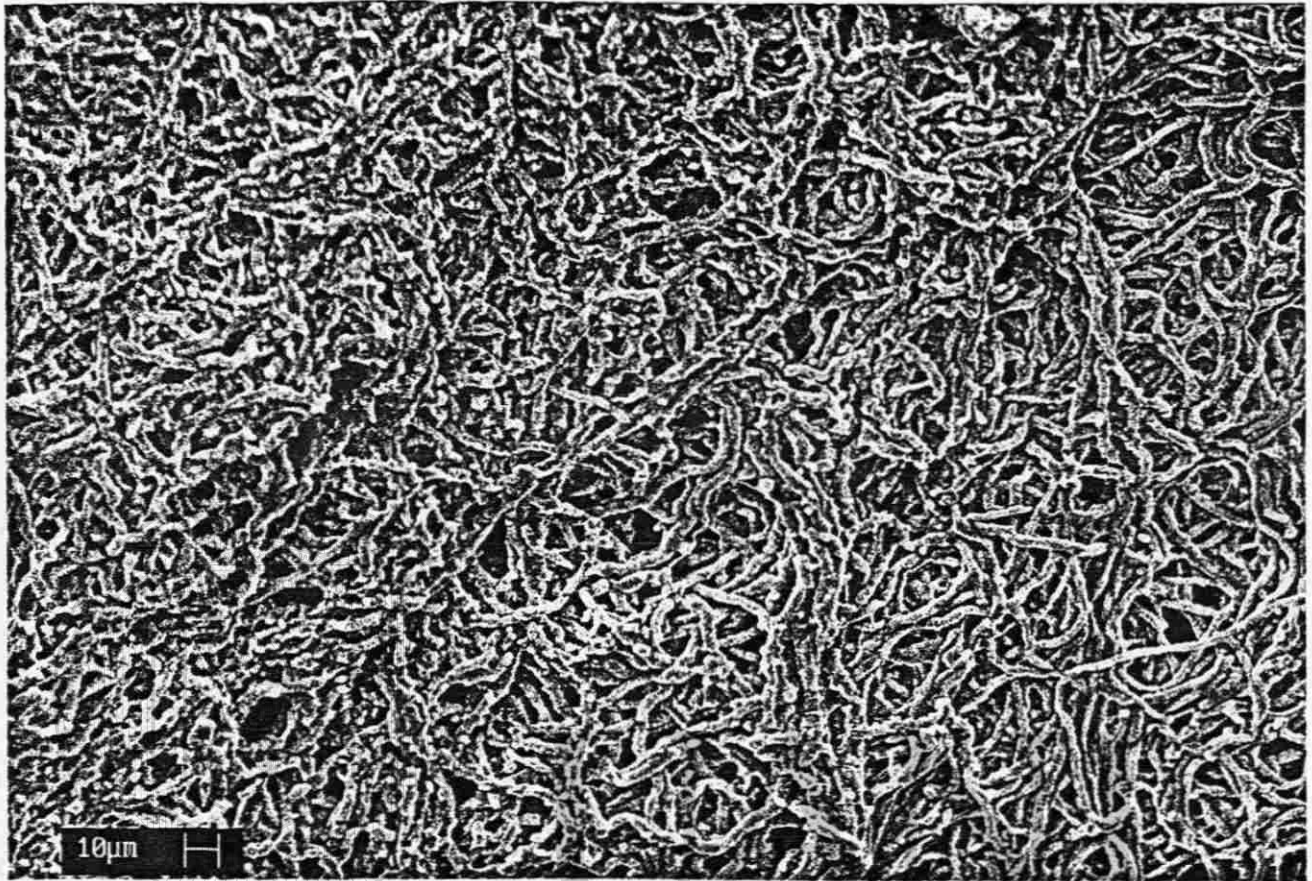


Figura No. 19. Efecto del 75 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperima* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X.

Se observó micelio vegetativo entrelasado y entrecruzado, no hubo presencia de cabezas conidiales o esterigmas.

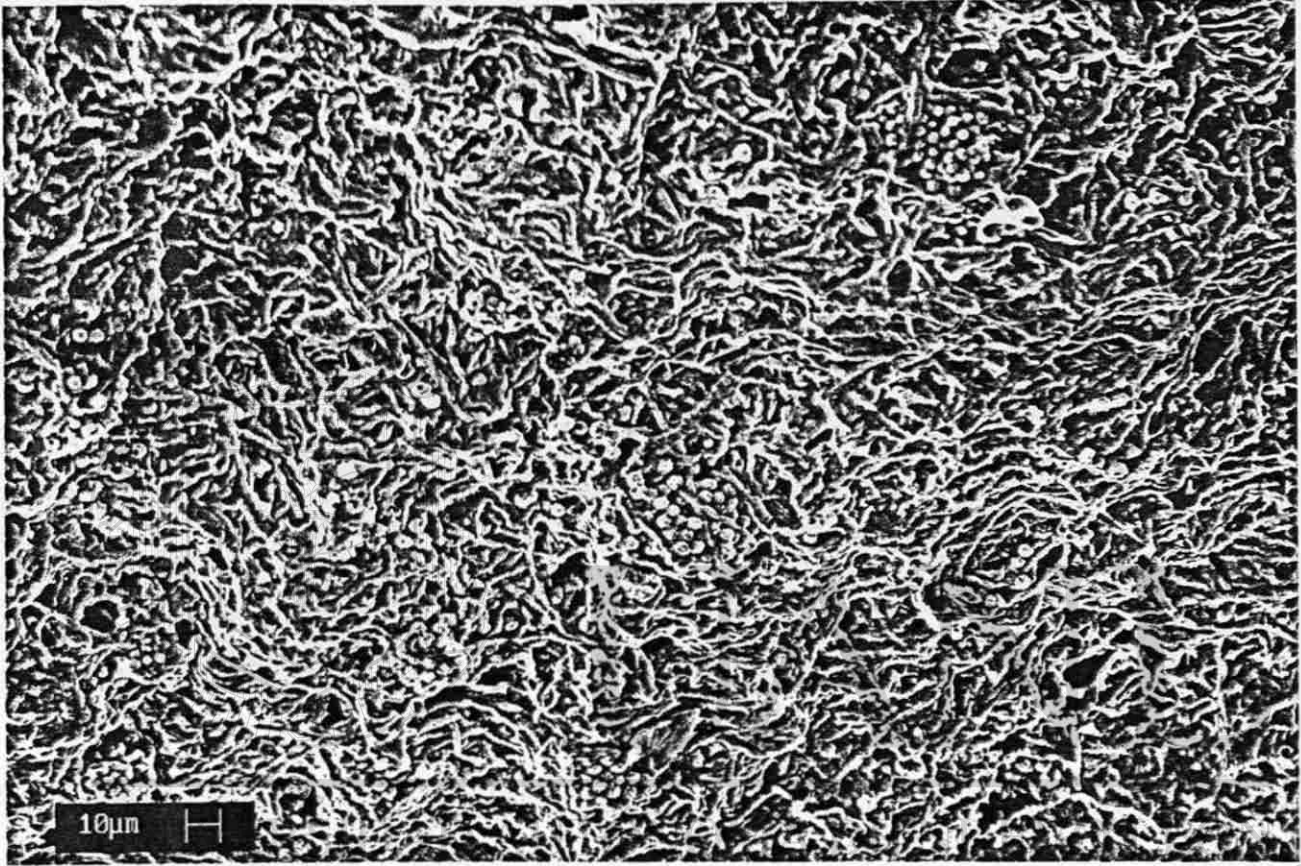


Figura No. 20. Efecto del 50 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperima* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X.

Se observó micelio vegetativo mezclado con un sinnúmero de esporas, no hubo presencia de cabezas conidiales o esterigmas.

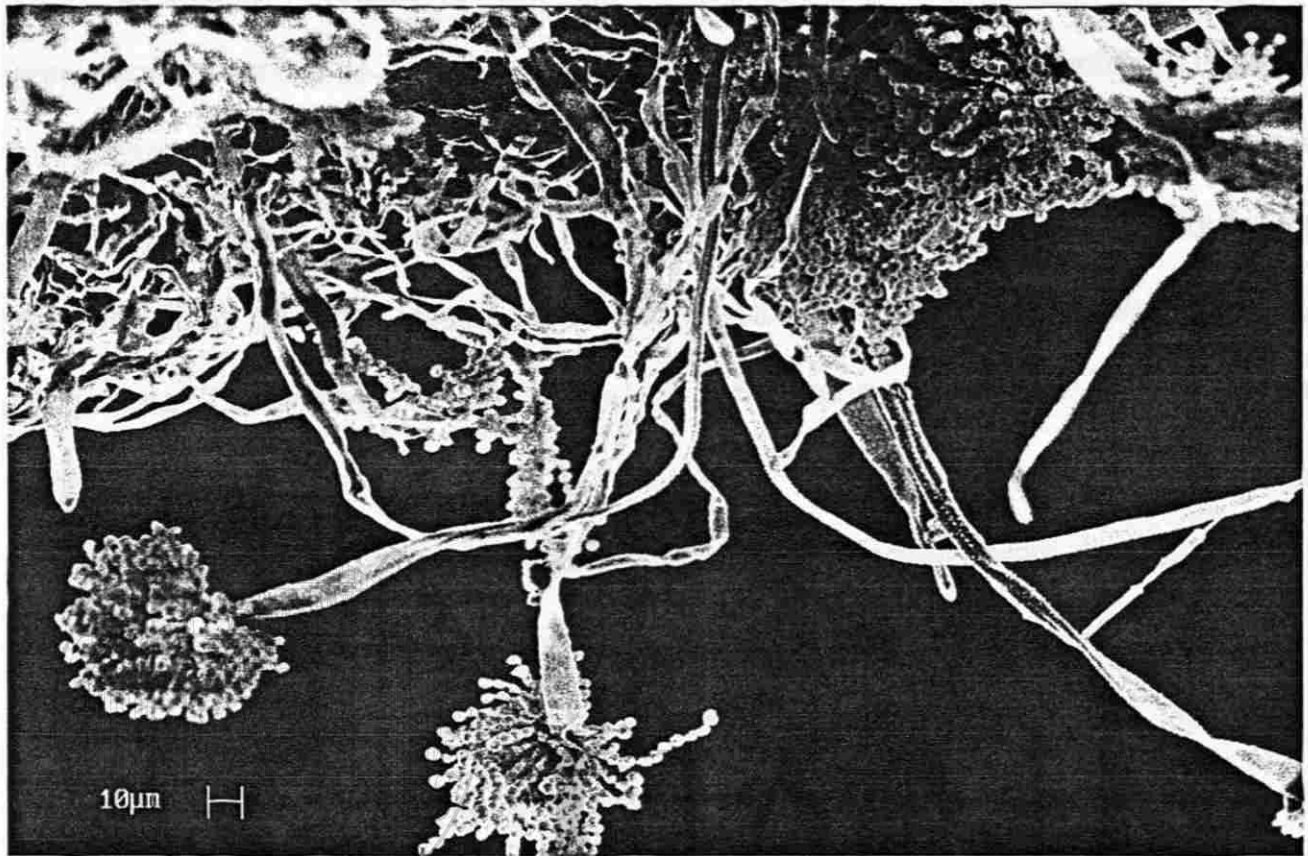


Figura No. 21. Efecto del 25 % de la CMI del extracto metanólico de *A. aspergillum* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X

Se observó desarrollo de cabezas aspergiliares, en menor número comparado con el control. Las cabezas aspergiliares tienen una morfología irregular comparada con el control.

6. DISCUSIÓN.

Se evaluó vegetales del mismo género, para buscar efectos parecidos o iguales, como consecuencia de la extensa coincidencia de sus patrones genéticos. Entre los numerosos tipos de sustancias producidos por una planta, pueden o no encontrarse en un determinado vegetal; por su abundancia o ausencia, proporcionan a una planta características químicas útiles para su clasificación botánica o su aprovechamiento por el hombre (Domínguez, X. A., 1988). La zona noroeste de México corresponde a regiones áridas y semiáridas en donde existe una gran variedad de plantas que presentan una diversidad de adaptación a la sequía (Villarreal-Rivera, L, *et al*, 1991).

Se evaluaron 5 especies de Agaves para determinar su actividad antifúngica. Las CMI variaron dependiendo del tipo de extracto y de planta. El efecto de los extractos macerados de Agaves puede verse en tres grupos: En el primero (*A. asperima* y *A. striata*) *A. flavus* y *A. parasiticus* son totalmente inhibidos. En el segundo (*A. americana*) *A. flavus* y *A. parasiticus* retardan su crecimiento, posteriormente germinan y crece micelio a un limitado nivel de producción de esporas después de 7 días de incubación. En el tercero (*A. lecheguilla* y *A. tequilana*) *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden crecer similar a el control. En el tratamiento los macerados del primer grupo tienen buena persistencia, y su principio permanece activo para inhibir el crecimiento del hongo, de modo indefinido *in vitro*, es decir, si las condiciones permanecen estables.

La resistencia y sensibilidad de los hongos depende grandemente de la cepa o especie, también como del componente activo del compuesto. Especies diferentes de hongos pueden mostrar diferente respuesta al mismo compuesto, resultando en una reducción en el crecimiento en unos casos y no efecto en otros (Thompson, D. P., 1997). Por ello es importante ser capaz de determinar la resistencia de los hongos toxigénicos a los compuestos metanólicos. La actividad inhibitoria de *A. asperima* y *A. striata* del crecimiento sugiere que sus compuestos activos tienen un gran potencial para usarse como fungicidas naturales.

La técnica de microscopía de luz, fue indispensable para la MEB, de tal modo que se tomó ventaja de ésta técnica para asegurar un mejor entendimiento sobre la morfología del organismo, y sus estructuras (Mims, Ch. W., 1991).

La iniciación del desarrollo del conidióforo en hongos filamentosos como *A. flavus* y *A. parasiticus* es un proceso complejo. Los hongos filamentosos *A. flavus* y *A. parasiticus* se reproducen asexualmente, por la formación de una estructura multicelular compleja llamada conidióforo que sostiene cadenas de esporas unicelulares llamadas conidios. El desarrollo del conidioforo ocurre de manera radial, de tal manera que se vaya expandiendo la colonia, que consiste en el crecimiento vegetativo de hifas sobre el borde de la colonia así como de hifas que son diferenciadas en conidióforos (Wieser, J., *et al*, 1997).

Se ha reportado que las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que producen conidios y esclerocios son altamente productoras de AF (Garber, R. K., and P. J. Cotty, 1997), (Bennett, J. W., and P. C. Horowitz, 1979), Los esclerocios pueden representar una fuente importante de inóculo en campos de maíz continuamente cultivados (Wiclow, D. T., and B. W. Horn, 1984). *A. flavus* 1299 como control presentó gran producción de esclerocios y creciendo con concentraciones de 10 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana* desarrolló micelio vegetativo y una morfología alterada de lo que sería un esclerocio en el control.

La biosíntesis de AF y el desarrollo del hongo parece compartir elementos regulatorios, o los elementos regulatorios de uno interactúan con los del otro (Brown, M. P., et al, 1999). La pérdida de esporulación está asociada con la pérdida de producción de AF (Guzmán de Peña D. and H. J Ruiz, 1997). Kale en 1996, observó la morfología de una cepa mutante de *A. flavus*, la cual producía un abundante micelio vegetativo, número reducido de conidióforos y conidios, además de esterigmas anormales y negativa producción de AF, así en las fotografías al microscopio electrónico de barrido se observó los tres tipos de comportamiento de los extractos en el desarrollo de la morfología de *A. flavus* y *A. parasiticus*, es decir, aquellos que inhiben el crecimiento a una determinada concentración de los extractos de *A. striata* y *A. aspergilla*, y que en la variación de la CMI, se ve alterado el proceso de formación de conidióforos, así como los extractos de *A. americana* que no inhiben el crecimiento de micelio vegetativo en un rango de 1 a 50 mg/ml, pero reprimen el proceso de esporulación y los extractos de *A. tequilana* y *A. lechuguilla* que no afectan dicho proceso, por lo que no hubo necesidad de analizares por MEB. En las cromatografías desarrolladas para cada extracto se detectó igual separación con los tres agaves con actividad antifúngica, ésta separación

fue tan solo preliminar, ya que es posible que cada banda esté compuesta por dos o más componentes. De igual modo, se determinó tener semejanza con las saponinas. Se recomiendan realizar estudios de caracterización de los compuestos activos en cada Agave sobre todo por ser plantas que se encuentran en la región del Desierto Chihuahuense, relativamente accesibles para su uso. Una vez separado su compuesto activo y con éste realizar estudios de campo, pueden llegar a utilizarse como inhibidores del crecimiento de hongos aflatoxigénicos.

Los estudios sugieren futuras investigaciones sobre si los extractos aquí estudiados son capaces bioquímicamente de biotransformar precursores de AF. Así como verificar la pérdida de expresión de una o ambas vías biosintéticas, la estructural o/y la regulatoria, para así poder hacer una correlación de las alteraciones morfológicas conidiales del hongo, con la regulación de la vía biosintética de AF, interrelacionando la regulación de la síntesis y la conidiogénesis.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7. CONCLUSIONES

En base al objetivo de determinar la influencia de extractos de *Agavaceas* sobre el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus*, y de los resultados obtenidos en el lab. se concluye que la hipótesis se cumplió parcialmente tomando en cuenta lo siguiente:

- 1.- Se detectó la presencia de una sustancia química inhibitoria contra *A. flavus* y *A. parasiticus* de las plantas *A. americana*, *A. asperrima* y *A. striata*.
- 2.- Los extractos acuoso, etanólicos y metanólicos de hojas de las plantas *A. americana*, *A. asperrima* y *A. striata* presentaron actividad biológica contra *A. flavus* y *A. parasiticus*, siendo el metanólico el de mayor eficacia.
- 3.- Los extractos acuoso, etanólico y metanólico de hojas de las plantas *A. asperrima* y *A. striata* muestran una correspondencia directa entre la concentración del extracto y la actividad biológica contra *A. flavus* y *A. parasiticus*.
- 4.- Los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *A. americana* permiten el crecimiento de micelio vegetativo en un rango de concentraciones de 1 a 50 mg/ml, cambiando la morfología del hongo de tal modo que no permitió la producción de conidióforos.
- 5.- Los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de hojas de las plantas *A. tequilana* y *A. lechuguilla* no presentaron actividad biológica contra *A. flavus* y *A. parasiticus*.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Acuña, A. K. 1991. Aflatoxinas en alimentos: su detección y cuantificación. Tesis. Facultad de Medicina, UANL, Capilla Alfonsina.
- Avila, J.G., J.G. de Liverant, A. Martínez, G. Martínez, J.L. Muñoz, A. Arciniegas, A. Romo de Vivar. 1999. Mode of action of *Buddleja cordata cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 66:75-78.
- 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
- Bennett, J. W., and P. C. Horowitz. 1979. Production of sclerotia by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strain of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia*. 71(2):415-422.
- Bennett, J. W., F. A. Fernholz and L. S. Lee. 1978. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycology*. 70(1):104-116.
- Beuchat, L. R., and Golden, D. A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol*. 43:134.
- Bhatnagar, D., G. Payne, J. E. Linz, and T. E. Cleveland. 1995. *Biotechnology. Molecular biology to eliminate aflatoxins*. *Inform*. 6 (3):262 - 271.
- Brown, M. P., C. S. Brown-Jenco and G. A. Payne. 1999. Review. Genetic and molecular analysis of aflatoxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology*. 26:81-98.

- Bullerman, L. B. 1974. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. *J. Food. Sci.* 39:1163-1165.
- Bullerman, L. B., F. Y. Lieu and S.A. Soier. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 42(4):1107-1109.
- Cotty, P. J., P. Bayman, D. S. Egel and K. S. Elias. 1994. Agriculture, Aflatoxinas and *Aspergillus* in Powell K. A. (de), *The genus Aspergillus*. Plenum Press. N.Y. 1-27.
- Chu, F.S. 1991. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutation Research.* 259:291-306.
- Conner, E. D., 1993. Naturally occurring compounds (de) Antimicrobials in foods. 2da Ed. Edited by P. Michael Davidson y Alfred Larry Branen. Marcel Dekker, Inc. N.Y. 441-468.
- Danae. 1981. Enciclopedia de la ciencia y la técnica. Muntaner.
- Diener, U. L., and N. D. Davis. 1966. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology.* 56 (12): 1390-1393.
- Diener, U. L. and N. D. Davis. 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored Peanuts. *Journal of the American oil Chemists society.* 47:347-351.
- Diener, U. L., R. J. Cole, T. H. Sanders, G. A. Payne, L. S. Lee, and M. A. Klich. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:249-270.
- Domínguez, A. X. 1988. Métodos de investigación fitoquímica. 4ta reimpression. Limusa. 45-141.

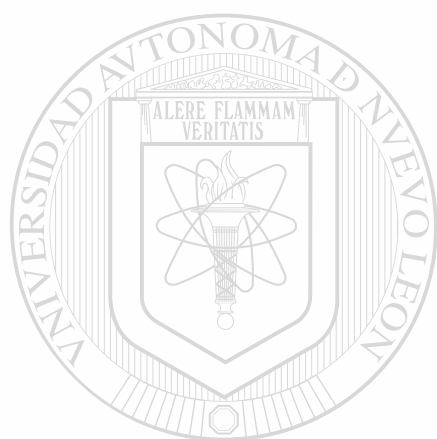
- Ellis, W. O., J.P. Smith, and B.K. Simpson. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30(3):403-439.
- Garber, R. K. and P. J. Cotty. 1997. Formation of sclerotia and aflatoxins in developing cotton bolls infected by the strain of *Aspergillus flavus* and potential for biocontrol with an aflatoxigenic strain. *Phytopathology*. 87(9):940-945.
- Garza, R. J. S., 1976, Aflatoxinas en productos derivados de algodón y cacahuete en el área de Monterrey. Facultad de Agronomía, UANL, Capilla Alfonsina.
- Ghosh, M. and K. Ulaganathan. 1996. Mature seeds of *Sorghum* contain protein toxic to aflatoxin-producing *Aspergillus flavus*. *J. Stored Prod. Res.* 32(4):339-343.
- Gourama, H. and L. B. Bullerman. 1995. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *Journal of food protection*. 58(12):1395-1404.
- Guzman de Peña D. and H. J. Ruiz. 1997. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*. 21:198-205.
- Hamburger, M.O. and G. A. Cordell. 1987. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. 50(1):19-22.
- Hitokoto, H., S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai, and I. Ueno. 1978. Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxigenic fungi. *Mycopathologia*. 66(3):161-165.

- Hocking, A. D. 1997. Toxigenic *Aspergillus* Species. Mycotoxigenic Molds. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat and Thomas J. Montville. ASM Press. Washington D.C. 391-405.
- Hostettmann, K. & J. L. Wolfender. 1997. The search for Biologically Active Secondary Metabolites. Pestic. Sci. 51:471-482.
- Jae-Hyuk, Y., R. A. E. Butchko, M. Fernandes, N. P. Keller, T. J. Leonard, T. H. Adams. 1996. Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. 29:549-555.
- Kale, S. P., J. W. Cary, D. Bhatnagar and J. W. Bennett. 1996. Characterization of experimentally induced, nonaflatoxigenic variant strains of *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol. 62(9):3399-3404.
- Klich, M. A., and J. I. Pitt. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Trans. Br. Mycol. Soc. 91(1):99-108.
- Kuiper-Goodman, T. 1995. Mycotoxins: risk assessment and legislation. Toxicology Letters. 82/83:853-859
- Lynch, M. J., S. S. Raphael, L. D. Mellor, P. D. Spare y M. J. H. Inwood. 1972. Métodos de laboratorio, 2da. Edición. Interamericana. México. 708-714.
- Lozano, G. L., 1997, Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas de *A. Flavus* Link ex Fries y *A. parasiticus* Speare. Tesis. Facultad de Biología, UANL.
- Mahasneh, A. M. and A. A. El-Oqlah. 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. Journal of Ethnopharmacology. 64:271-276.

- Mahoney, N. E. and S. B. Rodriguez. 1996. Aflatoxin variability in pistachios. *Appl. Environ. Microbiol.* 1642-1646.
- March, C., I. Sanz and E. Y. Primo. 1991. Antimicrobial activities on mediterranean plants. *Zentralbl. Mikrobiol.* 146: 291-295.
- Martínez-Vázquez, M., A. R. González-Esquinca, L. Cazares-Luna, M. N. Moreno Gutiérrez, A. N. García Argáez. 1999. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. *Journal of Ethnopharmacology.* 66:79-82.
- Mellon, J. E. 1992. Inhibition of aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by cotton ovule extracts. *JAOCS.* 69(9):945-947.
- Mims, Ch. W. 1991. Mycologia. Using electron microscopy to study plant pathogenic fungi. *Official Publication of the Mycological Society of America.* 83(1):1-19.
- Montes-Belmont, R., and M. Carvajal. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J. Food. Prot.* 61(5):616-619.
- Neucere, J. N. 1996. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth by silk extracts of resistant and susceptible corn. *J. Agric. Food Chem.* 44:1982-1983.
- Peña D. S. y B. M. Durán. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta, *Ciencia y desarrollo.* 16(94):61-73.
- Raper, K. B., and D. I. Fennell. 1965. *The genus Aspergillus.* Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. 686 p.
- Rippon, J. W. 1990. *Hongos y actinomicetos patógenos. Micología médica.* 3ra Ed. Interamericana Mc. Graw Hill.
- Rosenbauer, K. A, and Kegel B. H. 1978. *Rasterelektronenmikroskopische Technik. Preparationsverfahren in Medizin und Biologie.* Thieme. Stuttgart. 1-241.

- Shapira, R., N. Paster, O. Eyal, M. Menasherov, A. Mett, and R. Salomon. 1996. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3270-3273.
- Shreve, F., and I. L. Wiggins. 1980. *Vegetation and flora of the Sonoran Desert*, Vol. one, Stanford University Press.
- Taylor, J. W., 1995, Molecular phylogenetic classification of fungi. *Archives of Medical Research.* 26:307-314.
- Thompson, D. P. 1997. Effect of phenolic compounds on mycelial growth of *fusarium* and *penicillium* species. *Journal of food protection.* 60 (10):1262-1264.
- Valsaraj, R., P. Pushpangadan, U. W. Smitt, A. Adersen, U. Nyman. 1997. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology.* 58:75-83.
- Vargas-Aispuro. I., S. Araujo.Bernal y M.A.Martínez Téllez. 1998. Efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. *Revista mexicana de fitopatología.* 15(2):91-95.
- Verástegui, M. A., C. A. Sánchez, N. L. Heredia, J. S. García-Alvarado. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three mayor plants from the Chihuahuan Desert. *Journal of Ethnopharmacology.* 52:175-177.
- Verástegui, M. A. 1995. Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas. Tesis. Facultad de Biología. UANL.
- Villarreal, M. H. 1992. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis. UANL. Capilla Alfonsina.
- Villarreal-Rivera, L., E. Lozano-Maldonado & R. K. Maitti, 1991, Productividad de la fibra en hojas de *Agave lecheguilla* Torrey, en siete localidades de mina, Nuevo León, México. *Publicaciones Biológicas, FCB/UANL, México.* 5(2):23-26.

- Wheeler, M. H. and D. Bhatnagar. 1995. Inhibition of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* with pentachlorobenzyl alcohol, phthalide and Pyroquilon. *Pesticide biochemistry and physiology*. 52:109-115.
- Wheeler, M. H., D. Bhatnagar, and M. A. Klich. 1991. Effects of chlobenthiazone on aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 41:190-197.
- Wiclow, D. T., and B. W. Horn. 1984. *Aspergillus flavus* sclerotia form in wound-inoculated preharvest corn. *Mycologia*. 76(3):503-505.
- Wieser, J., J. Yu and T. H. Adams. 1997. Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet*. 32:218-224.
- Zeringue, H. J., Jr. 1997. Volatile antifungal compounds in maize kernels: effect of ear position on aflatoxin production. *Journal of AOAC International*. 80 (2):341-344.
- Zeringue, H. J., Jr. and D. Bhatnagar. 1994. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 60(10):3543-3547.
- Zeringue, H. J., Jr. and S. P. McCormick. 1990. Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus* incubated in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. *Toxicol*. 28(4):445-448.
- Zeringue, H. J., Jr. and S. P. McCormick. 1989. Relationships between cotton leaf-derived volatiles and growth of *Aspergillus flavus*. *JAOCS*. 66(4):581-585.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®