5. RESULTADOS:

5.1. Obtención de extractos:

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

Tabla No. 3. Rendimiento de extractos macerados

Planta	Extracto	Rendimiento %*
A. striata	Metanólico	6.5
	Etanólico	5.43
	Acuoso	5
A. asperrima	Metanólico	4.82
	Etanólico	4.11
	Acuoso	4
A. americana	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. asperrima*. El extracto metanólico de *A. striata* produjo un efecto inhibitorio de la esporulación y del crecimiento de los hongo. El extracto

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

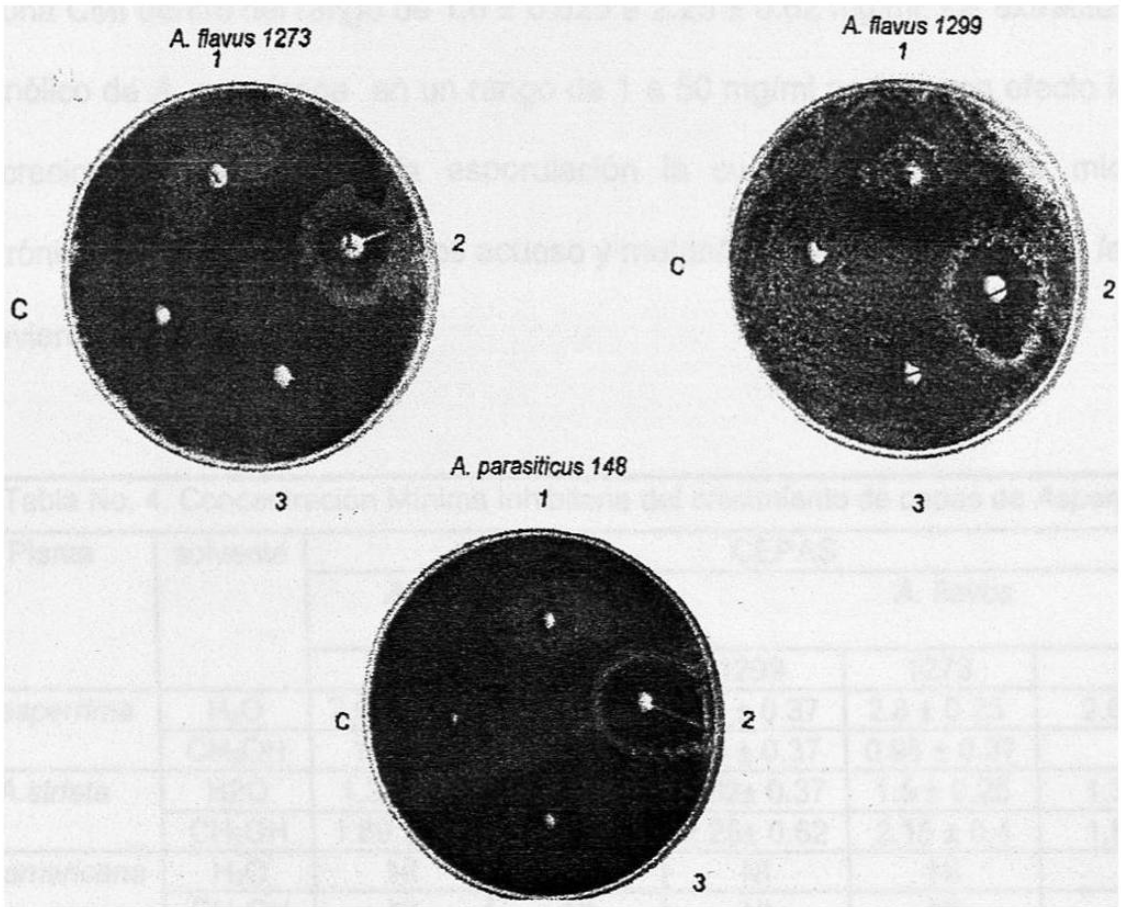


Figura No. 3. Halos de inhibición del crecimiento de *A. parasiticus* 148 y *A. flavus* 1299, 1273 por extractos metanólicos de: 1) *A. striata*, 2) *A. asperrima* y 3) *A. americana*, en presencia de agua destilada estéril usada como control.

5.3. Concentración mínima inhibitoria.

El extracto acuoso de *A. asperrima* 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				
		A. parasiticus		*A. flavus*		
		148	SU-1	1299	1273	1059
A.asperrima	H_2O	2.6 ± 0.37	1.96 ± 0.9	2.6 ± 0.37	2.8 ± 0.25	2.6 ± 0.37
	CH_3OH	1 ± 0.5	1.3 ± 0.37	1.5 ± 0.37	0.95 ± 0.37	1
A.striata	H2O	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.75	1.62± 0.37	1.5 ± 0.25	1.3 ± 1.25
	CH_3OH	1.89 ± .87	2.12±0.62	2.25± 0.62	2.15 ± 0.4	1.8 ± 0.62
A.americana	H_2O	NI	NI	NI	NI	NI
	CH_3OH	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.

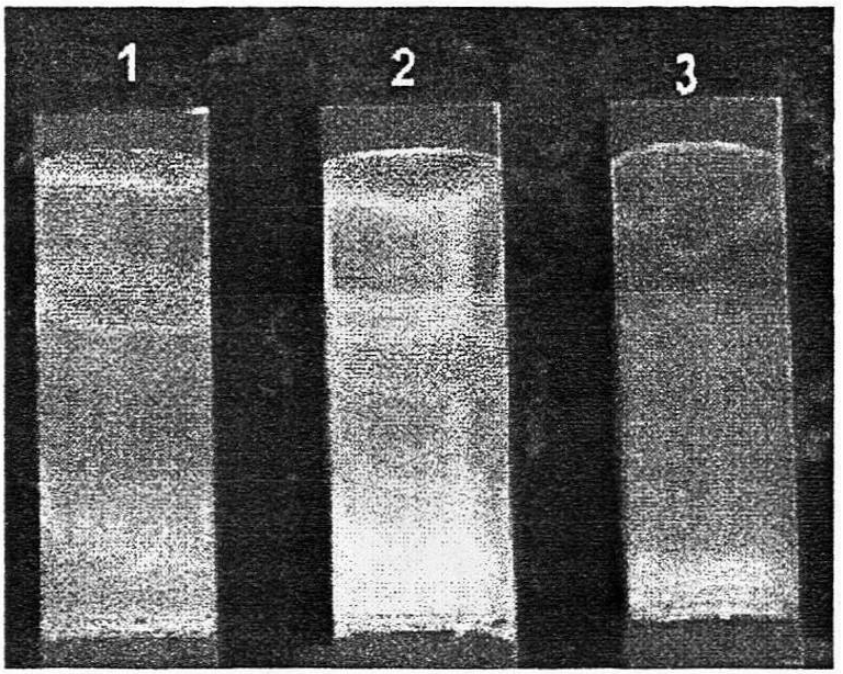


Figura No. 4. Separación del compuesto activo de los extractos metanólicos de 1) *A. americana* 2) *A. asperrima* y 3) *A. striata,* por cromatografía en capa fina en placas de 2.5 x 7.5 cm, utilizando cloroformo : metanol 5:1 como fase móvil.

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

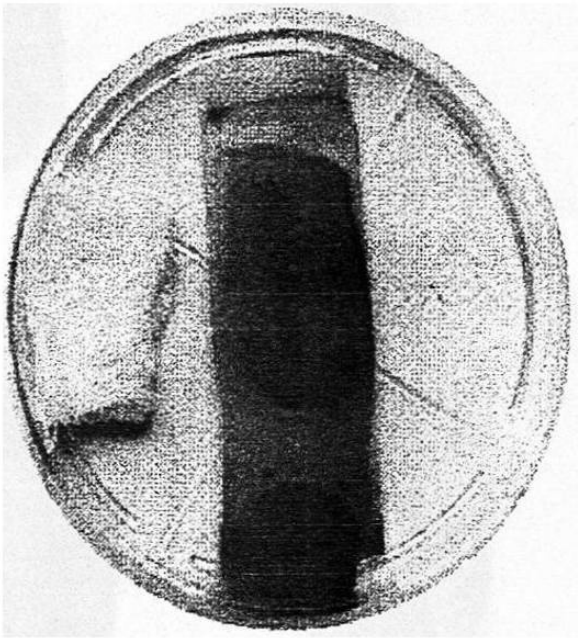
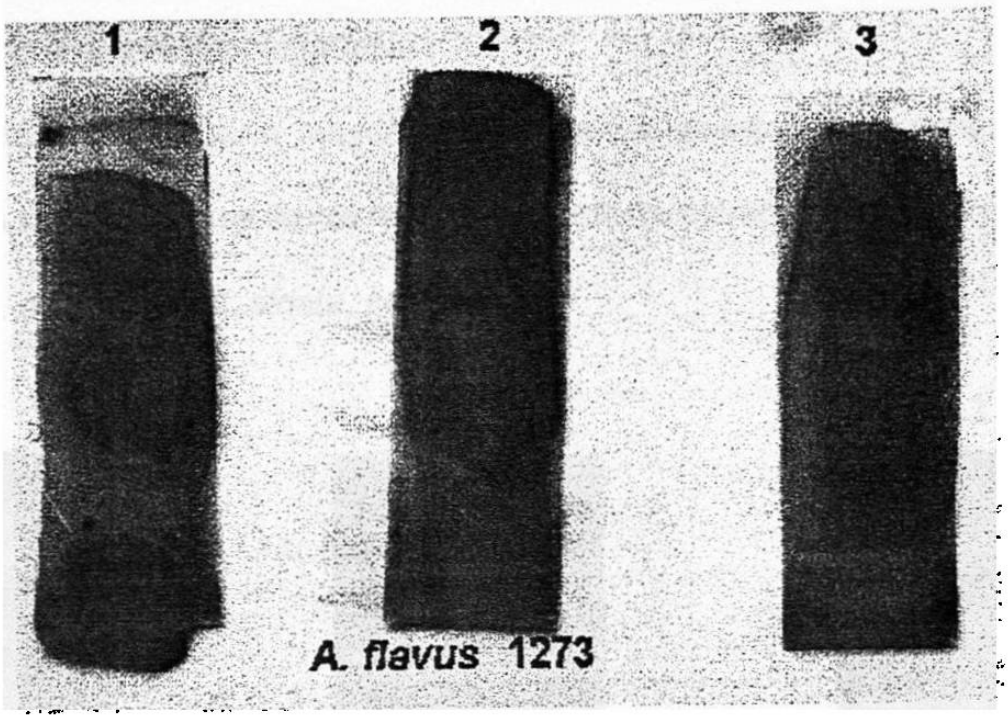


Figura No. 5. Ilustración de la técnica de autobiografía



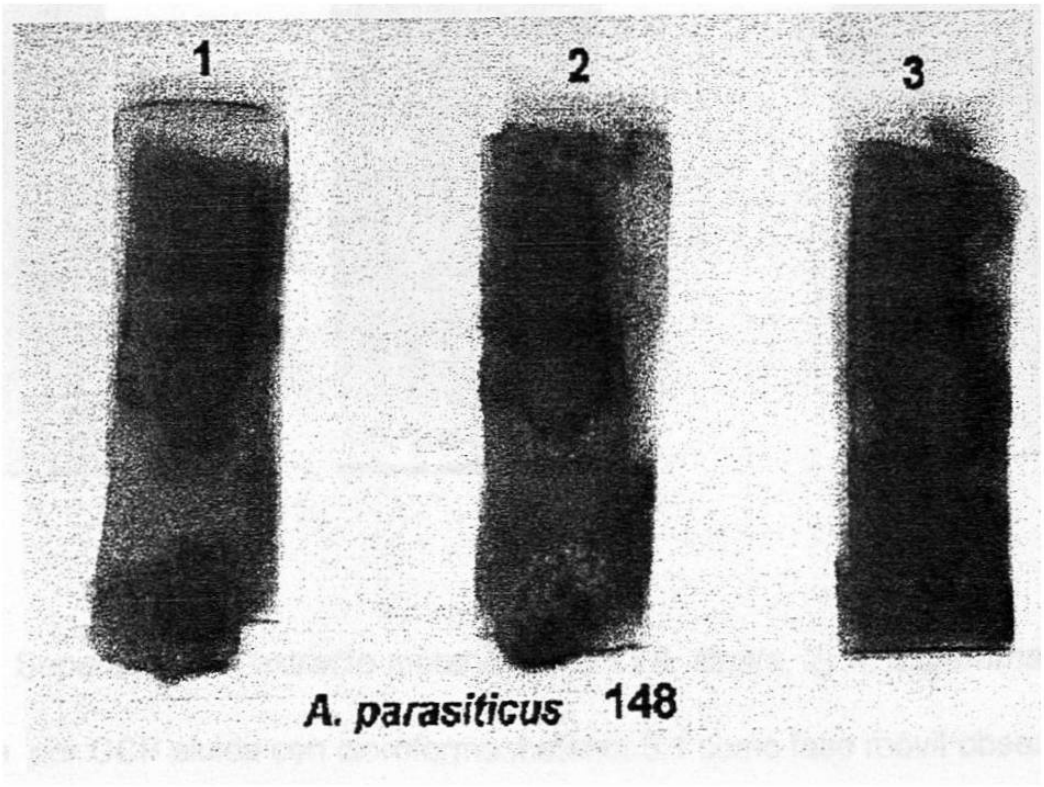


Figura No. 6. Identificación de la fracción activa contra el crecimiento de *A. flavus* 1273 y *A. parasiticus* 148, de las CCD hechas a los extractos metanólicos de 1) *A. striata*, 2) *A. asperrima* y 3) *A. americana* por la técnica de autobiografía.

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. asperrima* y *A. striata,* por CCP.

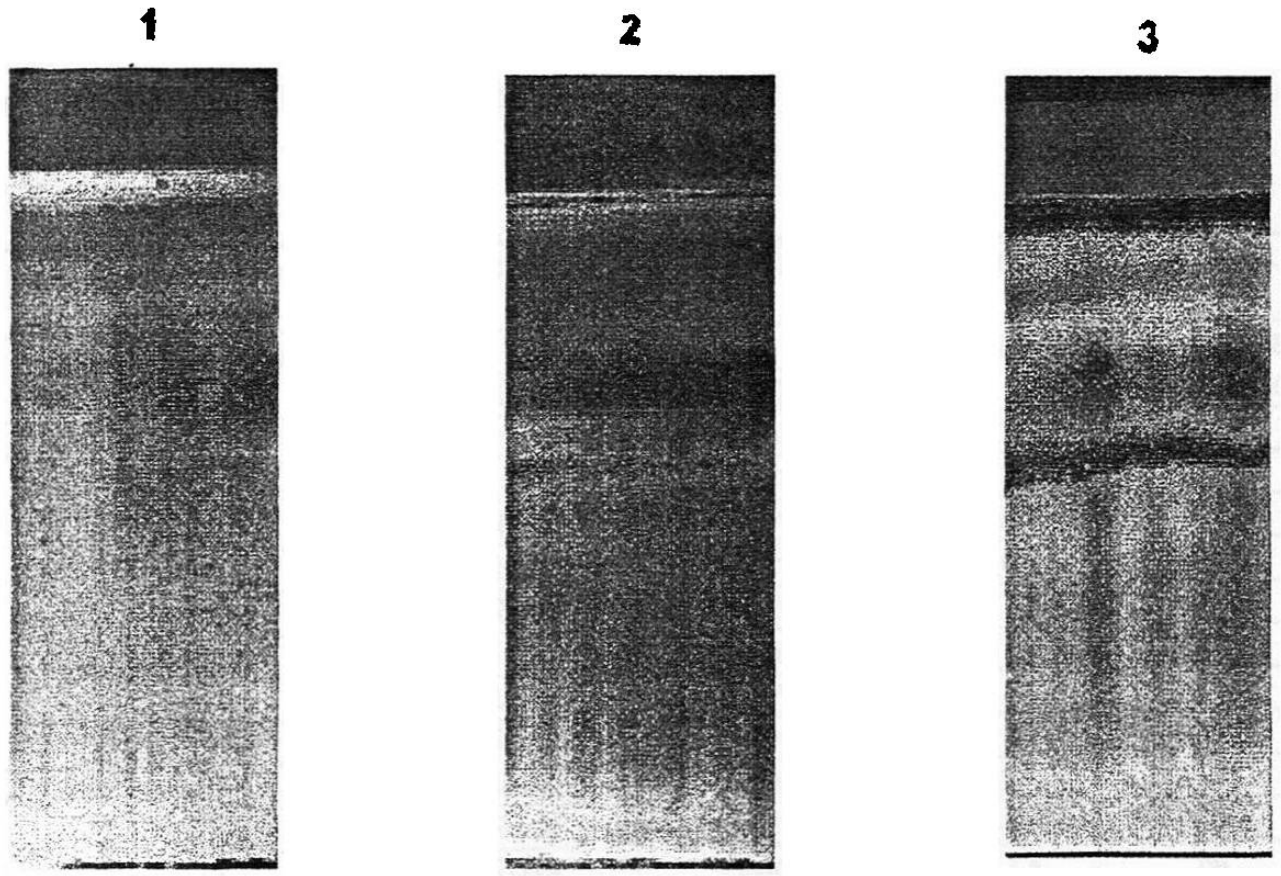


Figura No. 7. Separación del extracto metanólico de 1) *A. striata,* 2) *A. asperrima* y 3) *A. americana* por CCP eluida con cloroformo:metanol 5:1 como fase móvil observado con luz UV de 254-366 amp.

Tabla No. 5. Rendimiento de la obtención de la fracción activa.		
Planta	Extracto	Rendimiento %*
A. striata	Metanólico	2.5
A. asperrima	Metanólico	1.6
A. americana	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		
A. asperrima	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
A. americana	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
A. striata	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.

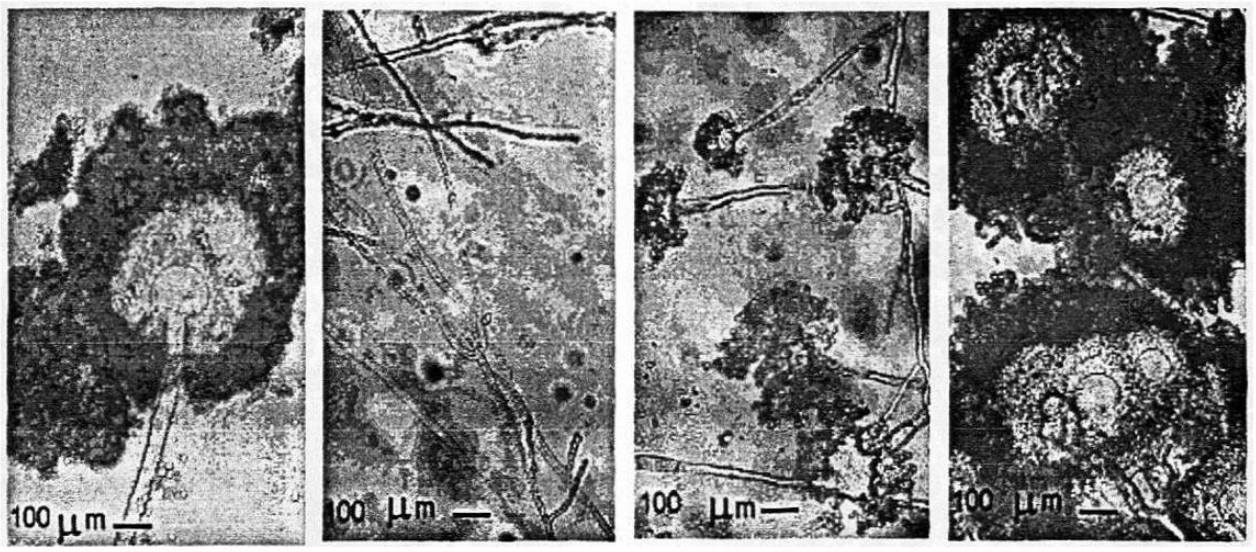
De los tres tipos de macerado que se realizaron: acuoso, etanólico y metanólico con *A. asperrima, A. americana,* y *A. striata,* el extracto metanólico fue el que provocó mayor inhibición del crecimiento normal del hongo. Además en las diferentes etapas de obtención de los macerados se producía el efecto de burbuja que perdura como panal de abejas y dura mas 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).

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. asperrima* 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 invervalos 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.



CONTROL 75 % CMI 50 % CMI 25 % CMI

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 vesicula 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 numero de esterigmas, elongados anormalmente, sosteniendo un numero 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

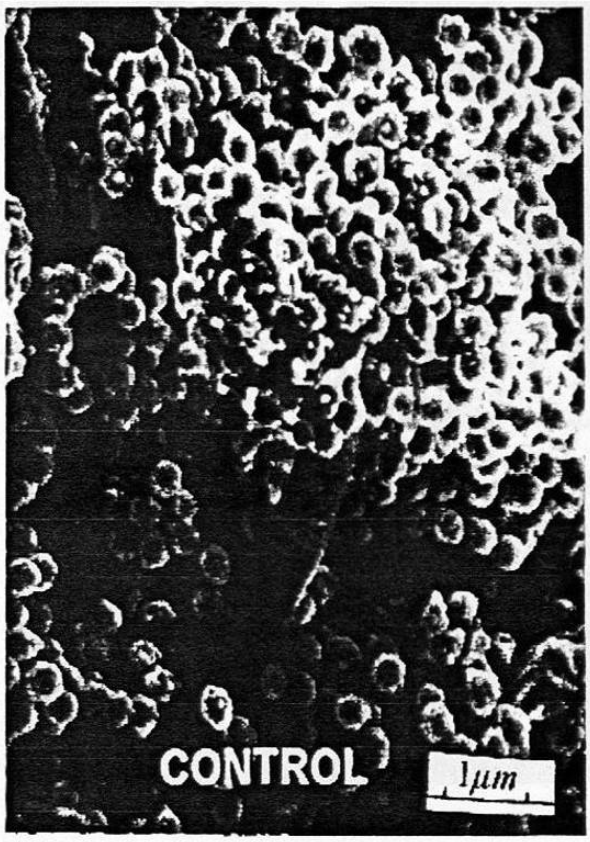


Figura No. 9. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control

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.

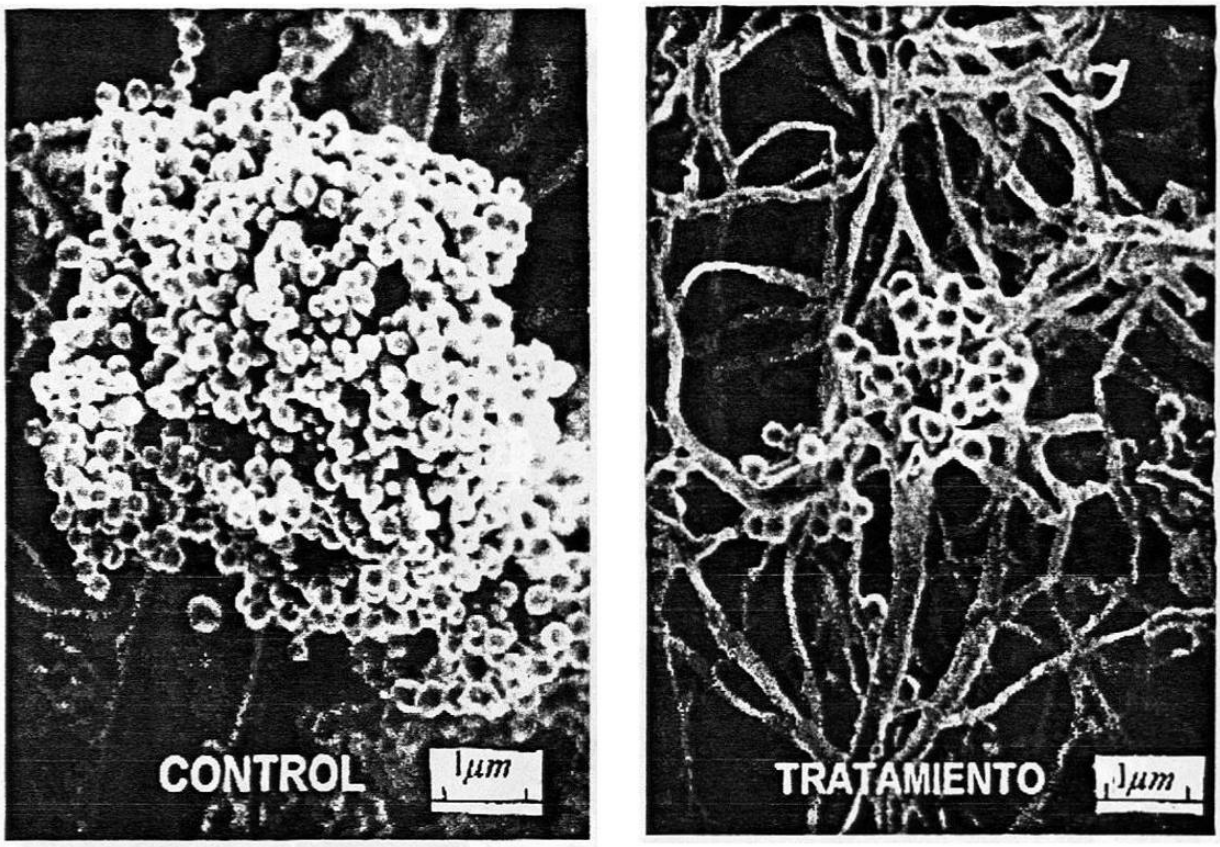


Figura No. 10. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control.

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 vesicula, 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.

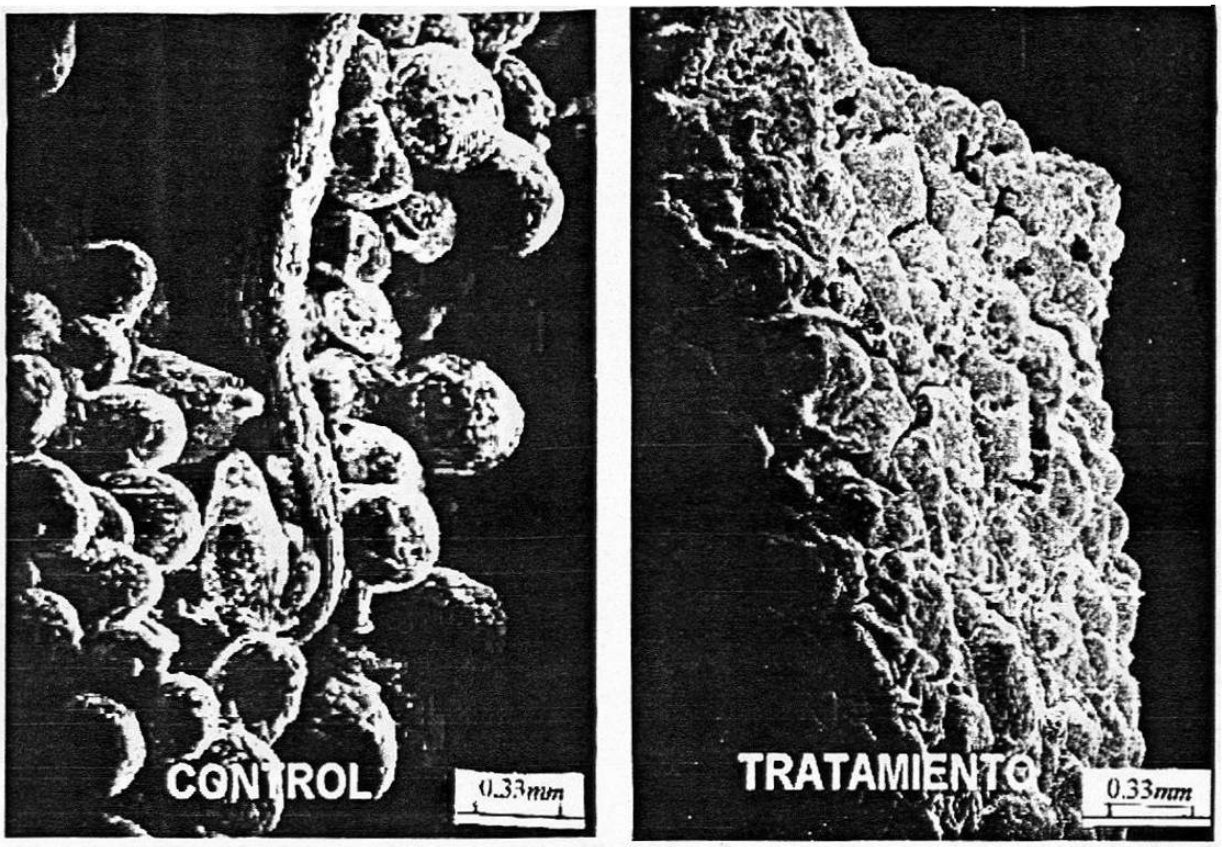


Figura No. 11. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 30X, comparado con el control.

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 concentraciónes de 10 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana* desarrolló hifas vegetativas y una morfología alterada de lo que son los esclerocios.

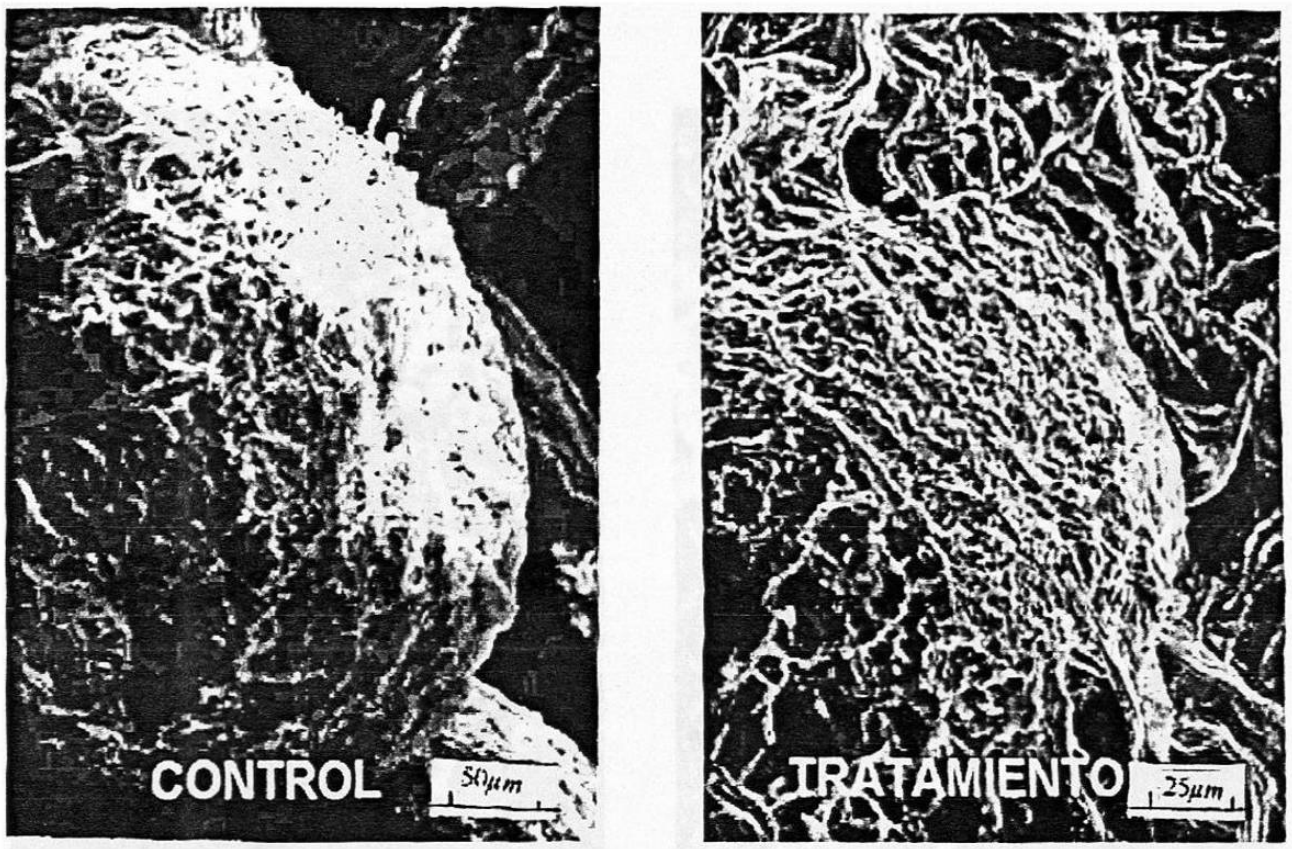


Figura No. 12. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 200X el control y 400X el tratamiento.

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 concentraciónes de 10 mg/ml de extracto etanólico de *A. americana* solamente desarrolló micelio vegetativo.

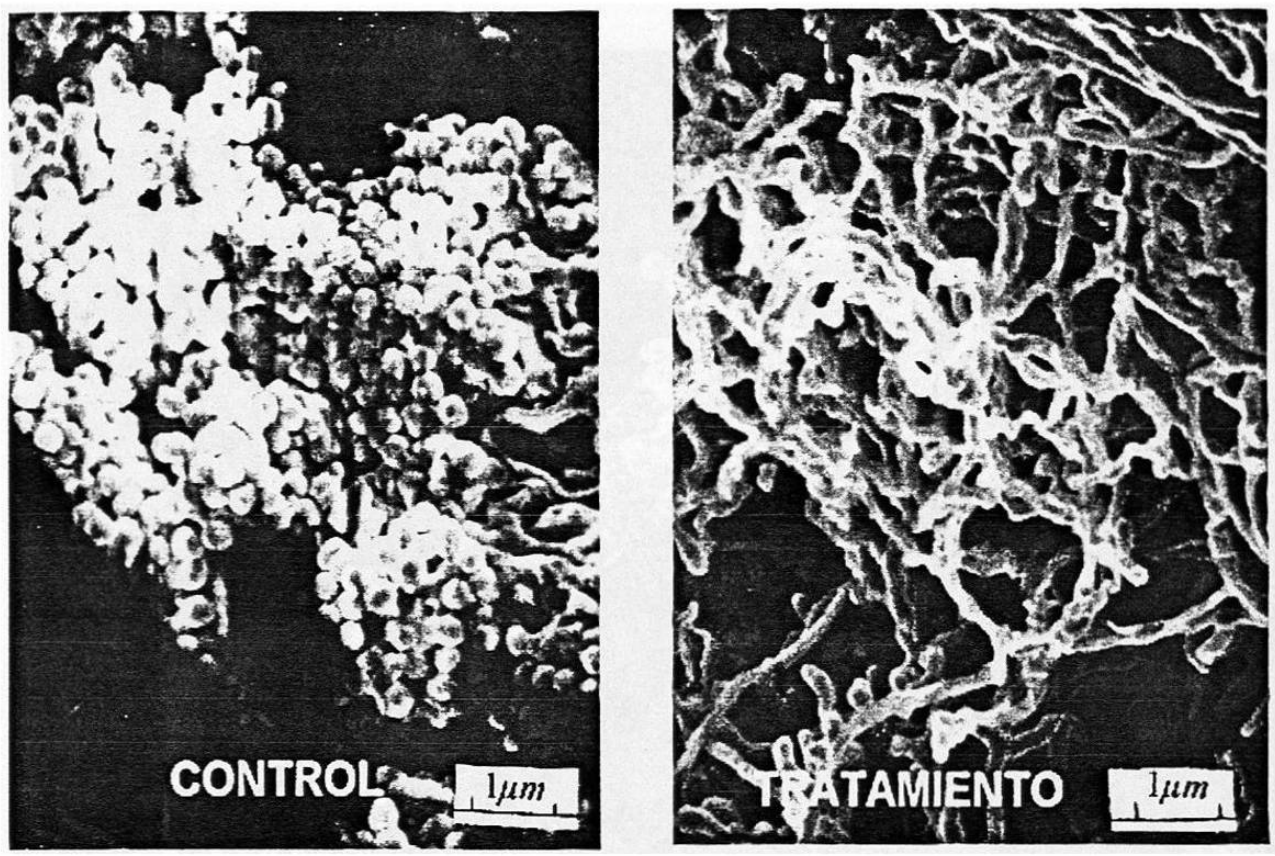


Figura No. 13. Efecto de extracto etanólico de *A. americana* en la morfología de *A. flavus* 1299 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000X, comparado con el control.

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.

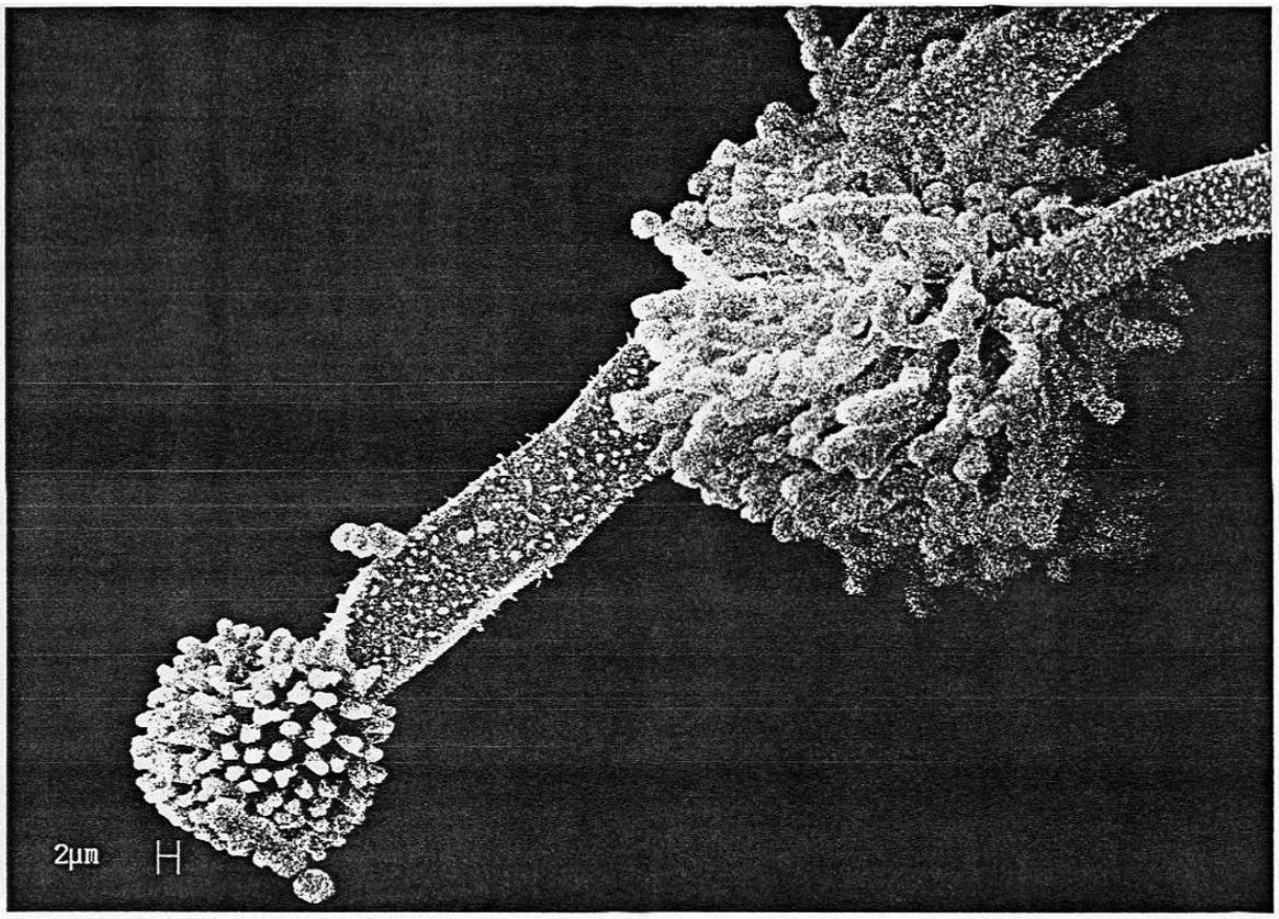


Figura No. 14. Control de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000 X.

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.

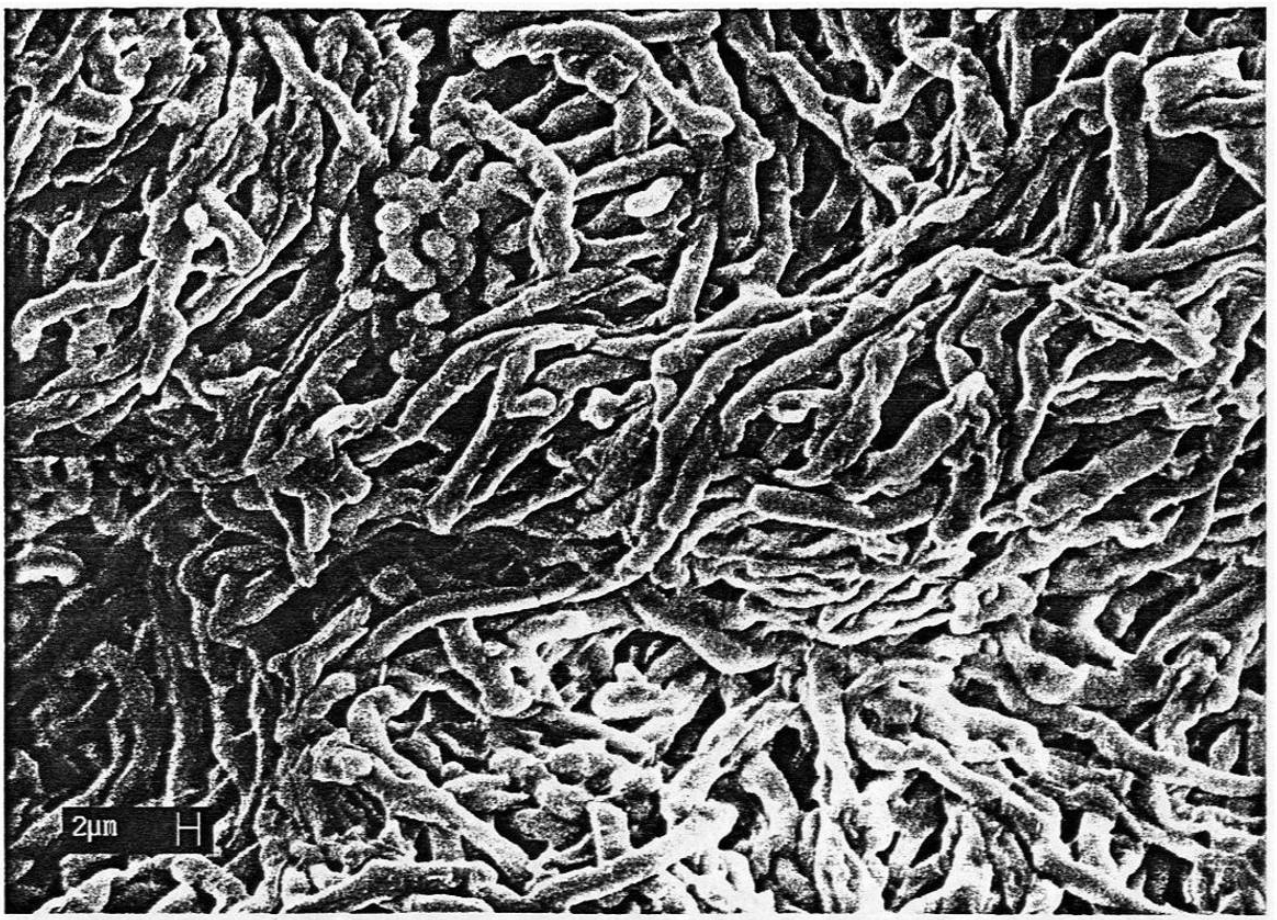


Figura No. 15. Efecto del 75 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrima* en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000X.

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

Figura No. 16. Efecto del 50 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrima* 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 aspergilares irregulares y alguna espora aislada.

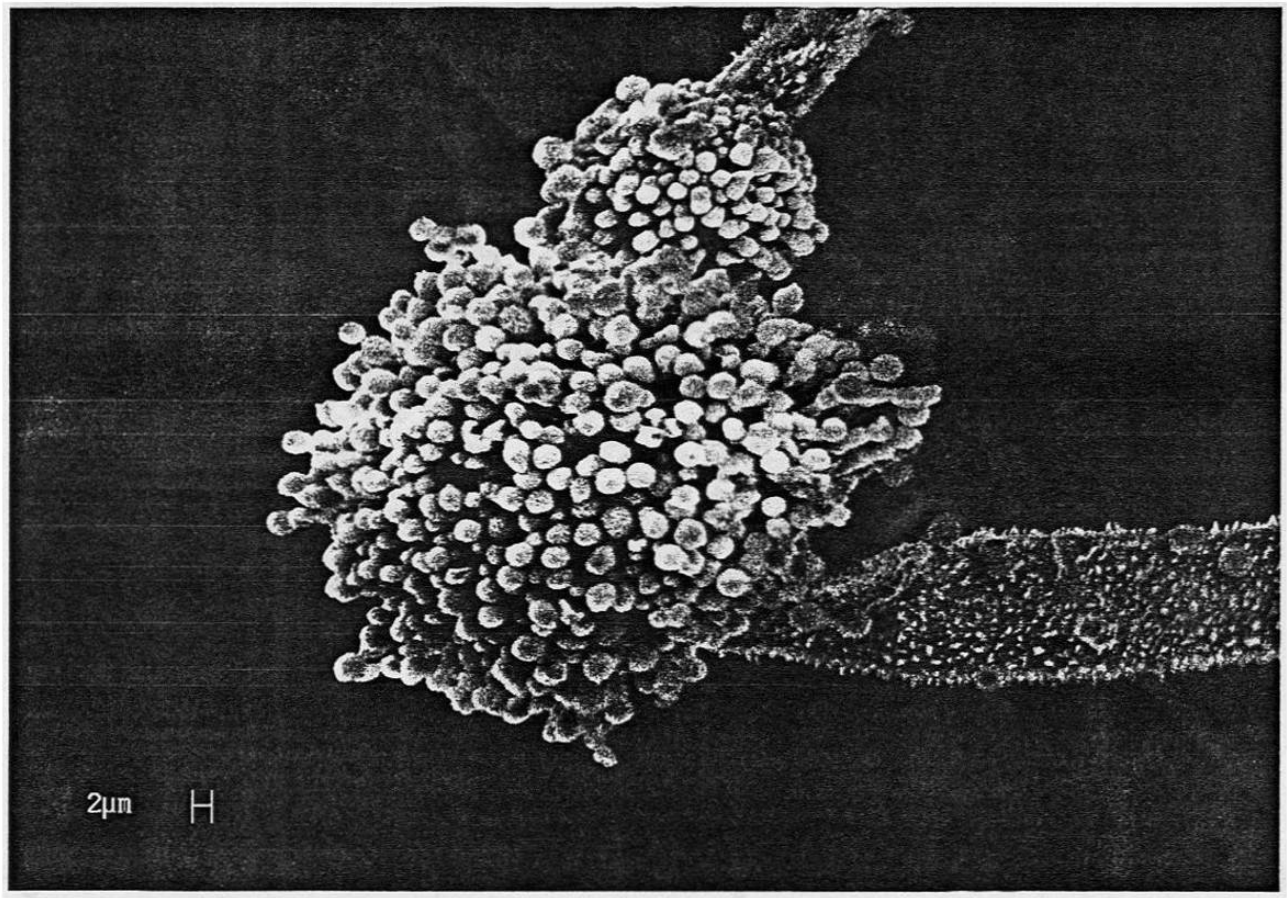


Figura No. 17. Efecto del 25 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrima* en la morfología de *A. flavus* 1273 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 3000X.

Se observó cabezas aspergilares, 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*.

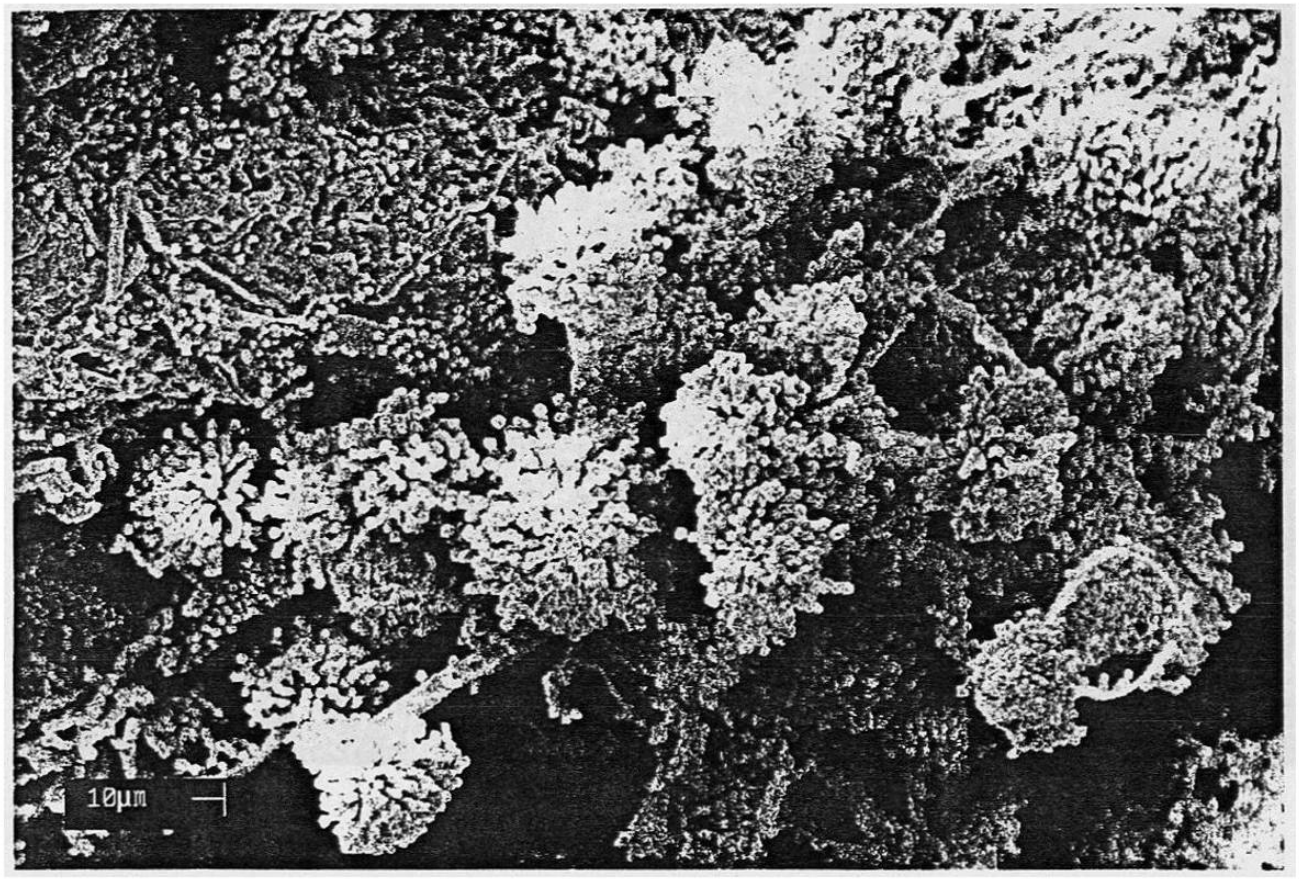


Figura No. 18. Control de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X.

La cepa de *A. parasiticus* 148 fué inoculada en caldo Czapek Dox por 7 días a 28ºC, 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 aspergilares con gran esporulación, cadenas de conidios que enmascaran los esterigmas de que están sostenidos, la vesícula y el micelio.

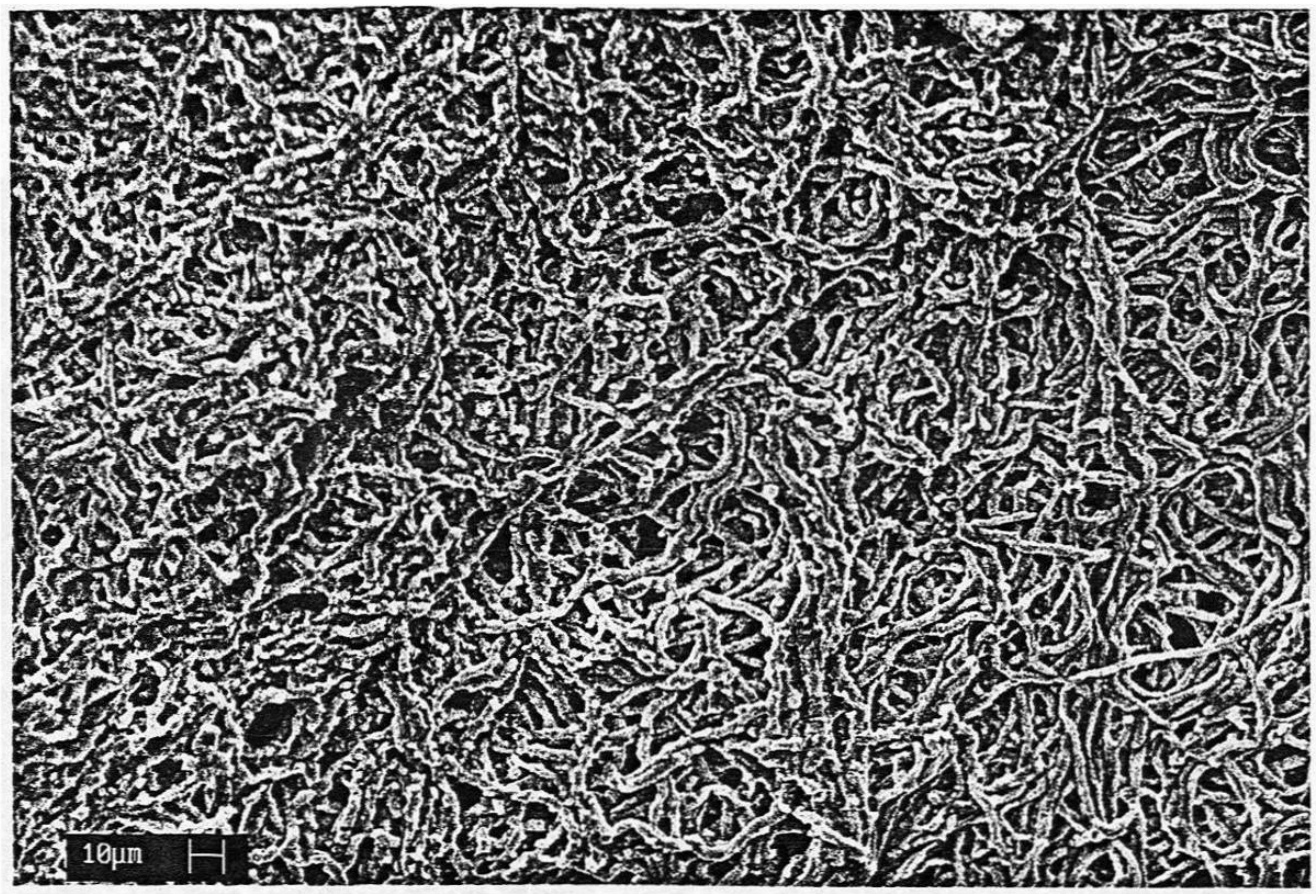


Figura No. 19. Efecto del 75 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrima* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X.

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

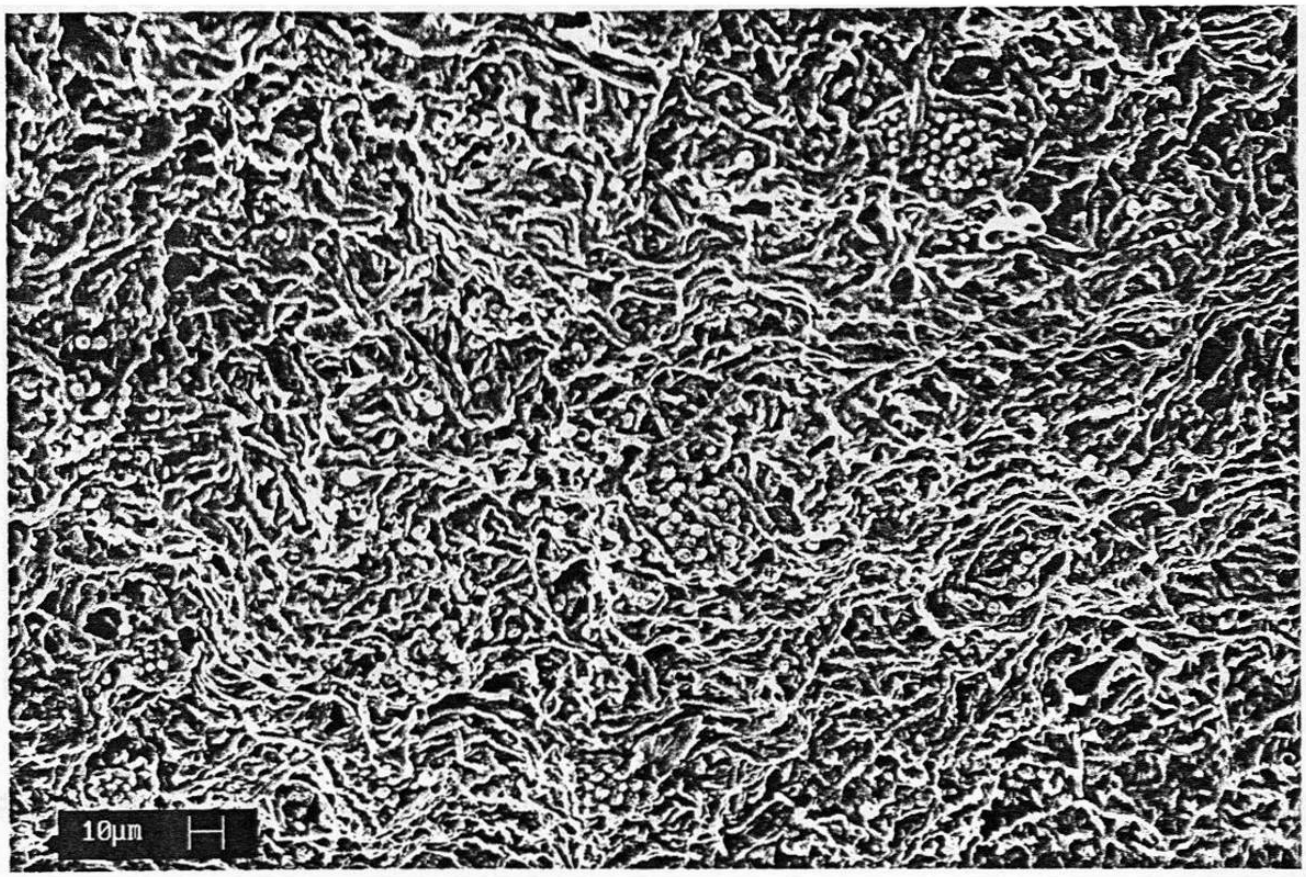


Figura No. 20. Efecto del 50 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrima* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X.

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

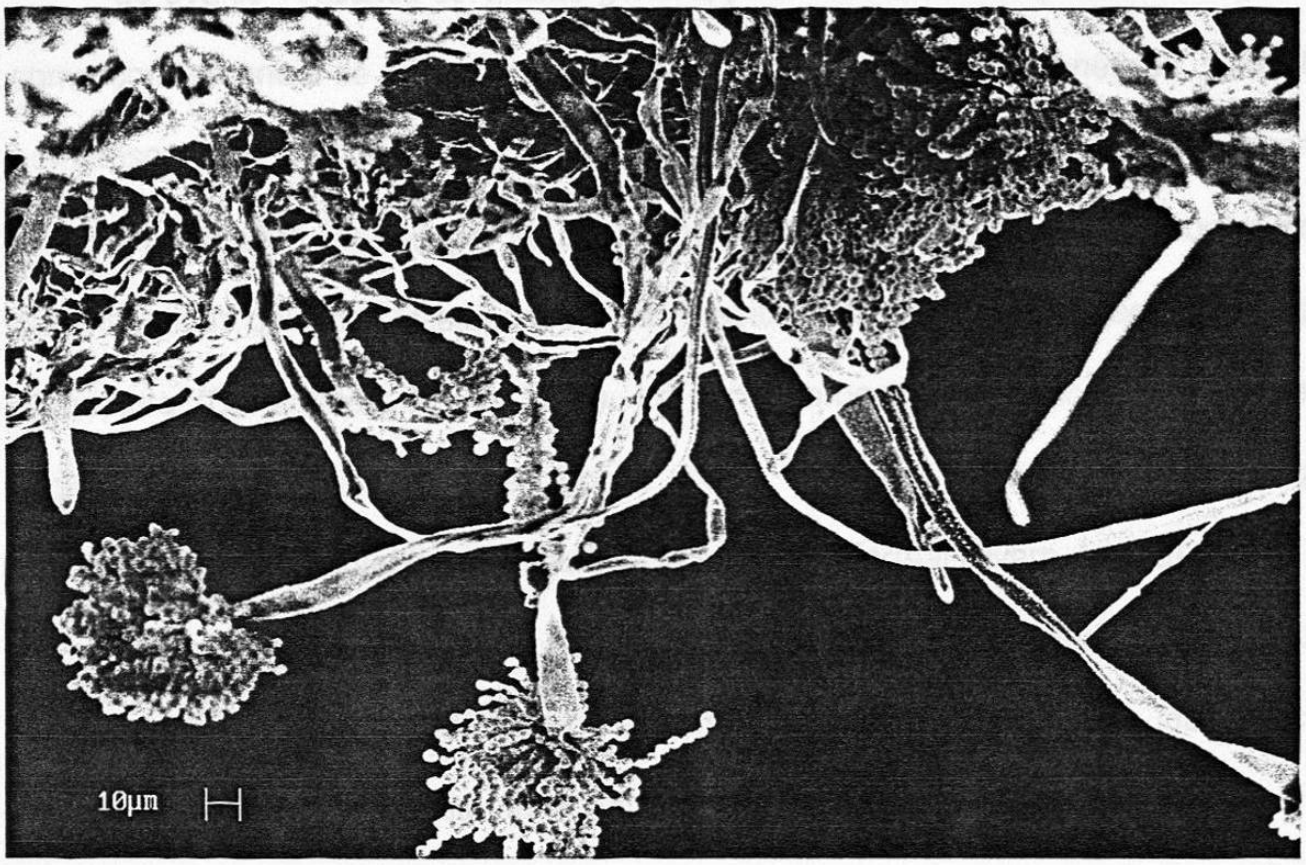


Figura No. 21. Efecto del 25 % de la CMI del extracto metanólico de *A. asperrima* en la morfología de *A. parasiticus* 148 fotografiado al microscopio electrónico de barrido a 1000 X

Se observó desarrollo de cabezas aspergilares, en menor número comparado con el control. Las cabezas aspergilares 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 substancias 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. asperrima* 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. asperrima* 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 esicerocios y creciendo con concentraciónes 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 interactuan 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. asperrima*, 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 cromatografias 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.

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 B_1 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 reimpresión. 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 cacahuate 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. Mycophatologia. 66(3):161-165.

Hocking, A. D. 1997. Toxigenic *Aspergillus* Species. Mycotoxigenic Molds. Food Microbilogy 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. Mkrobiol. 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 patogenos. Micología medica. 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 alchohol, phtalide and Pyroquilon. Pesticide biochemistry and physiology. 52:109-115.

Wheeler, M. H., D. Bhatnagar, and M. A. Klich. 1991. Effects of chlobenthiazone on aflatoxin biosyntesis 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.

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO