UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto de los Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) sobre el Desarrollo de *Aspergillus flavus* y Producción de Aflatoxinas en Maíz.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ADRIANA CRUZ FLORES

ASESORES:

M. EN C. MARIA CRISTINA JULIA PÉREZ REYES.

M. EN M. JOSEFINA MORENO LARA.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX 2011

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN:L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Efecto de los Aceites Esenciales de Canela (Cinnamomum zeylanicum Blume) y Tomillo (Thymus vulgaris L.) sobre el Desarrollo de Aspergillus FLavus y Producción de Aflatoxinas en Maíz

Que presenta la pasante Adriana Cruz Flores

Con número de cuenta: 300892374 para obtener el título de:

Ingeniera en Alimentos.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Mex. a 30 de marzo de 2011

PRESIDENTE	Dra. Clara Inés Alvarez Manrique	
VOCAL	I.B.Q. José Jaime Flores Minutti	
SECRETARIO	M.C. Ma. Cristina Julia Pérez Reyes	
1er SUPLENTE	Dra. Carolina Moreno Ramos	
2º SUPLENTE	I.A. Zaira Berenice Guadarrama Alvarez	

DEDICATORIA

A Dios por lograr el haber concluido una etapa importante de mi vida, y que juntos veamos realizado lo que hasta hace poco fuera un gran sueño, por haberme dado vida y salud, así como la oportunidad de compartir con mi familia y amigos momentos felices. Gracias por todas las bendiciones que me has dado.

A mis Padres Josefina y Hugo quienes me formaron con fe y amor. Quienes a lo largo de mi vida me guiaron siempre por el buen camino, brindándome su apoyo, y en los momentos más difíciles me alentaron a seguir adelante, llegando a realizar la más grande de mis metas: mi Carrera Profesional, sin ustedes no hubiera sido posible llevarse a cabo.

A mis Hermanos Hugo y Paola por el apoyo, ser mis amigos y compañeros de aventuras, por tantos momentos felices que hemos compartido.

A mis tíos Eugenia y Ali por el apoyo brindado cuando inicie mi carrera profesional, incluso antes de entrar a la universidad, sin su ayuda no hubiera podido realizar este triunfo.

A mis amigos Mony, Frank, Selina, Claudia, Sara, Adela, Viri que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que estuvieron conmigo y compartiendo tantas aventuras, experiencias, desveladas y triunfos.

A mis compañeros de la generación 27 gracias a cada uno por hacer que mi estancia en la Universidad fuera una gran experiencia.

A Juan Carlos por tu apoyo, compresión, sinceridad, amistad y amor que me permite sentir poder lograr lo que me proponga. Por protegerme y darme valor. Gracias por ser parte de mi vida; eres lo mejor que me ha pasado.

A Lupita Olmos y Mireya Barajas por el apoyo brindado, su amistad, y confianza.

A mis amigos y compañeros de Sensient Flavors por brindarme su apoyo y ser partícipes en la consecución de mis metas académicas, por la oportunidad de crecer con experiencias y entre personas inigualables que nunca olvidaré. Allí aprendí que no hace falta ser reconocida para sentirse orgullosa de una misma. Que se es grande tan solo por dejarse ser y mantenerse como tal a pesar de cuantos jalones te dé la vida.

A todos aquellos que, directa o indirectamente, participaron leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras la M. en C. Ma. Julia Pérez Reyes y M. en M. Josefina Moreno Lara por haber confiado en mi persona, por su asesoría, paciencia y por la dirección de este trabajo.

A la M. en M. Gabriela Sánchez Hernández por el apoyo como técnico académico, consejos y el ánimo que me brindó.

A mis maestros en especial al coordinador de la carreara Ing. Victor Manuel Avalos por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

A la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por las facilidades para llevar a cabo la fase experimental del presente trabajo, así como el apoyo brindado por todo el personal que labora en esta unidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país.

A los miembros del jurado por sus valiosas observaciones:

Presidente	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique
Vocal	I. B. Q. José Jaime Flores Minutti
Secretario	M.C. Ma. Cristina Julia Pérez Reyes
1er Suplente	Dra. Carolina Moreno Ramos
2° Suplente	I.A. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez

CONTENIDO **PÁGINA**

ÍNDICE GENERAL I
ÍNDICE DE FIGURAS IV
ÍNDICE DE CUADROS V

RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 2

I. ANTECEDENTES
1.1.0 Maíz. 4
1.1.1 Descripción botánica. 4
1.1.2 Estructura de la semilla. 5
1.1.3 Composición química. 6
1.1.4 Variedades. 8
1.1.5 Cosecha. 11
1.1.6 Almacenamiento. 11
1.1.7 Importancia del maíz. 14
1.1.8 Producción nacional. 16
1.1.8.1Principales regiones productoras 17
1.1.9 Importaciones. 18
1.1.10 Exportaciones. 18
1.1.11 Producción mundial 19

1.2.0. Aceites esenciales. 20
1.2.1 Clasificación. 21
1.2.2 Fuentes de obtención. 22
1.2.3 Métodos de obtención. 22
1.2.4. Composición química 25
1.2.4.1 Compuestos antimicrobianos. 25
1.2.5 Aceite esencial de canela. 27
1.2.6 Aceite esencial de tomillo. 28
1.2.7 Usos de los aceites esenciales. 29
1.2.8 Efecto inhibitorio. 29
1.2.8.1 *In situ* 31

1.3.0 Hongos. 32
1.3.1 Clasificación. 33
1.3.1.1 Hongos de campo. 33
1.3.1.2 Hongos de almacén. 33
1.3.1.3 Hongos de deterioro avanzado. 34

1.4.0. Importancia del género *Aspergillus.* 34
1.4.1 Clasificación. 34
1.4.2.Morfología 36
1.4.3 Descripción de los subgéneros *Aspergillus* 37

1.5.0 Micotoxinas. 39
1.5.1 Aflatoxinas. 41
1.5.2 Propiedades fisicoquímicas. 41
1.5.3 Mecanismo de acción. 43
1.5.4Toxicidad. 43
1.5.4.1 Crónica. 44
1.5.4.2 Aguda. 44
1.5.5 Incidencia en alimentos. 44
1.5.5.1 Factores biológicos. 45
1.5.5.2 Factores químicos. 46
1.5.5.3 Factores ambientales. 46
1.5.5.4 Aflatoxina en el maíz. 48
1.6.0 Medidas de control. 48
1.6.1 Prevención. 48
1.6.2 Descontaminación. 49
1.6.2.1 Tratamientos físicos. 50
1.6.2.2 Tratamientos químicos. 51
1.6.2.3 Tratamiento biológico. 52
1.7.0 Detección y cuantificación. 52
1.8.0 Normatividad. 53

II. JUSTIFICACIÓN 55

III. OBJETIVOS 56
3.1 Objetivo General. 56
3.2 Objetivos Particulares. 56

IV. METODOLOGÍA
4.0 CUADRO METODOLÓGICO 57
4.1 Actividades preliminares 58
4.2 Objetivo Particular I 59
Fase experimental I
4.3 Objetivo Particular II 61
Fase experimental II
4.4 Análisis Estadístico 62

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Experimento I
5.1.0 Contenido de humedad del maíz 63
5.1.1 Efecto de los aceites esenciales de tomillo y canela sobre la micobiota presente**.** 66
5.1.2 Determinación de aflatoxinas 75

Experimento II
5.2.0 Contenido de humedad del maíz 78
5.2.1 Efecto de los aceites esenciales de tomillo y canela sobre *A. flavus* presente en maíz. 80
5.2.2 Determinación de aflatoxinas 83

CONCLUSIONES 87

BIBLIOGRAFÍA 89

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Corte longitudinal y transversal del grano de maíz.	5
2	Participación del maíz en la producción de cereales (1996-2006).	16
3	Producción de los principales productores de maíz en México (1996-2006 en toneladas).	17
4	Producción mundial de los principales países productores (Promedio 1996-2005, Miles de Toneladas).	19
5	Análisis de la producción mundial.	20
6	Estructura química de a) Cinamaldehído, b) Eugenol.	28
7	Estructura química a)Timol, b) carvacrol.	28
8	Conidioforos de *Aspergillus.*	36
9	Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.	39
10	Estructura molecular de las aflatoxinas.	42
11	Mecanismo de acción de la aflatoxina B1.	43
12	A) Micobiota presente en los testigos a los 14 días. B) Micobiota presente en los testigos a los 98 días. C) Micobiota presente en los testigos a los 182 días. Almacenados a 85% de humedad relativa y 28° C.	73
13	A) Inhibición de *Asperguillus flavus* con el aceite esencial de canela (3000 y 4000 ppm). B) Crecimiento de *A. flavus* en maíz sin tratamiento e inoculado con *A. flavus*. Almacenado a 85% de humedad relativa, 28° C durante 49 días.	82

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Distribución ponderal de las principales partes del grano.	6
2	Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz.	6
3	Diferentes especies de hongos y sus micotoxinas con su especial interés biológico económico.	40
4	Micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus* sección Flavi.	42
5	Principales propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas.	42
6	Tratamientos de aceites esenciales aplicados al maíz, experimento 1.	60
7	Tratamientos de aceites esenciales aplicados al maíz, experimento 2.	61
8	Contenido de humedad en maíz almacenado durante 182 días en humedad relativa de 85% y 28 °C.	64
9	Micobiota presente en maíz tratado con aceites esenciales de canela, tomillo y una mezcla de ambos almacenados a 85% de humedad relativa, 13% de contenido de humedad a 28° C y un periodo 182 días.	67
10	Efecto de los aceites esenciales de canela, tomillo y mezcla de ambos sobre la producción de aflatoxinas.	76
11	Contenido de humedad en maíz almacenado durante 49 días en humedad relativa de 85% y temperatura de 27°C.	79
12	Crecimiento de *A. flavus* en maíz tratado con aceites esenciales de canela y tomillo almacenado a 85% de humedad relativa, 28° C durante 49 días.	81
13	Nivel de aflatoxinas en maíz inoculado con *Aspergillus flavus* y tratado con aceites esenciales de canela y tomillo.	84

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el análisis del efecto inhibitorio de los aceites esenciales de canela y tomillo durante el almacenamiento de maíz en condiciones favorables para el desarrollo de *Aspergillus flavu*s Link y producción de aflatoxinas.

En un estudio preliminar *in vitro* se probó el efecto fungicida y fungistático de los aceites esenciales de anís, canela, clavo, eucalipto, hierbabuena, limón centrifugado, limón frío, mejorana, naranja, orégano, tomillo blanco, tomillo rojo y toronja en una concentración de 2000 ppm en el crecimiento de *Aspergillus flavus* (Anexo 1).

De los aceites que presentaron efecto fungicida *in vitro* fueron empleados para realizar la prueba *in vivo*, para lo cual se realizaron dos experimentos en donde se almacenó el grano de maíz con humedad relativa de 85% a temperatura de 28°C. Para el primer experimento el contenido de humedad del maíz fue de 13%; las concentraciones de los tratamientos de los aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos aceites (50/50) fueron de 2000, 3000 y 4000 ppm. Encontrando que ambos aceites esenciales, en todas las concentraciones, tuvieron efecto inhibitorio de 83- 100%, durante el periodo de almacenamiento de 182 días. En el segundo experimento el contenido de humedad del maíz fue de 18%, las concentraciones de los tratamientos de los aceites esenciales de canela, tomillo; fueron de 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm, en este caso el aceite que mostró un mejor efecto fue el de canela en las concentraciones de 2000, 3000, 4000 ppm presentado inhibición de 78-100% y tomillo en la concentración de 4000 ppm con 98% de inhibición durante un periodo de almacenamiento de 49 días de *A. flavus*.

INTRODUCCIÓN

El maíz junto con el trigo y el arroz es uno de los principales cereales a nivel mundial, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia básica para la industria de transformación (FAO, 1993). En muchos países como en México, representa el principal alimento para gran parte de la población, que lo consume en formas muy variadas por ser rico en hidratos de carbono como glucosa, sacarosa, fructosa (Badui, 1993).

Uno de los grandes problemas de la inocuidad de los alimentos, lo constituye la continua contaminación por hongos, que no sólo deterioran a los alimentos, ocasionando grandes pérdidas, sino que también producen micotoxinas que causan diversos daños a al hombre o animal que los ingiere.

Aspergillus flavus L. es uno de los principales contaminantes del maíz y es productor de micotoxinas conocidas como aflatoxinas que son potentes mutagénicos, cancerígenos, teratogénicos, hepatotóxicos, inmunosupresores, también inhibe varios sistemas metabólicos (IARC, 1993; Minto y Townsend, 1997). Las principales características fisicoquímicas de las aflatoxinas son: presentan fluorescencia, son resistentes a altas temperaturas (de 260 a 320°C), de modo que no se pueden eliminar al aplicar diversos tratamientos térmicos como al hervir, asar o pasteurizar los alimentos; carecen de color, olor y sabor. Las aflatoxinas se producen en el campo o en el almacén, ya que el hongo prolifera en ambas áreas; en el almacén es donde se incrementa considerablemente la contaminación, dado que el grano está vivo generando agua como parte de su ciclo respiratorio, produciendo humedad y calor, condiciones favorables para su crecimiento y la producción de las aflatoxinas (InfoAserca, 1994). La presencia de estos hongos tóxicos en los alimentos y granos, almacenados por largos periodos de tiempo, representan riesgos potenciales para la salud humana y animal; la conservación eficaz del maíz se basa esencialmente en el manejo de las condiciones que prevalecen durante el almacenamiento, es decir en las características físicas, químicas y biológicas

del grano, la duración del periodo de almacenamiento y en las características funcionales del lugar del almacenamiento (FAO 1993).

En las últimas décadas, numerosos países han incorporado a su legislación regulaciones dirigidas a establecer los niveles de máximos de micotoxinas en los alimentos destinados al hombre y los animales con el fin de salvaguardar su salud.

Con la aplicación de productos químicos para proteger a los cultivos del ataque de microorganismos y el mal uso de estas sustancias, se han venido provocando efectos nocivos a la salud humana y al ambiente (contaminación del agua, erosión del suelo, también se ha afectado la flora y la fauna benéfica, etc.). Debido a los problemas que presenta el manejo de los fungicidas sintéticos se han desarrollado alternativas ecológicas para el control de hongos. Con algunas especies vegetales se han realizado trabajos relacionados al efecto antifúngico, se cree que de estos compuestos existen bastantes y solo se conocen muy pocos (Bosquez *et al,* 2009).

I. ANTECEDENTES

1.1.0 Maíz

Botánicamente, el maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas y es un planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibrosos. Se trata de una especie que se produce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en lugares distintos de la planta.

La palabra maíz de origen indio caribeño, significa literalmente “lo que sustenta la vida”. El cultivo del maíz tuvo su origen, en América Central, especialmente en México. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7,000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (FAO, 1993).

El maíz se cultiva en todas las regiones del mundo aptas para las actividades agrícolas y se cosecha todos los meses del año. Crece desde los 58° de latitud norte en el Canadá y Rusia hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4000 metros de altura en los Andes peruanos (ICMSF, 2001).

1.1.1 Descripción botánica

Según la FAO (1993), se puede definir la planta del maíz como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en los granos.

Así mismo, el desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas:

a) Fase vegetativa. Se desarrollan y diferencían distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. Esta fase consta de dos ciclos:

1.- Primer ciclo. Se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente; en este ciclo, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción.

2.- Segundo ciclo. Se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción este ciclo acaba con la emisión de los estigmas.

b) Fase de reproducción. Se inicia con la finalización de las estructuras femeninas que se diferencian en espigas y granos. Se divide en dos etapas:

1.- Etapa inicial. Se caracteriza por el incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor.

2.- Segunda etapa. El peso de los granos aumentan con rapidez.

En cuanto su composición el grano constituye aproximadamente el 42% del peso seco de la planta.

1.1.6 Estructura de la semilla

El grano de maíz se denomina botánicamente cariópside o cariopsis cada grano contiene el revestimiento o cubierta seminal y la semilla.

La Figura 1 muestra las cuatro estructuras físicas del grano: el pericarpio, cáscara o salvado, el endospermo y el germen o embrión.

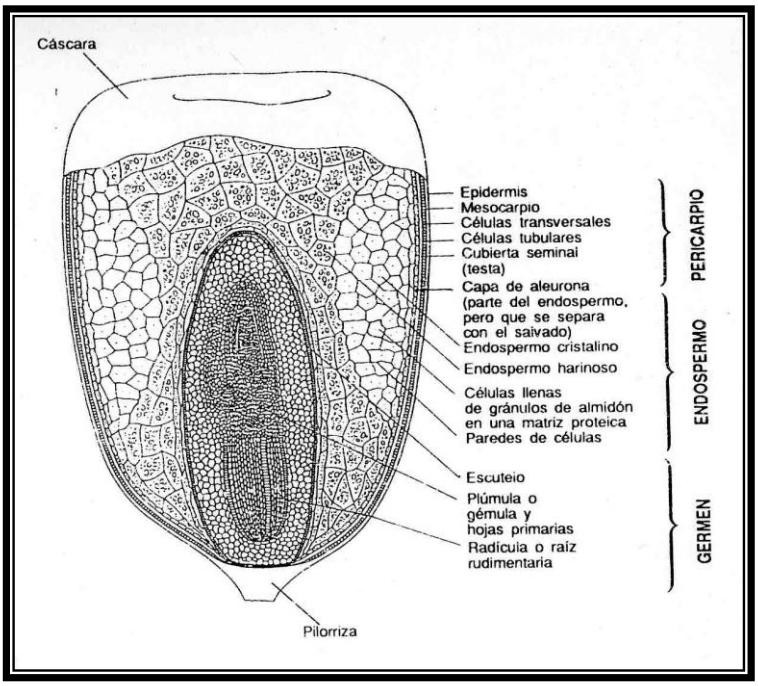


Figura 1. Corte longitudinal del grano de maíz.

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 1993. El maíz en la nutrición humana.

En el Cuadro 1 se muestra la distribución ponderal de cada una de las estructuras antes mencionadas.

Cuadro 1. Distribución ponderal de las principales partes del grano.

Estructura	Distribución ponderal (%)
Pericarpio	5-6
Aleurona	2-3
Endospermo	80-85
Germen	10-12

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 1993. El maíz en la nutrición humana.

1.1.2 Composición química

En el Cuadro 2, se muestra la composición química de las principales partes del grano de maíz que difieren considerablemente entre si. Composición determinada por las características genéticas.

Cuadro 2. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz.

Componente Químico	Estructura		
	Pericarpio	Endospermo	Germen
		(%)	
Proteínas	3,7	8,0	18,4
Extracto etéreo	1,0	0,8	33,2
Fibra cruda	86,7	2,7	8,8
Cenizas	0,8	0,3	10,5
Almidón	7,3	87,6	8,3
Azúcar	0,34	0,62	10,8

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 1993. El maíz en la nutrición humana.

El pericarpio o cubierta seminal se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente 87%, la que a su vez esta formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%). La capa aleurona tiene un contenido relativamente elevado de proteínas (≅19%) y de fibra cruda. El endospermo contiene un nivel elevado de almidón (≅ 87%), aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas crudas

relativamente bajo. El germen se caracteriza por un elevado contenido de grasa cruda (33%), proteínas (20%) y minerales.
Los principales componentes del grano de maíz son:

Almidón. Componente químico principal del grano de maíz, corresponde hasta el 72-73% del peso del grano. El almidón esta formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal de unidades de glucosa, que constituye hasta el 25-30% del almidón (Boyer y Shannon, 1987). Otros hidratos de carbono son azúcares sencillos en forma de glucosa, sacarosa y fructuosa, en cantidades que varían del 1-3% del grano.

Proteínas. Constituyen el siguiente componente químico del grano en orden de importancia. El contenido de proteínas puede oscilar del 8-11% del peso del grano y en su mayor parte se encuentran en el endospermo. Las proteínas están formadas por lo menos por cinco fracciones distintas. Conforme a su descripción, las albúminas (7%), las globulinas (5%) y el nitrógeno no proteico en 6% (Landry y Moureaux, 1982).

Aceites y ácidos grasos. El aceite de grano de maíz se encuentra fundamentalmente en el germen y viene determinado genéticamente, en un rango que van del 3 al 18%. El aceite de maíz tiene un bajo nivel de ácidos grasos saturados: ácido palmítico (11%) y esteárico (2%). Contiene niveles relativamente elevados de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoleico (24%); cantidades reducidas de ácido linolénico y arquidónico (Bressani *et al*, 1989).

Fibra dietética. El contenido total en los granos de maíz de fibra dietética soluble es de 13 % e insoluble es de 1% aproximadamente (Sandstead *et al*, 1978).

Minerales. La concentración de cenizas que contienen a la mayor cantidad de minerales en los grano de maíz es de aproximadamente 1.3%. El germen es relativamente rico en minerales, con un valor medio de 11%

comparado con el 1% del endospermo. El germen proporciona cerca del 78% de todos los minerales del grano. El mineral que más abunda es el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio, encontrándose en su totalidad en el embrión con valores aproximadamente de 0.09% (Bressani *et al*., 1989).

Vitaminas liposolubles. El grano de maíz contiene dos vitaminas solubles en grasa, la provitamina A, o carotenoide, y la vitamina E. La mayoría de los carotenoides se encuentran en el endospermo duro del grano y únicamente pequeñas cantidades en el germen. La vitamina E, se halla principalmente en el germen. La fuente de la vitamina E, son cuatro tocoferoles: el más activo biológicamente es el tocoferol alfa, aunque el tocoferol-gamma es probablemente más activo como antioxidante (FAO, 1993).

Vitaminas hidrosolubles. Las vitaminas solubles en agua se encuentran sobre todo en la capa aleurona del grano de maíz y en menor medida en el germen y el endospermo. El grano de maíz tiene cantidades variables de tiamina y riboflavina. Otras vitaminas, como la colina, el ácido fólico y el ácido pantoténico, se encuentran en concentraciones pequeñísimas (FAO, 1993).

1.1.4 Variedades

El maíz tiene una gran variabilidad en el color del grano, la textura, la composición y la apariencia. Pueden ser clasificados según Paliwal *et al*, (2001) en base a:

a) La constitución del endospermo y del grano.
b) El color del grano.
c) El ambiente en que es cultivado.
d) La madurez.
e) Su uso.

Hay varios tipos de granos, que se distinguen por las diferencias de los compuestos químicos depositados o almacenados en él (FAO, 1993). Las variedades cultivadas fundamentalmente para alimentación se han clasificado de la siguiente forma:

- Por la constitución del endospermo.

Duro. Los granos de este tipo de maíz son duros, lisos y contienen poco almidón suave. El endospermo está constituido sobre todo de almidón duro córneo con solo una pequeña parte de almidón blando en el centro del grano (Hall, 1981).

Dulce. Esta caracterizado por una apariencia traslucida y córnea cuando esta inmaduro y por una condición vítrea cuando esta seco. Las mazorcas se recogen verdes y se usan para enlatado y para consumo en fresco (Hall, 1981). En este tipo de maíz, la conversión del azúcar en almidón es retardada durante el desarrollo del endospermo.

Dentado. Tiene endospermo calloso y vítreo a los lados y en la parte posterior del grano, en tanto que el núcleo central es blando. Este tipo de maíz es genialmente de mayor rendimiento que otros tipos, se estima que el 95% de la producción de Estados Unidos es con maíz de este tipo (FAO, 1993). El endospermo del maíz dentado tiene más almidón blando que los tipos duros y el almidón duro está limitado solo a los lados del grano (Paliwal *et al,* 2001). Al secarse y contraerse rápidamente el almidosn suave, se tiene el característico dentado (Hall, 1982).

Amiláceo o harinoso. Se caracteriza por un endospermo harinoso, sin endospermo cristalino. Estos granos están compuestos en gran parte por almidón suave y tienen pocos dientes o ninguno (Hall, 1981). Estos tipos de maíces harinosos muestran gran variabilidad en el color de grano y textura (Paliwal *et al,* 2001).

Cristalino. Generalmente el grano es liso y redondo; posee un endospermo grueso, duro y vítreo, granuloso y amiláceo (FAO, 1993).

Palomero. Es una de las razas más primitivas y es una forma extrema de maíz cristalino. Se caracteriza por un endospermo cristalino muy duro, que solamente tiene una pequeña porción de endospermo harinoso. Sus granos son redondos (como perlas) o puntiagudos (como el arroz). La capacidad de

reventar parece estar condicionada a la proporción relativa de endospermo córneo, en el que los gránulos de almidón están incrustados en un material coloidal tenaz y elástico que resiste la presión de vapor generada dentro del grano al calentarse, hasta que alcanza una fuerza explosiva, que lo hace aumentar su volumen original unas 30 veces.

- Por el color del grano

El maíz también es clasificado según Mora, (1997) por su color a menudo es de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado.

Blanco. Es todo grano entero o grano quebrado grande de maíz de color blanco, que presenta un valor menor o igual a 5% de maices amarillos y que contenga como máximo 5% de maices oscuros (rojo, azul y morado). Un ligero tinte cremoso, pajizo o rosado, no influye para designarlo como blanco. Las industrias harineras y almidoneras prefieren este maíz debido al color blanco que imparte al producto terminado.

Amarillo. Es aquel maíz de granos amarillos o con coloración rojiza, y que tenga un valor menor o igual a 6% de maices de otro color. Se utiliza en la fabricación de frituras de maíz, dada la coloración final del producto.

Rojo. Es todo grano entero o grano quebrado grande de maíz que tiene un color de rojo a rojo oscuro en al menos la mitad de su superficie.

Mezclado. Hay dos tipos diferentes de mezclado:

- Mezclado 1. Lo define como todo aquel maíz blanco que contenga entre el 5.1 y el 10% de maíces amarillos, así como el maíz amarillo que presenta un valor entre el 5.1 y el 10 % de maíces blancos. Ambos sin sobrepasar el 5% de maíces oscuros.
- Mezclado 2. Son aquellos maíces blancos que presentan más del 10% de maíces amarillos, así como los maíces amarillos que contengan más del 10% de granos blancos. Ambos sin sobrepasar el 5% de maíces oscuros.

Pinto. Es el maíz blanco, amarillo y mezclado que contenga más del 5% de maíces oscuros (rojo, azul y morado). Este maíz no es muy aceptado por la industria harinera, ya que le imparte una coloración no deseada al producto final.

1.1.5 Cosecha

El maíz se cosecha habitualmente cuando tiene alto el contenido de humedad del 18 al 24%. El deterioro ocasionado al grano (normalmente durante la operación de descascaramiento) guarda relación con el contenido de humedad en el momento de la cosecha; cuanto menor sea la humedad menor será el deterioro (FAO, 1993). Cuanto más tiempo se demore la cosecha más humedad perderán los granos. Cuanto más tiempo transcurra el maíz en el campo, mayor posibilidad tendrá de sufrir ataques de insectos y de hongos (Granados, 2001).

La calidad física del grano puede modificarse a causa de la cosecha mecánica, el descascaramiento y el secado. Los dos primeros procesos dan lugar en ocasiones a daños externos, como la ruptura del pericarpio y de partes en torno al germen, lo cual facilita el ataque por los insectos y hongos. El secado, en cambio, no ocasiona daños fiscos marcados, pero si es demasiado rápido y se efectúa a temperaturas elevadas, puede hacer que se formen quebraduras por la tensión, así como ampollas y decoloramiento que tendrán repercusiones en la molienda en seco y en otros procesos (FAO, 1993).

1.1.6 Almacenamiento

Todos los granos como las semillas son seres vivos, en consecuencia respiran y utilizan el oxígeno del aire, producen bióxido de carbono, agua y energía que se traduce en calor, pero a un nivel metabólico tan mínimo que diera la impresión de estar sin vida (Cerovich y Miranda, 2004).

La conservación eficaz del maíz, al igual que la de otros cereales, se basa esencialmente en las condiciones ambientales durante el almacenamiento, en las características físicas, químicas y biológicas del grano, en la duración del almacenamiento y en el tipo y características funcionales del lugar del almacenamiento. Los factores de importancia que influyen al respecto son de dos clases:

Origen biótico. Comprenden todos los elementos o agentes vivos que encontrándose en condiciones favorables para su desarrollo, utilizan el grano como fuente de elementos de nutrición y con ello ocasionan su deterioro (FAO, 1993). La presencia de hongos, bacterias, insectos y sus ciclos reproductivos están muy vinculados con la humedad relativa y la temperatura de almacén. Además de los factores previamente señalados, también se debe considerar otros que de alguna manera inciden sobre el almacenamiento de semillas como son según Cerovich y Miranda, (2004):

- Características genéticas de la especie.

Bajo iguales condiciones de almacenamiento, la longevidad de las semillas varían entre especies, entre cultivos de una misma especie, entre lotes y hasta entre individuos de un mismo lote.

- Historia de la precosecha del cultivo.

Antes de la cosecha el cultivo esta expuesto a una serie de factores que pueden mermar su calidad, y ningún almacenamiento por muy bueno que sea, puede mejorarla. Es recomendable guardar siempre las semillas maduras, con baja incidencia de daños mecánicos o por patógenos y que no hayan sido sometidas a excesivo estrés de temperatura y humedad durante su maduración y cosecha, ya que son más propensas al ataque de hongos.

- Estructura y composición química de la semilla.

Ciertas estructuras como las glumas en los cereales, ayudan a prolongar la longevidad de las semillas; ambas aristas, parecen tener efecto inhibitorio sobre el desarrollo de hongos en los cereales almacenados; el tamaño y arreglo de las estructuras esenciales de las semillas y la composición química de éstas, también son factores que afectan el almacenamiento.

- Grado de madurez.

Cuando las semillas están fisiológicamente maduras presentan la máxima calidad en todos sus atributos como tamaño, peso, germinación y vigor, por

lo tanto semillas llenas, sanas y maduras se almacenan mejor que aquellas que no hayan alcanzado su total grado de madurez.

- Presencia de latencia.

Muchas semillas pueden desarrollar cierto grado de latencia cercano al momento de la cosecha. Esta latencia puede ser debida a diversas causas, como barreras físicas causadas por algunas estructuras o bien por aspectos fisiológicos relacionados con el embrión por presencia de inhibidores o como sucede en muchos casos, una combinación de factores.

- Daños mecánicos.

Estos en las semillas son producto del uso excesivo y/o inadecuado de maquinarias, que no solo producen magulladuras y abrasiones que se manifiestan por un rápido descenso y pérdidas de vigor, dando origen a plántulas débiles y anormales, sino que hacen a las semillas más vulnerables a infecciones secundarias por hongos e insectos, provocando un rápido deterioro del material.

Origen abiótico. Comprende la humedad de equilibrio de la semilla, la humedad relativa, la temperatura, el período de almacenamiento y la composición de gases de la atmósfera del almacén (FAO, 1993). Estos factores son descritos según Cerovich y Miranda, (2004).

- Humedad de equilibrio y humedad relativa del aire.

Las semillas son higroscópicas y absorben o liberan humedad, dependiendo del ambiente donde se les coloque y su contenido de humedad final se estabiliza cuando estas se exponen a un ambiente específico por un periodo de tiempo determinado. La humedad de equilibrio depende del tipo de semillas, de la temperatura y la humedad relativa del ambiente. Las plagas y patógenos que atacan el grano son menos atraídas al grano seco, por el contrario el deterioro de grano húmedo es muy rápido y puede llegar a niveles de 100% de pérdidas.

- Temperatura.

El contenido de humedad de la semilla también incrementa cuando aumenta la temperatura; siempre y cuando la humedad relativa permanezca estable. Cuando la temperatura del aire se calienta, las semillas disminuirán su humedad de equilibrio. Los microorganismos que atacan el grano almacenado se desarrollan rápidamente a temperaturas entre 28 y 32°C si se encuentra la humedad disponible. La temperatura irá en aumento debido al metabolismo y crecimiento, causando la descomposición del grano.

- Almacenaje.

Las condiciones ambientales del almacén determinan si el grano puede ser almacenado con seguridad. Si el grano esta expuesto a humedades o temperaturas altas comenzará el proceso de deterioro. Este proceso continuara más rápidamente si el grano se encuentra en malas condiciones.

- Gases en la atmosfera.

Entre los factores químicos, el oxígeno y bióxido de carbono influyen fuertemente sobre los granos y semillas almacenados, lo que esta relacionado con el volumen y la porosidad de las semillas almacenadas y los procesos de respiración. Mientras menor sea el contenido de oxígeno de un almacén, menor será la respiración del grano y la actividad de los insectos y los microorganismos reducen sus efectos de daño.

Las características físicas y bioquímicas del grano influyen en los efectos de ciertos factores bióticos y abióticos. La baja conductividad térmica del grano, capacidad de absorción de agua, estructura, composición química, ritmo de respiración y calentamiento, la textura y consistencia del pericarpio y el método y condiciones del secado influyen en los cambios que tienen lugar durante el almacenamiento (FAO, 1993).

1.1.7 Importancia del maíz

El maíz se utiliza principalmente como alimento, forraje y materia prima para la industria.

Alimento. Se puede utilizar todo el grano maduro o no, o bien se puede elaborar como técnicas de molienda en seco para obtener un número relativamente amplio de productos intermedios, como por ejemplo sémola de partículas de diferentes tamaños, harinas, que a su vez tienen un gran número de aplicaciones en una amplia variedad de alimentos.

Forraje. En países desarrollados más del 60% de la producción se emplea para elaborar piensos compuestos para aves de corral, cerdos y rumiantes.

Materia prima. Los subproductos de la molienda en seco son el germen, que se utiliza para obtener aceite comestible de elevada calidad y la cubierta seminal o pericarpio se emplea fundamentalmente como alimento y fuente de fibra dietética. La molienda húmeda produce almidón de maíz subproductos entre los que figura el gluten, compuesto por un conjunto de proteínas individuales que se pueden clasificar en dos grupos: las prolaminas y las gluteninas. El tipo de prolamina del maíz es la zeina representando el 52% de las proteínas del grano, mientras que las gluteninas corresponden al 25%. Otras proteínas presentes en el grano de maíz son las globulinas que se encuentran en un 5% y las albúminas en 7%. Las proteínas del maíz son de bajo valor nutrimental por que son deficientes en aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano (Wrigley *et al,*2004). El gluten se utiliza como ingrediente alimenticio, mientras que el germen de maíz elaborado para producir aceite da como subproducto harina de germen que se utiliza como pienso (ICMSF, 2001).

Los principales tipos de productos derivados del maíz son:

- Cereales cocidos, que se comen directamente después de su cocción.
- Harinas elaborados a partir de la molturación del cereal y los productos, como bizcochos y galletas.
- Productos deshidratados, consumidos usualmente como productos para el desayuno (ICMSF, 2001).

Las aplicaciones de los residuos de la planta de maíz, que se utilizan, entre otras cosas, como alimento para animales y como base para extraer diversos productos químicos de las panojas (mazorca de maíz). También tiene importancia como elementos para mejorar los suelos (FAO, 1993).

1.1.8 Producción nacional

Desde el punto de vista alimentario, económico y social, el maíz es el cultivo más importante de México. Durante el periodo 1996-2006 ocupó el 51% de la superficie sembrada y la cosecha total en promedio anual; generó el 7.4% del volumen de producción agrícola total, representando el 30% del valor total de la producción. En México se producen diversas variedades de maíz, sin embargo la más importante es la del maíz blanco, cuya participación en la producción total de maíz fue de 94% promedio en el bienio 2004-2005, en tanto que la participación del maíz amarillo significó el 6% en promedio durante el periodo de referencia.

En comparación con la producción de cereales que son importantes en el consumo humano y animal del país (arroz, sorgo y trigo), en el periodo de 1996-2006 la producción de maíz registró una tasa media anual de crecimiento (TMAC) de 2.0%, como se muestra en la Figura 2. No obstante en los periodos agrícolas en 2002 y 2005 se registró un decremento de 4.0 y 11%, respectivamente (Cruz, *et al*, 2008).

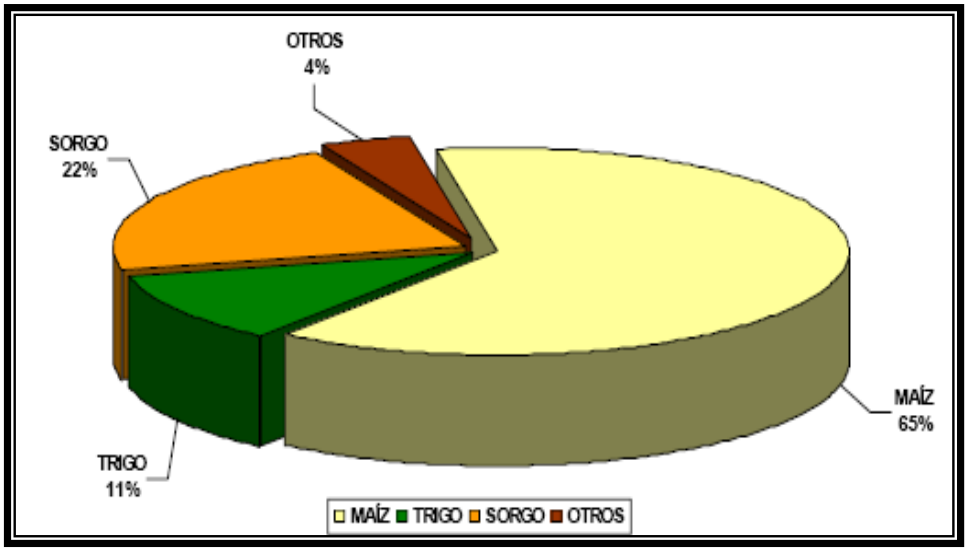


Figura 2. Participación del maíz en la producción de cereales (1996-2006).

Fuente: Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON-SIAP), 2009.

La participación del volumen obtenido de maíz en la producción total de cereales es creciente, ya que en 1996 la participación del maíz fue de 61.5%, en tanto que en 2006 llega al máximo nivel alcanzado en el periodo que se analiza: 68.6% de la producción total de cereales.

Durante el periodo 1996-2006 se produjo un promedio anual de 19.3 millones de toneladas del grano de maíz, con un valor promedio anual de 29,090 millones de pesos (Cruz, *et al*, 2008).

1.1.8.1 Principales Regiones Productoras

La producción del maíz está diseminada en todo el territorio nacional; sin embargo, las regiones Centro Occidente y Sureste del país aportaron el 57.5% de la producción total durante el periodo 1996-2006; la del Centro el 19%. Después de éstas se encuentran las regiones Noroeste y Noreste, cuya participación se cifra en 17 y 7%, respectivamente, como se muestra en la Figura 3.

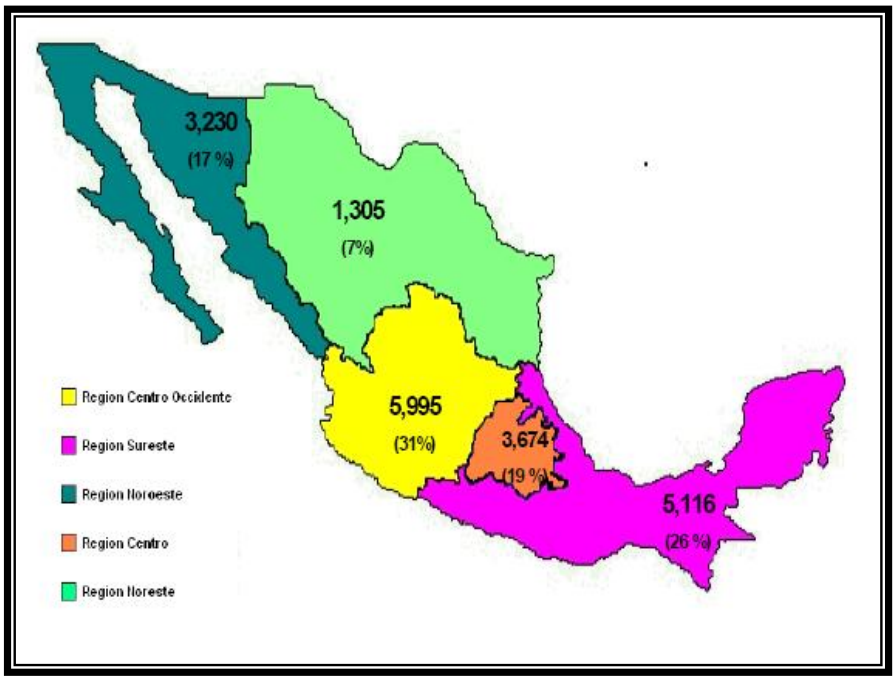


Figura 3. Producción de los principales productores de maíz en México (1996-2006 en toneladas).

Fuente: Sistema de Información Agropecuaria (SIACON), 2009.

En el ámbito estatal, cinco entidades de la República contribuyen con el 55% de la producción total promedio anual (19.3 millones de toneladas), siendo los

principales estados productores, en orden de importancia: Jalisco con 15.4%, Sinaloa, con 14.4%; Estado de México con el 9.9%; Chiapas, 9%, y Michoacán con el 6.5%. La producción conjunta de estos estados es equivalente a 10,652.3 miles de toneladas. El 45% restante de la producción se distribuye en 27 estados del país, entre los que destacan Guerrero, Veracruz, Guanajuato, Puebla, Oaxaca y Chihuahua.

Se estima que la TMAC de la producción para el periodo 2007-2012 será de 1.6%; comportamiento que se explica por la mayor obtención de volumen por hectárea en los principales estados productores del ciclo Otoño-Invierno, localizados en el norte de la República, como son: Sinaloa, Tamaulipas y Sonora, de acuerdo con el orden de importancia. Se espera que en la primera entidad se alcance un rendimiento promedio cercano a las diez toneladas por hectárea (Cruz, *et al*, 2008).

1.1.9 Importaciones 1996-2006

México es el cuarto productor de maíz en el mundo, pero también es un importante consumidor del mismo. Aunque se cubre prácticamente la totalidad de la demanda del maíz blanco con la producción nacional, el país es deficitario en maíz amarillo, específicamente grano amarillo No. 2, que tiene diversos usos, principalmente pecuario, por lo cual se tienen requerimientos de importación superiores a los 5 millones de toneladas promedio anual. Durante el periodo 1996-2006, las importaciones de maíz representaron, en promedio, el 39% de la producción nacional (sin contar 1997, cuando dicha participación bajó a 14%). En 2006 las importaciones fueron equivalentes a 7.53 millones de toneladas de maíz amarillo y blanco; la participación del primero en este total representó el 97%, en tanto que la del segundo significó 3%. El principal proveedor del maíz requerido por México es Estados Unidos (Cruz, *et al*, 2008).

1.1.10 Exportaciones 1996-2006

Las exportaciones de maíz en México han sido poco significativas y muy fluctuantes a través de los años, fundamentalmente de maíz blanco principal variedad que se produce en nuestro país para satisfacer la demanda de consumo humano, sobre todo para la elaboración de tortillas, entre una gran diversidad de productos culinarios.

Los países hacia los que se destinan las exportaciones de México de maíz blanco son principalmente de Centroamérica. Estados Unidos también compra el maíz blanco de México en un promedio anual aproximadamente 500 toneladas anuales (Cruz, *et al*, 2008).

1.1.11 Producción mundial

Por lo que se refiere la producción mundial de maíz, ésta registró una tasa media de crecimiento anual de 2% en el periodo de análisis, muy superior a la experimentada por la superficie cosechada que tuvo un ritmo de crecimiento de tan sólo 0.6% anual. Lo anterior se explica por la dinámica de crecimiento de los rendimientos que fue de 1.4% anual; esto, gracias a la utilización de semillas mejoradas y tecnologías de punta.

De acuerdo con información de la FAO, en 2005 se alcanzó un volumen de 711.8 millones de toneladas, inferior al 2.2% al obtenido en 2004, cuando llegó a una cifra récord de 726.5 millones (SIACON-SIAP, 2009).

Los principales países productores de maíz son: Estados Unidos de América, que contribuyó con el 40% de la producción total, seguido por China con el 19%, Brasil con 6% y México con 3% como se muestra en la Figura 4.

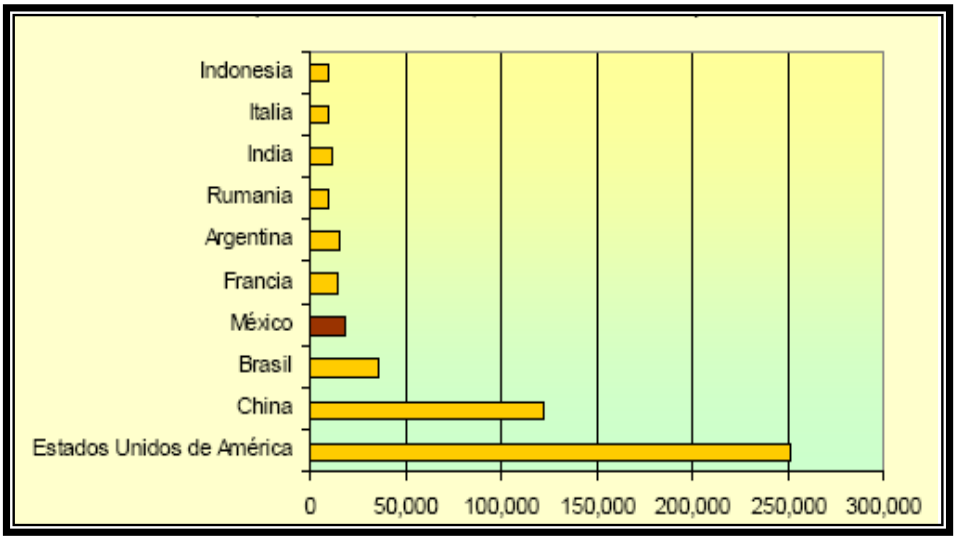


Figura 4. Producción mundial de los principales países productores de maíz (Promedio 1996-2005, en Toneladas)

Fuente: Sistema de Información Agropecuaria y de Consulta (SIACON-SIAP) con datos de FAO, 2009.

Así, el comercio mundial ha aumentado entre 1995 y 2004, con un crecimiento en la participación de la producción mundial, de 13 a 14%, como se muestra en la Figura 5; porcentaje que representa más de 80 millones de toneladas métricas en promedio. En este renglón destaca la participación de Estados Unidos con el 60% de las ventas mundiales (fundamentalmente de la variedad amarilla), seguido por Argentina, con el 12%; Francia con el 9% y China con el 8% (Cruz *et al*, 2008).

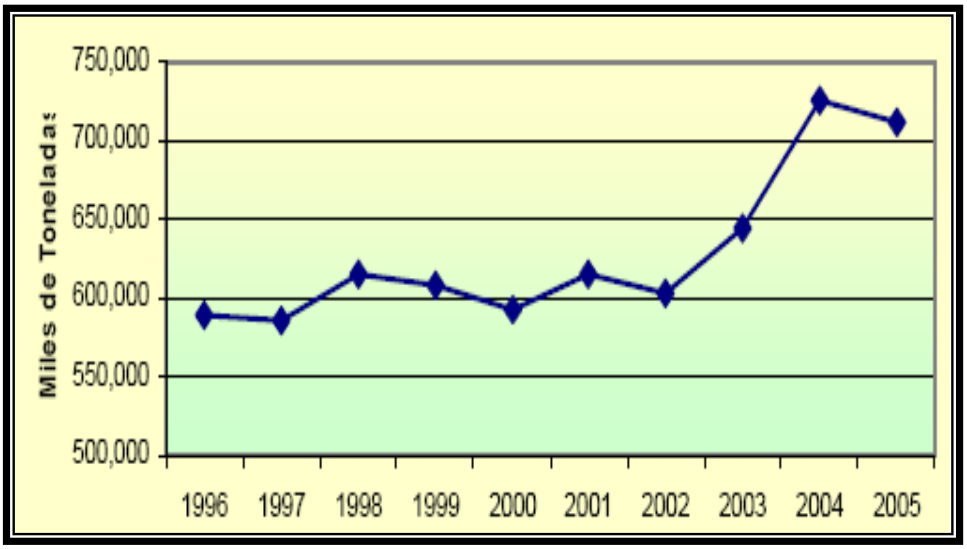


Figura5. Análisis de la producción mundial

Fuente: Sistema de Información Agropecuaria y de Consulta (SIACON-SIAP) con datos de FAO, 2009.

1.2.0 Aceites Esenciales

Un aceite esencial es un líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable, que se obtiene de las diferentes partes de una planta (hojas, raíces, flores y frutas) por algún método físico de extracción. En el reino vegetal se conoce la estructura química de aproximadamente 10,000 metabolitos secundarios, pero se calcula que deben de existir alrededor de 40,000 de ellos de muchas especies de plantas que aún no han sido estudiadas (Swaminathan, 1998).

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, muy raramente tienen color y su densidad es inferior a la del agua. Representan la fracción aromática más importante del vegetal; está constituida por una mezcla muy compleja de compuestos, principalmente terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles,

ácidos, aldehídos y ésteres. Son liposolubles, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos se solubilizan parcialmente en etanol, en cloroformo y en aceites fijos y es insoluble en agua (ICMFS, 2001). Son aceites volátiles, aromáticos de la plantas. No tienen nada que ver con los aceites comestibles puesto que no son ésteres de glicerol (Badui, 1993).

1.2.1 Clasificación de aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican por su consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios, de la siguiente manera:

Consistencia

- Esencias fluidas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos. Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.
- Oleorresinas. Tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

Origen

- Naturales. Se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosos.
- Artificiales. Se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes.
- Sintéticos. Son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes.

Naturaleza química y a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo a:

- Los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.).

- Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. copaiba, pino, junípero, etc.).
- Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. clavo, canela, anís, etc.).

Aunque esta clasificación es muy general resulta útil para estudiar algunos aspectos fitoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos, sin embargo existen clasificaciones más complejas que tienen en cuenta otros aspectos químicos (Aceites Esenciales, 2002).

De acuerdo con Reineccius (1994), se pueden clasificar químicamente en cuatro grupos:

- Terpenos o hidratos de carbono de fórmula general $(C_5H_8)_n$.
- Derivados oxigenados de los terpenos.
- Compuestos aromáticos que contienen una estructura benzoica.
- Compuestos que contienen azufre y/o nitrógeno.

1.2.2 Fuentes de obtención de aceites esenciales

Los aceites esenciales proceden de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales. Se forman en las partes verdes (con clorofila) del vegetal y al crecer la planta son transportadas a otros tejidos, en concreto a los brotes en flor.

Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, eucalipto, hierbabuena, mejorana, menta, pachulí, romero, salvia, etc.), en las raíces (angélica, cúrcuma, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (cítricos como limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores (lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, rosa, etc.) y en los frutos (nuez moscada, pimienta, etc.) (Aceites Esenciales, 2002).

1.2.3 Métodos de obtención de aceites esenciales

Para obtener un aceite esencial de calidad hay que tomar en cuenta los diferentes factores que pueden afectar su composición. Son 5 los aspectos fundamentales que determinan la composición química de los aceites esenciales: 1) variedad genética y el estado de desarrollo de la planta o sus

órganos, 2) factores geográficos o ambientales como la temperatura, luminosidad, humedad relativa, composición del suelo, 3) prácticas culturales, 4) corte y operaciones de postcosecha y 5) el método de extracción.
Existen varios métodos para obtenerlos:

- Expresión. Se usa generalmente para cítricos; consiste en aplicar una presión alta sobre la cáscara para obtener el aceite; en estas condiciones, el producto no se expone a temperaturas elevadas, no se daña, y se logra un líquido con características sensoriales más representativas de la materia prima correspondiente (Badui, 1993). Los aceites obtenidos por prensado y/o raspado, se les comercializa como "expresión en frío" y cumplen las funciones deodorizantes y saborizantes (Sánchez, 2006).

- Destilación por vapor. Es uno de los principales métodos; al material molido se le hace circular una corriente de vapor que arrastra los volátiles correspondientes; éstos se recuperan al separar el condensado en una torre de enfriamiento. A pesar de que es un método muy común, es también el que más daño causa al aceite, ya que induce reacciones de oxidación, de hidrólisis y polimerización (Badui, 1993). Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, por la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (ICMSF, 2001).

- Extracción con disolventes volátiles. La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes; el proceso ha de buscar que el sólido, el líquido, o ambos, estén en movimiento continuo, para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud (Sánchez, 2006). Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia

impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias no purascontaminadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles es inherente (Aceites Esenciales, 2002).

- Enfleurage**.** La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por medios físico-químicos, en general se recurre a la adición de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Aceites Esenciales, 2002).

- Extracción con fluidos supercríticos. Es de desarrollo tecnológico más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños o molidos, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico es decir que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, la sustancia mas empleada es el CO_2, que en estas condiciones presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conlleva a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo (Sánchez, 2006). Las esencias son así solubilizadas, arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los

componentes de la esencia, el equipo requerido es costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Aceites esenciales, 2002).

Según Vargas-Arispuro (2008), los factores que influyen en la extracción son:

- Tamaño de partícula de la planta.
  - A mayor finura de partícula mayor extracción.
- Tipo de material vegetal.
  - Fresco.
  - Seco.
- Características del solvente.
  - Cantidad del solvente.
  - Polaridad.
  - Pureza.

1.2.4 Composición química de los aceites esenciales.

Las propiedades físico-químicas de los aceites esenciales o esencias son muy diversas, puesto que el grupo engloba substancias muy heterogéneas, de las que en la esencia de una planta, prácticamente puede encontrarse solo una o más de treinta compuestos.

Considerando la gran variedad de los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos. Además de las cuatro familias principales de compuestos químicos mencionados, las frutas y hortalizas contienen otros volátiles como son aldehídos, cetonas, esteres, éteres, lactonas y óxidos. Es precisamente que debido a su compleja composición química, que los aceites esenciales son diversos en sus efectos, y en ello se fundamenta su acción microbiana pues esto contribuye a hacer extremadamente difícil la mutación o inducción de resistencia de los microorganismos. (Bosquez-Molina *et al*, 2009)

1.2.4.1 Compuestos antimicrobianos

Se ha estimado que las plantas sintetizan cientos de miles de diferentes compuestos metabólicos secundarios y que todos los días se reportan otros

nuevos, se han agrupado en cinco clases de acuerdo a la estructura química o según la forma en que la planta los produce.

Por su estructura Flores- Moctezuma (2008a), los agrupa en tres categorías:

Alcaloides. Son compuestos alcalinos con uno o más átomos de nitrógeno, por lo general con un anillo heterocíclico, son heterogéneos químicamente, la mayor parte son sólidos cristalizables, poco solubles en agua, hay líquidos y volátiles que se pueden arrastrar en vapor de agua. Estos tienen un intenso sabor amargo.

Glicósidos o Glucósidos. Son compuestos que al hidrolizarse producen una o más moléculas de azúcar (gliconas) y un componente no azúcar (aglicona). Entre los glicósidos de mayor acción fisiológicas están: los esteroides (lípidos); saponinas y sapogeninas que son un grupo de glicosidos que al disolverse con agua forman espuma. Las sapogeninas se encuentran principalmente en las plantas monocotiledóneas (magueyes y grupos relacionados). Los alcoholes sólidos de origen animal o vegetal llamados esteroles también se encuentran en este grupo.

Terpenoides. Estos varían ampliamente en tamaño molecular desde los monoterpenoides y sesquiterpenoides (aceites esenciales) hasta los terpenoides de alto peso molecular (como las saponinas). Los terpenoides son sustancias amargas presentes en diversos grupos de plantas, como las asteráceas, labiadas, rutáceas, liliáceas, simarubáceas y umbelíferas. Los terpenos son hidrocarburos, isómeros complejos contenidos en compuestos aromáticos. Los aceites esenciales con frecuencia contienen, alcoholes, acetonas, aldehídos, fenoles, éteres, esteres y a veces nitrógenos y azufre; las gomas son polímeros de varios azúcares y las resinas son productos de la oxidación de aceites esenciales.

Lactonas. Son ésteres cíclicos, sustancias amargas presentes en las asteráceas, en algunas umbelíferas y amarantáceas. Los iridoides o lactonas monoterpénicas abundan en las bignoniáceas, labiadas, plantagináceas y escrofulariáceas.

La proporción en la que esta presente cada uno de estos principios depende a su vez de la variedad vegetal, el órgano de la planta, el estado de maduración, las condiciones del cultivo, extracción y la forma de almacenamiento del aceite (Panizzi *et al.,* 1993). Los componentes mayoritarios de los aceites pueden constituir hasta un 85% del total mientras el resto se presentan como trazas.

El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento de peso vegetal hasta 1-3 % (Flores- Moctezuma, 2008b).

A continuación se presentan los nombres de los componentes y principios activos de los aceites esenciales usados en la industria alimentaria (Bosquez-Molina *et al*, 2009).

1.2.5 Aceite esencial de canela

Nombres vulgares: Canela, canela de Ceilán.

Nombre científico: (*Cinnamomun verum* = *Cinnamomun zeylanicum*).

Familia. Lauraceae

Componentes (www.botanical-online.com, 2008).

- Ácidos: ascórbico, palmítico p-cumérico (corteza).
- Terpenos: alfa-pineno, alfa-terpineno, alfa-ylangeno, beta-pineno, camfeno, cariofileno, limonelo, linalol (corteza).
- Cumarinas (corteza).
- Aceite esencial rico en benzalheído (planta), eugenol, farnesol, gamma-terpineol, geraniol, isoeugenol, cariofileno (corteza).
- Furfural, Alcanfor, Fibra, Taninos,Mucílagos (corteza).
- Minerales: boro, calcio, zinc, cloro, cobre, cobalto, cromo, estroncio, fósforo, hierro, magnesio, níquel, plomo, potasio, sodio, yodo (corteza).
- Vitaminas: vitamina C, niacina, tiamina.

Principios activos

Aceite esencial (1,2-2%): aldehído cinámico (50-75%), eugenol (4 -10%), cuya estructura se muestra en la Figura 6 trazas de carburos terpénicos (pineno, cinel, felandreno, linalol), y de metilamilcetona; glúcidos, mucílagos, taninos, trazas cumarinas.

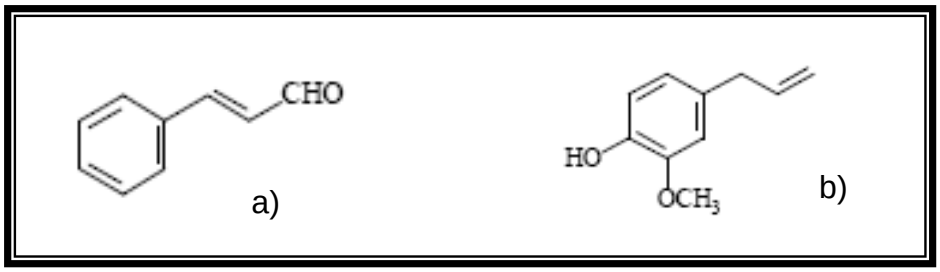


Figura 6. Estructura química de a) Cinamaldehído, b) Eugenol

Fuente: Secondary Plant Compounds. (Judd *et al,* 2002)

1.2.6 Aceite esencial de tomillo

Nombre vulgar: Tomillo.

Nombre científico: *Thymus vulgaris*.

Familia. Labiadas

Componentes (www.botanical-online.com, 2008).

- Ácidos: ácido oleico, palmitico, nicótico, rosmarínico y linoleico (planta), ácido ascórbico (hojas).
- Aceites esenciales: timol, anetol y borneol (hojas), carvacrol y cíñelo (toda la planta).
- Aminoácidos: cisteina, valina, glicina, isoleucina (planta).
- Metales y minerales: aluminio, calcio, cobalto y magnesio (hojas); hierro (planta).

Principios activos.

La esencia del tomillo se distribuye por todas las partes de la planta, sobre todo en flores y hojas; posee dos sustancias farmacológicamente energéticas: timol y carvacrol (Figura 7), que pueden variar entre el 3 y 60%. Además se encuentran taninos, aceites y un glucósido.

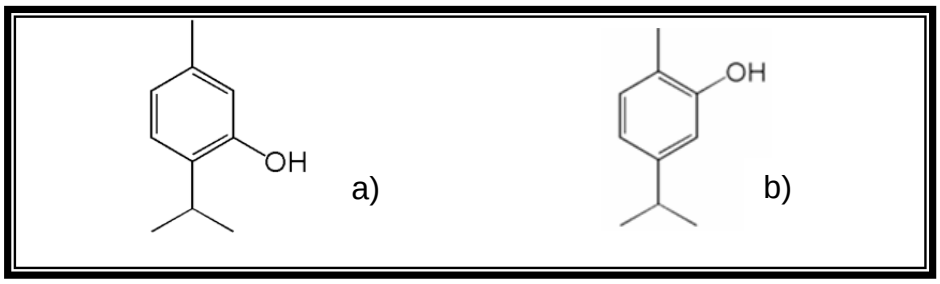


Figura 7. Estructura química a)Timol, b)Carvacrol

Fuente: Secondary Plant Compounds. (Judd *et al,* 2002)

1.2.7 Usos de los aceites esenciales

Los aceites esenciales tienen características sensoriales muy similares a la materia prima de donde provienen, pero con una potencia o intensidad hasta 100 veces mayor; por esta razón, se usan en concentraciones que van de 0.01 a 0.1% para aromatizar diversos alimentos, bebidas, perfumes, etcétera (Badui, 1993). La industria de la alimentación utiliza el aceite esencial para la conservación de alimentos y su riqueza en aromas y para dar sabor y olor como condimentos y saborizantes a numerosos preparados, entre ellos refrescos como las colas, los chicles o numerosas bebidas alcohólicas. El reconocido principio aromático y de sabor de extractos vegetales de diferentes tipos de plantas han motivado el uso de varios de ellos, principalmente como agentes saborizantes de alimentos y bebidas. Sin embargo son pocos los alimentos que a nivel comercial contienen aceites esenciales como bioconservadores. Los aceites esenciales se pueden utilizar en forma de emulsiones o absorbidos en sustancias portadoras para facilitar la manipulación y mejorar la distribución en el alimento. Tienen la ventaja de contener pocos microorganismos, si es que contienen, pero tiene algunos inconvenientes con respecto al sabor en algunos productos alimenticios (ICMSF, 2001).Los aceites esenciales son los ingredientes básicos en la industria de los perfumes y aromatizantes, se utilizan en jabones, desinfectantes y productos similares. En la industria farmacéutica el aceite esencial entra a formar parte en la composición de numerosos productos relacionados con la higiene de la boca también se emplea en la composición de jarabes para el resfriado, catarro y para vaporizaciones nasales; además tienen importancia en medicina.

Los aceites esenciales son importantes en la industria cosmética en la elaboración de perfumes, jabones, champús, etc.

1.2.8 Efecto inhibitorio

Se desconoce la función exacta de un aceite esencial en un vegetal; puede ser para atraer los insectos, para la polinización, o para repeler a los insectos nocivos, o puede ser simplemente un producto metabólico intermedio.

Los mecanismos implicados en la acción de los agentes antimicrobianos son muy diversos. Entre los cuales pueden citarse:

a) Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular.
b) Daños a la integridad de las membranas
c) Interferencia con una gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

Algunos agentes microbianos pueden afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de actividad inhibitoria más reducida; del mismo modo algunos compuestos antimicrobianos pueden ser directamente microbicidas, mientras que otros actúan como biocidas (Mossel, 1982).

Al ser mezclas complejas de numerosas moléculas de gran diversidad de grupos químicos, es muy probable que la actividad microbiana no se atribuya a un mecanismo específico ya que en las células hay diferente sitios en donde pueden actuar, y los eventos pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultánea o consecuentemente. El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite incorporarse a los lípidos de las membranas bacterianas, modificando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros compuestos de la célula vitales para su sobrevivencia conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (Lambert, R. *et al,* 2001). Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática deformando la interacción lípido-proteína y afectando la activad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular; otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de las moléculas de proteína (Bosquez-Molina *et al*, 2009).

La actividad antimicrobiana de las especias debido a su contenido de aceites esenciales es de escasa importancia en la conservación del alimento, en general las concentraciones de aceites esenciales en los alimentos condimentados son demasiado bajas para inhibir el crecimiento microbiano. Sin embargo, los aceites esenciales a veces aumentan otras actividades antimicrobianas o actúan sinérgicamente y en casos excepcionales pueden ser el conservador principal (ICMFS, 2001).

La especia y hierbas que contienen los aceites esenciales más inhibidores son el clavo, el tomillo, el orégano, la canela y el comino. La volatilidad de los

compuestos activos en los aceites esenciales desempeña un papel en la duración de la actividad microbiana. El modo de acción de los compuestos fenólicos no ha sido determinado, estos pueden, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético.

Muchos investigadores han usado aceites esenciales como canela, menta, albahaca y tomillo para proteger los granos contra la infección de *A. flavus* sin afectar su germinación y crecimiento (Montes y Carvajall, 1998). Así mismo, los aceites esenciales pueden ser utilizados de una manera segura para preservar algunos alimentos, el aceite de tomillo se ha encontrado que inhibe el desarrollo de los hongos a bajas concentraciones y puede ser aplicado al grano almacenado para protegerlo de la contaminación de hongos. También el aceite de canela puede ser usado como un aditivo en algunos granos como cacahuate y maíz palomero. Estos aceites pueden ser utilizados como sustitutos de fungicidas químicos por ser naturales y no tóxicos para el consumo humano (Soliman y Badeaab, 2002).

Algunos estudios realizados en alimentos reportan que la salsa estilo italiana, conteniendo 0.3% de aceite esencial de orégano y 0.3% de aceite esencial de tomillo redujo significativamente cuentas aeróbicas en placa de *Escherichia coli* O157:H7 por 3log UFC/g ($P<0.05$) en filetes crudos de pechuga de pollo. Esta combinación de orégano y tomillo fue letal para *Salmonella thyphimurium, Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* (Draughon, 2004). Para los productos cárnicos los aceites esenciales de orégano, tomillo clavo y cilantro son los más efectivos en concentraciones entre 5-20 µL/g. Se ha observado que entre mayor sea el contenido de grasa en el producto, se reduce notablemente el efecto de los aceites esenciales. Se ha observado que los aceites esenciales de tomillo, romero, clavo y canela en pan de arroz inhiben *Eurotium spp, Aspergillus spp* y *Penicillum spp,* pero su eficacia depende del pH y la actividad de agua (Bosquez-Molina *et al*, 2009).

1.2.8.1 *In situ*

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *in vitro* es un hecho confirmado, sin embargo se ha encontrado que se requieren mayores concentraciones para obtener el mismo efecto en los alimentos. No solo el contenido de grasa, proteínas, agua, pH y aditivos en el alimento influyen en la

sensibilidad microbiana, sino también factores como la temperatura, el tipo de envasado (vacío, gas inerte, aire). Esto es la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales depende de la concentración empleada, del microorganismo, del alimento y de las condiciones de prueba, por lo que los estudios con el mismo aceite esencial pueden arrojar diferentes resultados.

Por otro lado aunque la mayoría de los aceites esenciales son aceptados por la FDA como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) (Code of Federal Regulations, 2003), su empleo como aditivos de alimentos a nivel mundial esta limitado dado que aún no se han resuelto las concentraciones a aplicar, ya que están restringidas por las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), lo que a su vez esta determinado por el gusto del consumidor final para quien el efecto sensorial no debe ser adverso (Bosquez, *et al,*2009).

1.3.0 Hongos

Los hongos son organismos a los que se les ha reconocido como un grupo independiente del Reino Vegetal, para lo cual se ha constituido el Reino Fungi. Estos organismos son eucariontes, lo cual significa que tienen núcleos bien definidos por membranas y que contienen un determinado número de cromosomas, lo cual los diferencia de las bacterias. Los hongos son heterótrofos, por lo tanto dependen de la obtención de compuestos orgánicos a través de sus actividades como saprobios, simbiontes o parásitos. La mayoría de los hongos están constituidos por estructuras tubulares llamadas hifas, las cuales en algunas especies se mantienen simples, formando lo que se conoce como micelio, y en otras se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad, como lo son las llamadas setas u hongos superiores. Las levaduras son una excepción a esta característica, siendo unicelulares. La reproducción de los hongos se lleva a cabo principalmente por medio de propágulos de origen asexual y sexual, a los cuales, en términos generales, se les conoce con el nombre de esporas. Sin embargo, hay algunos hongos que no producen esporas, por lo que su reproducción se realiza a través de estructuras somáticas, como lo son el propio micelio o estructuras derivadas del mismo (Moreno 1988).

1.3.1 Clasificación

Los hongos que invaden los granos y semillas fueron clasificados ecológicamente por Christensen y Kaufmann (1965) en los siguientes grupos:

1.3.1.1 Hongos de campo

Invaden a las semillas durante su formación en el campo y en algunos granos al recolectarlos; requieren contenidos de humedades para su desarrollo arriba del 23%. Los hongos de campo requieren humedades relativas de 90 a 100%. Entre estos se encuentran las especies de *Fusarium, Cladosporium, Alternaria* y *Helminthosporium*, entre otros, que se caracterizan por ocasionar enfermedades a las plantas y que son transmitidos de un ciclo a otro a través de las semillas. Algunos hongos de campo son patógenos para los granos y pueden causar considerables daños en los granos como provocar manchas, necrosis, escoriaciones, pudrición, decoloraciones, pérdidas de la capacidad de germinación en semillas, además de disminuir la calidad del grano por la producción de micotoxinas poniendo en riesgo la salud del hombre y animales (ICMSF, 2001; Watson, 1987; Chelkoswki, 1991; Willcock y Morgan, 2001).

1.3.1.2 Hongos de almacén

Invaden los granos después de la recolección, durante el transporte y almacenamiento. Los hongos de almacén crecen en humedades relativas de 65 a 90% y en contenidos de humedad de las semillas de cereales superiores a 13%, condiciones de humedad muy frecuentes en el almacenamiento de granos. Entre estos hongos se encuentran los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo las especies *Aspergillus* las más comunes en el maíz almacenado, sin embargo, ambos géneros pueden inducir pudriciones en mazorca. Los hongos de almacén, como las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, causan diversos daños a los granos y semillas almacenadas, alteran los granos de diversas formas, incluyendo la pérdida de la capacidad de germinación, decoloraciones, olores anormales, pérdida de materia seca, crecimiento visible, cambios químicos y nutritivos, calentamiento, apelmazamiento y formación de micotoxinas (Moreno, 1988; Sauer *et al.,* 1992; Pérez, 1997; ICMSF, 2001).

1.3.1.3 Hongos de deterioro avanzado

Los hongos de deterioro avanzado son aquellos que invaden a los granos y semillas cuando estos ya se encuentran en productos almacenados en pésimas condiciones y que en ocasiones se inicia en el campo; proliferan en altas humedades relativas superiores al 90%. Entre estos hongos se pueden mencionar a *Chaetomiun, Sordaria, Aspergillus clavatus, Rhizopus* y *Aspergillus fumigatus.* Su característica biológica principal, es la de ser excelentes degradadores de materia orgánica por lo que destruyen a los granos y productos que invaden, además de que algunos de ellos tienen la capacidad de producir micotoxinas (Moreno, 1988; Watson, 1987; Chelkoswki, 1991; ICMSF, 2001; Willcock y Morgan, 2001).

1.4.0 Importancia de *Aspergillus*

Aspergillus es el nombre genérico para designar a un grupo de hongos, este grupo de hongos se encuentra entre los seres vivos más abundantes en la naturaleza. Las condiciones que favorecen el crecimiento de *Aspergillus* son las altas temperaturas en áreas tropicales y subtropicales particularmente, estas condiciones favorecen también la producción de aflatoxinas de especies correspondientes a la sección *Flavi*. El género *Aspergillus* es de los más ubicuos y omnívoros que hay, cosmopolita, y con gran cantidad de especies saprobias, algunas parásitas de vegetales, animales, humanos y otras de importancia industrial. Algunas especies tienen su teleomorfo en los géneros *Eurotium* (Link ex. Fr.), en *Sartorya* (Vuill.) o en *Emericella* (Berck.), con cleistotecios se reconocen más de 8 estados sexuales (Deepack y Santos, 2001).

1.4.1 Clasificación del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* está integrado por especies con características morfológicas generales muy similares, entre las especies del grupo y su clasificación en especies individuales se basa principalmente en características morfológicas específicas (forma, estructura, tamaño y color) y fisiológicas (reproducción y crecimiento) Raper y Fennell (1965).

En un principio los investigadores dividieron en grupos o series basadas en conidios de color, tamaño y forma de vesículas, la presencia de un estado

teleomorfo, etc. Los grupos se cambiaron oficialmente a subgéneros y secciones por Gams *et al.* (1985) equiparándose con el código Botánico. A continuación se presenta la clasificación del género *Aspergillus* según Gams *et al.* 1985.

Subgénero *Aspergillus* - uniseriados, xerofilos, crecimiento en CY20S> CYA25, conidios gris verde.

Sección *Aspergillus* - Teleomorfo *Eurotium* - amarillo cleistotecio con pared formada por una sola capa de células poligonales pseudoparenquimatosos y ascosporas hilianas.

Sección *Restricti* - anamórfo estricto, lento crecimiento en todos los medios.

Subgénero *Fumigati* - uniseriados, vesículas principalmente piriforme, conidio gris-verde, azul-verde a naranja.

Sección *Fumigati* - conidios gris-verde a azul-verde.

Sección *Cervini* - conidios de color ligeramente naranja a naranja-gris.

Subgénero *Ornati* - uniseriados, conidios gris-verde, amarillo-verde o oliva-marrón.

Subgénero *Clavati* - uniseriados, vesículas principalmente clavadas, conidios gris-verde.

Sección *Clavati* - por subgénero

Subgénero *Nidulantes* - biseriados, conidios de colores variables

Sección *Nidulantes* – Estípites cortos a menudo de color marrón, conidios verdes, células de Hülle a menudo presentes, la mayoría de las especies *Emericella* con teleomorfo. Cleistotecio de paredes suaves, rodeado de células Hülle, ascosporas de color rojo-morado.

Sección Versicolores - Estípites hialino marrón, conidios verde, gris-verde o azul-verde.

Sección *Usti* - Estípites marrón, conidios rojo oscuro, marrón-oliva.

Sección *Terrei* - Estípites hialinas, conidio ocre a naranja-marrón.

Sección *Flavipedes* - Estípites hialinos marrón pálido, conidios de color blanco a ocre.

Subgénero *Circumdati* - uniseriados o biseriados, vesículas esféricas a piriformes.

Sección *Wentii* - conidios ocre, amarillo-marrón o marrón-oliva.

Sección *Flavi* - conidios de color amarillo-verde a marrón-oliva.

Sección *Nigri* - Estípites paredes lisas, conidios negro o bordeados con negro.

Sección *Circumdati* - predominantemente biseriados, conidios de color amarillo, ocre.

Sección *Candidi* - conidios blancos o casi blancos.

Sección *Cremei* - conidios marrón, amarillo o azul-verde.

Sección *Sparsi* – conidios gris pálido a oliva-ocre.

Subgénero S*tilbothamnium* - especies que forman sinemas

1.4.2 Morfología

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezuelas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosas, radiadas, columnares o claviformes y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato.

En los *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos *Aspergillus* hay células adyacentes a las fiálides, denominadas métulas o esterigmas. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas conidiales de ambos tipos (Kozakiewicz 1989).

A continuación se muestran los diferentes tipos de cabezas conidiales del género *Aspergillus* (Figura 8).

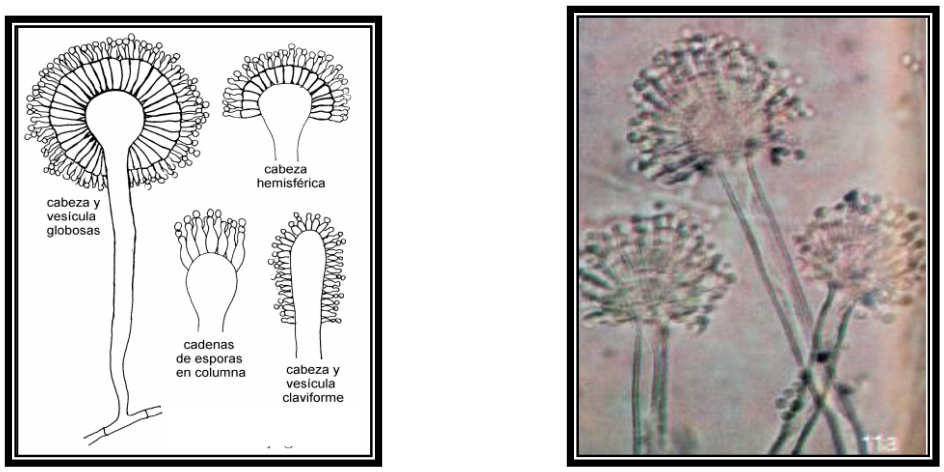


Figura 8. Conidióforos de *Aspergillus*

Fuente:. *Aspergillus* species on stored products. Kozakiewicz Z. 1989

1.4.3 Descripción de las secciones de *Aspergillus*

A continuación se describen las características del género *Asperigillus* que comúnmente se aíslan de los granos almacenados y sus derivados, según Moreno, 1988 y Gams *et al.* 1985.

a) **Sección *Restricti.*** Los miembros de esta sección requieren alta presión osmótica para crecer, y humedad relativa entre 70-75%. No son productores de micotoxinas. Afectan la germinación de las semillas. Las colonias de estos hongos son pequeñas y de color verde oscuro y las cabezuelas conidiales son columnares, a simple vista se pueden confundir con *Penicillium*.

b) **Sección *Aspergillus***. Las especies más comunes en granos y semillas son de *A. amstelodami, A. chevalieri y A. ruber* requieren una humedad relativa de *75%* y crecen en cereales con contenidos de humedad tan bajos como 13.5-14.0%. No hay evidencias claras de su poder toxigénico sin embargo, se dice que *A. chevalieri* produce una toxina denominada xantocilina. Estos hongos imparten colores y olores desagradables a los granos y afectan la germinación de las semillas.

c) **Sección *Flavi***. Se les considera principalmente como hongos de almacén, sin embargo, se les ha encontrado invadiendo al maíz desde el campo con la consiguiente producción de aflatoxinas. Las especies de este grupo requieren para crecer humedades relativas de 80-85 %, en cereales con contenidos de humedad de 16.5-18.0%, y en cacahuate de 8.0-10.5%. Su desarrollo contribuye al calentamiento de los granos. Algunas especies producen aflatoxinas, para concluir que estas se encuentran presentes en una determinada muestra es necesario confirmar la presencia a través del análisis del químico. El color de las colonias es verde amarillento. Dos especies importantes de este grupo son A. *flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, en las que algunas de sus cepas son productoras de aflatoxinas.

d) **Sección *Candidi***. En este grupo sólo existe una especie: *Aspergillus candidus* Link; este hongo requiere humedades relativas alrededor de 80% y crece en cereales con contenidos de humedad de 14.5-16.0%. No se le

considera hongo toxígeno. Reduce el poder germinativo de las semillas y es uno de los hongos involucrados en el calentamiento de los granos. Presenta colonias de color blanco, tanto jóvenes como viejas.

e)* Sección *Versicolores. Hongos de almacén que requieren que los productos tengan contenido de humedad en equilibrio con humedades relativas de 80-85%. Las colonias en su periferia presentan cabezuelas jóvenes de color verde-azul brillante y las cabezuelas más viejas, hacia el centro de la colonia, son de color verde oscuro; de ahí su nombre específico de *A. versicolor.* Tales diferencias en el color de las cabezuelas viejas y jóvenes le dan una apariencia de anillos de diferentes colores. Es posible confundir a simple vista estas colonias con especies de *Aspergillus glaucus,* estas últimas presentan cleistotecios (estado sexual) y *A. versicolor* nunca tiene estas estructuras; además los esterigmas y fiálides de *A. versicolor* están en dos series. En este grupo se encuentran las especies *A. versicolor* (Viull) Tiraboschi y *A. sydowi*. Estas dos especies son productoras de toxinas y se les ha encontrado en productos almacenados. La principal diferencia entre estas dos especies es el color; *A. versicolor* presenta cabezuelas conidiales de color verde amarillo pálido y en *A. sydowi* son de color azul fuerte.

f)* Sección *Circumdati. Los miembros de este grupo requieren humedades en equilibrio con una humedad relativa de 80 % no son muy comunes en los granos, ya que no son buenos competidores contra especies de *A. glaucus* y *A. candidus;* sin embargo, se aíslan frecuentemente de granos de maíz. Crecen en cereales con contenidos de humedad entre 14.5 y 16.0 %. El color característico de las especies aisladas en granos es el ocre; existen dos especies con este color *A. ochraceus* Wilhem y *A. ostianus* Wehmer. Estas dos especies se pueden distinguir entre sí por el tamaño de sus conidios y por el color de sus esclerocios. *A. ochraceus* presenta esclerocios de color rosa a púrpura y sus conidios son globosos de 2.5 a 3.0 micras; por otra parte, *A. ostianus* presenta conidios piriformes y sus esclerocios son de color pálido. Estos hongos producen ocratoxina y ácido penicílico. La ocratoxina es tan tóxica como las aflatoxinas, pero no se produce fácilmente en los productos

almacenados. El desarrollo de estos hongos contribuye al calentamiento de los granos.

1.5.0 Micotoxinas

La palabra micotoxinas, se deriva del griego *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente, son metabolitos secundarios tóxicos de bajo peso molecular (PM<100 g/mol) producidos por los hongos durante su crecimiento, representan un peligro sanitario de origen microbiano importante en los cereales. Se sintetizan a partir de algunos productos del metabolismo primario, catalizados por enzimas (Bourgeois, 1994).

Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento somático en cultivo puro. Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho (Figura 9) siendo a menudo asociados con la diferenciación y la esporulación (Soriano, 2007; Goldblatt, 1972).

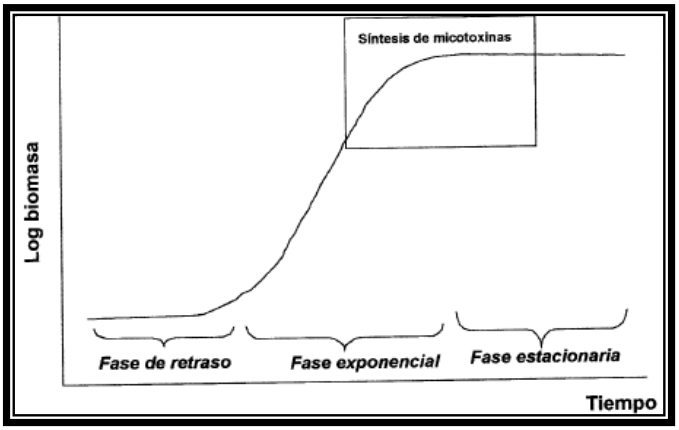


Figura 9. Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.

Fuente: Micotoxinas en alimentos. Soriano, 2007.

Existen varios géneros de mohos que incluyen especies toxígenas, tres de ellos sobresalen por su importancia en granos y semillas: *Aspergillus, Penicillum* y *Fusarium* (Cuadro 3).

Hasta el momento, se han descrito alrededor de 300 micotoxinas; las principales son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisina y alcaloides ergóticos.

Las micotoxinas pueden contaminar los alimentos, los piensos, o las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis resultando tóxicos para el hombre o los animales, cuando la ingestión de alimentos contaminados con micotoxinas está en cantidad suficiente así mismo una micotoxicosis; ha sido definidas como el envenenamiento provocado por sustancias tóxicas de origen fúngico. Éstas incluyen ingestión de hongos venenosos o la ingestión de granos, semillas, hojas muertas caídas, tallos, frutos, forraje afectados por micelio o diversas estructuras fúngicas es un problema alimentario, que no es ni infeccioso ni contagioso (Bourgeois, 1994).

Cuadro 3. Diferentes especies de mohos y sus micotoxinas:

Especies fúngicas	Micotoxinas
Aspergillus flavus y A. parasiticus	Aflatoxinas
A. ochraceus, Penicillium viridicatum y P. cyclopium	Ocratoxina A
Fusarium culmorum, F. graminearum y F. poae	Zearalenona
F. culmorum, F. graminearum y F. sporotrichioides	Deoxinivalenol, Vomitoxina
F. proliferatum y F. verticillioides	Fumonisinas
F. sporotrichioides y F. poae	T-2 toxina
F. sporotrichioides F. graminearum y F. poae	Diacetoxyscirpenol
Acremonium coenophialum	Alcaloides ergóticos

Fuente: Anim Feed Sci Technol (D´Mello y McDonald, 1997).

La alimentación animal está principalmente constituida por cereales o derivados, forrajes, ensilados, etc., todos ellos sustratos particularmente propicios para el desarrollo de diversos grupos de mohos entre los que se encuentran las especies toxigénicas de los géneros *Aspergillus, Penicillum* o *Fusarium*. Sin embargo no todas las especies animales son igualmente sensibles a una determinada micotoxicosis y, por otro lado, los animales jóvenes son más sensibles que los adultos.

En el hombre el problema es diferente. Los hábitos alimenticios varían de un lugar a otro por lo que la diversificación de los alimentos impide la absorción regular de cantidades suficientes de toxinas para llegar a ser peligrosas (Bourgeois, 1994). Así mismo, se ha encontrado que la

contaminación fúngica influye sobre el valor nutritivo y la palatabilidad de los alimentos y representa un riesgo de micotoxicosis. Los efectos tóxicos son variables dependiendo de la estructura química de la toxina, así como su concentración, duración de la exposición, la especie, sexo, edad y vulnerabilidad de quien lo consuma. La ingestión elevada puede provocar un elevado deterioro de la salud (Denli y Pérez, 2006).

1.5.1 Aflatoxinas

La palabra aflatoxina esta formada por las siguientes letras: la primera letra “A” es por el género *Aspergillus*, las siguientes 3 letras “FLA” es por la especie *flavus* L. y el nombre “TOXIN” que significa veneno (Ellis *et al*., 1991).

El término aflatoxinas se estableció por primera vez en 1960, tras la muerte de más de 100, 000 pavos por el consumo de harina de cacahuate contaminada con estás micotoxinas. (Bennett y Klich, 2003). Estos son compuestos heterocíclicos formados por especies de la sección Flavi; predominantemente *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S.

1.5.2 Propiedades fisicoquímicas

Las aflatoxinas o metabolitos más importantes se denominan B_1 y G_1 por su fluorescencia azul (B_1) o verde (G_1), cuando se exponen a la luz ultravioleta de longitud de onda larga. Las aflatoxinas B_2 y G_2 son dihidroderivados de la B_1 y G_1. Otras aflatoxinas afines serian la B_{2a}, G_{2a} y GM_1. Las aflatoxinas M_1, M_2 y P_1 son hidroxilados de la B_1 y B_2. Se trata en todo caso de compuestos heterocíclicos altamente oxigenados (Frazier, 1993). En el Cuadro 4 se muestra la presencia de aflatoxinas producidas por *Aspergillus*. Químicamente las aflatoxinas son difurocumarolactonas, esta estructura consiste de un anillo bifurano unido a un núcleo de cumarina y un anillo de pentona (AFB y AFM) o bien un anillo de lactona (AFG) como se muestra en la Figura 10.

Cuadro 4. Micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus* sección Flavi.

Especie	AFB	AFG	ACP
A. flavus	+	-	+
A. parasiticus	+	+	-
A. nomius	+	+	-
A. seudotamarii	+	-	+
A. bombycis	+	+	-

AFB:aflatoxinas B1 y B2; AFG:aflatoxinas G1 y G2; ACP: ácido ciclopiazónico.

Fuente: Micotoxinas en alimentos. Soriano, 2007.

En el Cuadro 5 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas de las mismas de las aflatoxinas.

Cuadro 5. Principales propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas

Característica	B_1	B^2	G_1	G_2	M_1
Formula química	$C_{17}H_{12}O_6$	$C_{17}H_{14}O_6$	$C_{17}H_{12}O_7$	$C_{11}H_{14}O_7$	$C_{17}H_{12}O_7$
Peso molecular	312	314	328	330	330
Punto de fusión (°C)	268-269	287-289	244-294	230	290
Fluorescencia	425nm	425nm	450nm	425nm	425nm

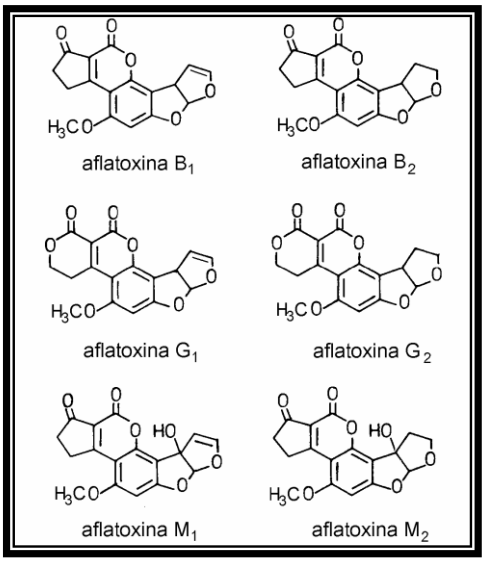


Figura 10. Estructura molecular de las aflatoxinas.

Fuente: *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of mycotoxin biosynthesis. Klich y Cleveland 2000.

1.5.3 Mecanismo de acción

La aflatoxina B_1 (AFB_1) se considera la más importante normalmente aparece con mayor frecuencia y a mayor concentración que las aflatoxinas, restantes aunque las concentraciones relativas entre ellas y la frecuencia de su aparición puede variar ampliamente dependiendo de la cepa fúngica, del sustrato de crecimiento y de las condiciones ambientales. La AFB1 es absorbida en el intestino delgado y transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal. En la Figura 11 se esquematiza el mecanismo de acción de la AFB_1 (Soriano, 2007).

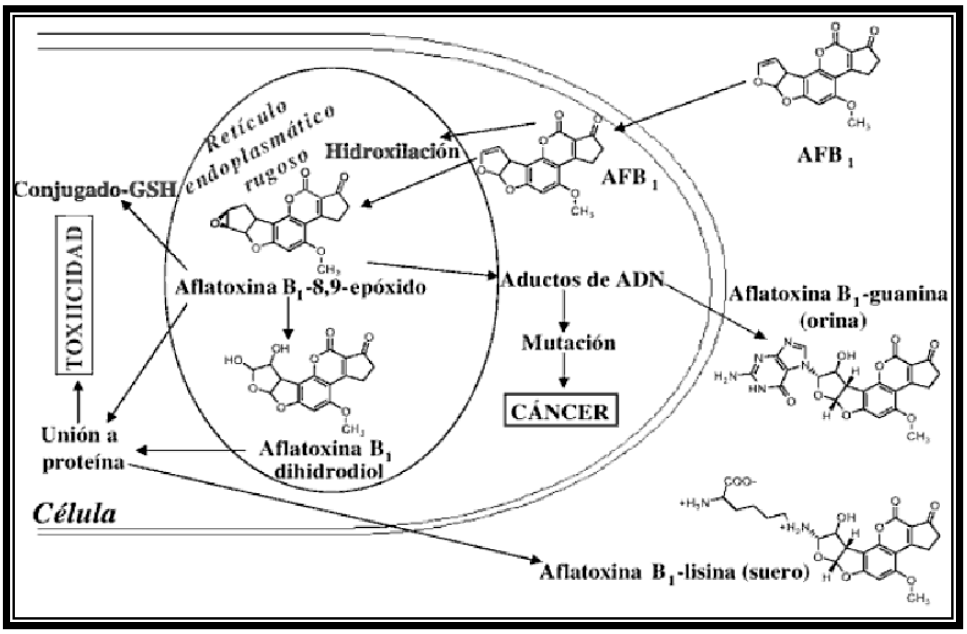


Figura11. Mecanismo de acción de la aflatoxina B1

Fuente: Micotoxinas en alimentos. Soriano, 2007.

1.5.4 Toxicidad

La exposición humana a aflatoxinas se produce principalmente por ingestión de comida contaminada. La inhalación de estas toxinas también pueden ser de tipo laboral o profesional. La aflatoxina B_1 es considerada como el más importante agente carcinógeno de origen natural (Bourgeois, 1994). Si se consumen piensos con aflatoxinas, los animales mamíferos excretan en la leche la toxina transformada como M_1 y la M_2. Aunque ambas son menos toxicas que la B_1 y la B_2 de las que proceden, la M_1 conserva toxicidad y poder carcinogenético (Frazier, 1993).

1.5.4.1 Toxicidad crónica.

La intoxicación crónica, es la forma más frecuente, se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas, meses y/o años. Los efectos tóxicos dependen de las dosis y de la duración de la ingestión, de la edad, la especie, el sexo y sobre todo del estado de nutrición del animal. En las intoxicaciones crónicas los efectos son: proliferación de células epiteliales, degeneración grasa del hígado, cirrosis que evoluciona con esteatosis, inflamación de conductos biliares, hinchamiento de núcleo, fibrosis, adenoma y carcinoma (Soriano, 2007).

1.5.4.2 Toxicidad aguda.

La toxicidad aguda tiene lugar cuando se ingieren grandes cantidades de aflatoxinas, las cuales, son absorbidas en el intestino delgado llegando hasta el hígado. La presencia de aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que originará necrosis y/o muerte celular hepática. En el hígado las enzimas oxidasas las biotransforman en una serie de metabolitos, algunos altamente reactivos, que tienen la capacidad de unirse covalentemente con el ADN, ARN y proteínas. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas celulares, lo cual causa la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición del metabolismo de carbohidratos y de lípidos. Los sintomas son falta de apetito, depresión, ictericia, diarrea y fotosensibilización. También exhibe efectos citotóxicos debidos a que induce la peroxidación lipídica en el hígado produciendo un daño oxidativo hepatocitos. Además, la AFB1 puede inhibir la actividad de las fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales (Soriano, 2007).

1.5.5 Incidencia en alimentos.

Los alimentos considerados más susceptibles a la contaminación fúngica y la consiguiente producción de aflatoxinas son principalmente el maíz, los cacahuates, semillas de algodón, también se han encontrado en otras semillas oleaginosas como el girasol, la soja, en aceites vegetales sin refinar, en otros frutos secos como las almendras, avellanas y nueces, en frutas deshidratados como higos secos, pasas, en el café, cacao, piensos, cereales y sus productos derivados. La presencia de AFB1 en productos de origen animal tales como los

huevos, carne, vísceras, leche y los productos lácteos, aunque la tasa de transferencia desde el pienso hasta los productos comestibles de origen animal suele ser muy baja y, por tanto, su control no suele considerarse prioritario desde el punto de vista de la salud pública.

Los alimentos con elevadas concentraciones de carbohidratos y ácidos grasos favorecen la producción de aflatoxinas, como se ha observado en el coco y cacahuate. Sustratos ricos en proteínas y bajos en carbohidratos no incrementan la producción de aflatoxinas en el caso de *A. parasiticus*. Mientras tanto *A. flavus* puede utilizar pocos carbohidratos pero producir grandes cantidades de aflatoxinas. La producción de aflatoxinas es óptima en productos ricos como el coco, el trigo, el arroz y semillas de algodón.

1.5.5.1 Factores biológicos

- Variabilidad de la cepas

Las aflatoxinas son producidas por las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. No todas las cepas producen aflatoxinas, el genotipo de cada cepa determinada si es o no aflatoxigénica.

- Competencia con la micobiota

La competencia con la micobiota afecta la producción de aflatoxinas; se puede alterar el metabolismo del hongo toxigénico, inhibiendo la producción de la aflatoxinas o también pueden los otros microorganismos metabolizar las aflatoxinas producidas. La micobiota no toxígena puede competir con el hongo productor de aflatoxinas por el sustrato necesario para la síntesis de metabolitos secundarios, o crear condiciones no favorables para la producción de los mismos (Marin *et al*., 1998). Uno de los requerimientos para la producción de aflatoxinas es la presencia de una cepa de *A. flavus, A. parasiticus* o alguna otra cepa productora de aflatoxinas y además que se encuentre prácticamente en cultivo puro y no en competencia con otros microorganismos. Si el contenido de humedad del grano de maíz almacenado permite el desarrollo de estas especies toxígenas, también permitirá que otros hongos crezcan y bajo esas condiciones no se producen aflatoxinas en niveles peligrosos (Moreno, 1988).

- Cantidad de inóculo

El número de esporas presentes puede afectar la biosíntesis de aflatoxinas y la producción "*in vitro*". La producción de aflatoxinas en el laboratorio esta relacionada con la diferenciación y ramificación del micelio (Jinks, 1969).

1.5.5.2 Factores químicos

- Sustrato y nutrimentos

Los sustratos con altas concentraciones de carbohidratos y ácidos grasos aumentan la producción de aflatoxinas. La biosíntesis de aflatoxinas y niveles de producción son influenciados por la composición de los nutrientes del sustrato. Los azúcares simples tales como la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa son la fuente de carbono principal para la biosíntesis de aflatoxinas en *A. flavus* (Davies *et al,* 1969). El zinc y calcio, son importantes para el crecimiento celular, el metabolismo y la biosíntesis.

- Agentes antifugales

Ciertos compuesto inhiben el crecimiento de hongos. El ácido propiónico es un agente antifungistático efectivo contra *A. flavus*, pero esta actividad esta influenciada por el pH y ciertos ingredientes alimenticios (Dixon y Hamilton, 1981).

El acido sórbico es también un conservador alimenticio y ha sido demostrado, que esta sal inhibe el crecimiento y producción de aflatoxinas por *A. flavus*. Este ácido inhibe la biosíntesis de aflatoxinas, por la transferencia de substancias del medio de crecimiento hacia el interior de la célula (Yousef y Marth, 1983).

1.5.5.3 Factores ambientales

- Humedad

El contenido de humedad mínimo de los productos agrícolas para el desarrollo de *Aspergillus flavus* y para la producción de aflatoxinas es aquel en equilibrio con una humedad relativa de 85% (Moreno, 1996). En los cereales como trigo, maíz, sorgo, arroz y mijo ese contenido de humedad es de 16.5-18.5% con base a peso húmedo. En cuanto al límite de humedad máximo para el desarrollo de *A. flavus* y *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas prácticamente no existe; ya que en los laboratorios se pueden producir

aflatoxinas en medio líquido, siempre y cuando sean cultivos puros (Moreno, 1996).

- Temperatura

La temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es de 12°C, la óptima de 27-30°C y la máxima de 40-42°C. *A. flavus* crece lentamente a temperaturas menores de l2°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C; pero no produce aflatoxinas abajo de 12°C, ni arriba de 40-42°C (Moreno, 1988). En la naturaleza, las temperaturas son pocas veces constantes debido a las variaciones estacionales o por calentamiento espontáneo de los granos almacenados. El rango de temperatura para la producción de aflatoxinas va de 7.5-12 a 40-41ºC según los hongos y las condiciones experimentales (Widstrom, 1992).

- Actividad de agua (a_w)

Es la relación existente entre el agua libre en los alimentos y la capacidad de los microorganismos para proliferar. La actividad de agua es la proporción de la presión de vapor de agua del sustrato hasta la presión de vapor de agua pura, a una determinada temperatura y presión. A baja a_w el agua es retenida por las sales, los azúcares, proteínas y otros solutos, por lo cual el crecimiento de los mohos no puede ocurrir sin que el agua este presente en forma disponible. La producción de aflatoxinas decrece en valores de a_w debajo de 0.85 sin embargo, el crecimiento del moho puede todavía ocurrir en valores de a_w de 0.78 hasta 0.80 (Ellis *et al*., 1991). Las condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas podrían alcanzarse con una a_w de 0.85 y una temperatura comprendida entre 25 y 40 °C (Widstrom, 1992).

- Gases atmosféricos

Los hongos son organismos aerobios, pero la relación entre los requerimientos de oxígeno y bióxido de carbono varían constantemente. A concentraciones iguales o mayores a 20% de CO_2 se inhibe la germinación de las esporas y a concentraciones mayores a 10% se suprime la producción de toxinas (Tabak y Cooke, 1968). Un decremento en la concentración oxígeno atmosférico de menos de 20%, o un incremento en la concentración de oxígeno hasta de un 90% se ha encontrado que inhibe la formación de aflatoxinas (Landers *et al*., 1967).

- pH

Los hongos toleran grandes intervalos de pH de 3 - 8, de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Los hongos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro de los alimentos. *A. flavus* L. tiene un crecimiento óptimo en un rango de pH de 5 hasta 8. (Gimeno y Ligina, 2003).

1.5.5.4 Aflatoxinas en el maíz

Las aflatoxinas en maíz pueden estar producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*, especies muy relacionadas entre si. En el caso del maíz, la especie más frecuente es *A. flavus*, que forma aproximadamente del 80 al 90% de la micobiota aislada de muestras al azar, y en maíz generalmente se determinan aflatoxinas del tipo B_1. Se considera que la principal causa de contaminación son los daños producidos por los insectos en las mazorcas. No obstante el hongo también puede contaminar las mazorcas sin que los insectos actúen como vectores y puede ser sistémica la infección en la planta de maíz. El estrés de las plantas debido a factores climáticos es otro factor importante también.

1.6.0 Medidas de control

1.6.1 Prevención

La prevención de la producción de micotoxinas en los cultivos implica el control de la biosíntesis de las toxinas y el metabolismo de los hongos en el campo. El manejo adecuado de los cultivos se considera el método ideal de control de la contaminación de las cosechas con micotoxinas. Sin embargo, en la práctica es difícil controlar factores ambientales como la temperatura y humedad de los cultivos (Denli, 2006). Es importante que los productores sean conscientes de que las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) constituyan la primera línea de defensa contra la contaminación de los cereales por micotoxinas, seguida por la aplicación de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) durante la manipulación, el almacenamiento y la distribución de los cereales destinados a la alimentación humana y animal.

Las recomendaciones para la reducción de las micotoxinas en los cereales se dividen en dos partes:

- las prácticas recomendadas sobre la base de las buenas prácticas agrícolas (BPA) y las buenas prácticas de fabricación (BPF).
- un sistema de gestión complementario que ha de considerarse en el futuro es el Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés).

Este Código de Prácticas Generales contiene principios generales para la reducción de diferentes factores que pueden reducir la proliferación de hongos de micotoxinas en los cereales. Estas prácticas deben informar a los productores en cuanto a los factores ambientales que favorecen la infección, la proliferación fúngica y la producción de toxinas en los cultivos de cereales en las explotaciones agrícolas. Es importante destacar el hecho de que las estrategias que han de aplicarse para la plantación y antes o después de la cosecha de un cultivo determinado dependerán de las condiciones climáticas del año, además de tomar en cuenta los cultivos locales y las condiciones de producción tradicionales en el país o regiones específicas. Así mismo, establecer procedimientos para manejar de manera apropiada, los cultivos de cereales que puedan suponer una amenaza para la salud de las personas y/o los animales separándolos, reacondicionándolos, retirándolos o desviándolos. Las autoridades nacionales deben apoyar la investigación sobre métodos y técnicas para prevenir la contaminación fúngica en el campo y durante la cosecha y el almacenamiento de los cereales.

Una vez las micotoxinas en el sustrato no se pueden eliminar durante el procesamiento culinario o industrial, aunque en unos pocos casos se reduce la concentración de micotoxinas. La mayor cantidad de toxina suele estar concentrada en unos pocos granos y si se logra separarlos, se reduce la proporción de micotoxinas en los subproductos.

1.6.2 Descontaminación

La detoxificación de las micotoxinas se refiere al conjunto de tratamientos posteriores a la cosecha dirigidos a eliminar o reducir los efectos tóxicos de las

toxinas sobre los animales en aquellos granos contaminados. La estrategia puede dividirse en tres, métodos:

1.6.2.1 Tratamientos físicos.

Los procedimientos de descontaminación basados en principios físicos básicamente se clasifican en los tipos:

Extracción con disolventes. Este proceso utiliza la propiedad de solubilidad de las aflatoxinas en solventes polares. Estos métodos tienen como ventaja la extracción total de las toxinas, las desventajas es que algunos carbohidratos se pierden en el proceso de lavado, su uso esta restringido debido a su alto costo de aplicación de los disolventes y problemas de toxicidad en los extractos (Soriano, 2007).

Uso de adsorbentes. En la alimentación animal, se suele utilizar en la práctica puesto que provocan reacciones de aglutinación en el sistema digestivo reduciendo considerablemente la biodisponibilidad de las aflatoxinas y por lo tanto la toxicidad asociada. Los aluminosilicatos de calcio y sodio hidratados, tienen gran afinidad por la AFB1, permitiendo su eliminación (Soriano, 2007).

Temperatura. Las aflatoxinas pueden ser destruidas parcialmente por tostado o rostizado, estando directamente relacionado con la temperatura empleada, el tiempo y el contenido de humedad. Para la inactivación de algunas micotoxinas es necesario aplicar temperaturas de 120°C y presión de 15 libras por cuatro horas, para obtener una reducción hasta del 95%. La AFB1 es estable a 260°C siendo su punto de fusión, aunque en algunos alimentos se necesitan temperaturas tan altas como 300°C para eliminar la toxina. Se cree que lo que ocurre es la apertura del anillo de lactona seguida de una descarboxilación (Miller, 1987, Samarajeewa *et al*, 1990).

Radiaciones. Las aflatoxinas pueden ser degradas con luz ultravioleta y luz solar intensa. La AFB1 absorbe radiación UV a 362 nm, siendo afectada en la parte terminal del anillo furano. Sin embargo, estudios indican un uso limitado, ya que los compuestos de degradación pueden ser a su vez tóxicos (Samarajeewa *et al*., 1990).

1.6.2.2 Tratamientos químicos.

La reducción de contaminación de alimentos con aflatoxinas es factible y práctica, por medio de tratamiento químicos. La mayoría de los estudios se han realizado con la AFB1 pura. Dichas sustancias actúan en algunos de los sitios activos de las moléculas de la AFB1 (residuo cumarina y doble enlace terminal en el furano), provocando con ello su degradación. A continuación se mencionan los tratamientos según Samarajeewa *et al*., (1990).

Alcalinización. El tratamiento alcalino provoca la degradación de AFB1 y esto lo hace abriendo (hidrólisis) el anillo de la lactona presente en la molécula.

Amoniaco. El amoniaco en estado gaseoso o en soluciones, con o sin aplicación de temperaturas y con presión, es una de las maneras más eficientes para descontaminación con aflatoxinas. Este medio puede reducir los niveles de aflatoxinas en maíz y sus productos hasta en un 90%.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La adición de este compuesto facilita la degradación oxidativa de la toxina y por ello ocurre el rompimiento del anillo de furano que facilita que se reduzca el doble enlace en la molécula de la toxina. Se ha observado que los residuos presentes en alimentos tratados con este químico no son tóxicos por si solos.

Hipoclorito de sodio. Este compuesto tiene efectos positivos en la degradación de aflatoxinas en alimentos. En soluciones con diferentes concentraciones se encontró una degradación casi total cuando se utilizó para alimento contaminado con la AFB1. Sin embargo la presencia de cloro residual en alimentos tratados modifica las grasas y proteínas con toxicidad desconocidas debidas al tratamiento aplicado deben ser estudiadas más a fondo para evitar daño a la salud.

Ozono. Agente oxidante muy poderoso, por lo que tiene un potencial elevado para la degradación de aflatoxinas mediante el ataque al doble enlace 8 y 9 del anillo furano.

Otras sustancias. Otros compuestos químicos han sido probados para evaluar su habilidad en la destrucción de aflatoxinas. De ellos se han preparado diferentes concentraciones de metanol, aldehídos, peróxido de benzoílo, permanganato de potasio, los cuales son notablemente eficientes, sin embargo su aplicación en alimentos es restringida por problemas de salud que pueden causar los residuos químicos.

1.6.2.3 Tratamiento biológico.

La descontaminación biológica mediante la utilización de microorganismos es otra de las estrategias utilizadas. Algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizan ampliamente en la fermentación de los alimentos, poseen estructura y pared celular con capacidad para adherir micotoxinas (Denli y Pérez, 2006).

1.7.0 Detección y cuantificación

La detección de las aflatoxinas se puede llevar a cabo por los siguientes métodos:

Cromatografía en capa fina (TLC). La identificación de las aflatoxinas se realiza mediante la detección del color, de la fluorescencia emitida bajo la luz UV, determinando el valor de resistencia al flujo (f) de cada mancha fluorescente y comparándolo contra una solución estándar de concentración conocida corrida en la misma placa de aflatoxinas. La cuantificación se puede realizar mediante la comparación de la intensidad de la fluorescencia de la muestra contra concentraciones conocidas de aflatoxinas, por medio de un densímetro de placa que lee el área y la densidad óptica de las manchas fluorescentes. El método de extracción de aflatoxinas es aceptado por la AOAC (1995).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Es similar al TLC en muchos aspectos, incluye una aplicación, una fase estacionaria y una fase móvil. Los métodos de cromatografía líquida determinan las aflatoxinas en los alimentos, incluyen una fase normal, una fase de reversa y una prederivatización antes de pasar por la columna. La fase de reversa es en donde se hace la detección electroquímica y por fluorescencia se detectan las aflatoxinas (Moreno, 2004).

Inmunoafindad con anticuerpos monoclonales. Este método consiste en el uso de anticuerpos inmovilizados para aislar AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y AFM1 de extractos de forrajes, alimentos, granos, leche y sus productos. Los anticuerpos están químicamente ligados a pequeñas esferas de vidrio y empacados en una columna, estas actúan selectivamente atrapando a las aflatoxinas y todos los demás componente se eluyen de la columna mediante lavados. Finalmente las aflatoxinas son removidas empleando un solvente y

una vez separadas, la medición se hace directamente en un fluorómetro, o por HPLC o también por TLC (Vicam, 1999).

Electroforesis Capilar. Es una técnica basada en la migración de las moléculas polares en el interior de un capilar en cuyo interior fluye disolución tampón, cuando se les aplica una corriente eléctrica. La migración de un determinado ion depende de la relación carga/tamaño. A su vez el tamaño depende del peso molecular, de la estructura tridimensional y del grado de solvatación (Soriano, 2007).

1.8.0 Normatividad

En base a los riesgos que las micotoxinas tiene sobre la salud humana, diferentes organismo internacionales como la OMS, The Food and Drug Administration (FDA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han establecido los límites maximos permitidos de micotoxinas en los piensos y los alimentos.

El establecimiento de niveles de tolerancia aceptables internacionalmente es importante y facilita el comercio y la adopción de medidas comunes entre países. Los primeros límites establecidos fueron en los años 60 para las aflatoxinas. A finales del 2003, aproximadamente 100 países habían establecido límites específicos de micotoxinas en los alimentos. Los parámetros que son considerados en la adopción de estos niveles son las fuentes y propiedades toxicológicas de las micotoxinas, los efectos en la salud humana, la salud animal y su productividad. Otros factores a tomar en cuenta son la información recogida sobre datos toxicológicos consumo de alimentos, incidencia y concentración de micotoxinas en los ingredientes y las metodologías analíticas mas utilizadas, así como las implicaciones económicas más importantes para un comercio internacional seguro de cereales. Europa, cuenta también con una de las regulaciones más extensas y detalladas para micotoxinas en los alimentos (Denli y Pérez, 2006)

El método por columnas de inmunoafinidad es el método de análisis establecido por el gobierno mexicano para usarse en el control de aflatoxinas en granos y cereales utilizados para el consumo humano y animal (Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA-1-2002). Este método establece la detección de contaminación de aflatoxinas utilizando columnas de inmunoafinidad y la

cuantificación, usando tanto los métodos fluorométricos como por HPLC. La contaminación no debe exceder de 20 µg/kg de aflatoxinas totales en granos y cereales para consumo humano. En granos y cereales para consumo animal se aceptan concentraciones de 21-300 µg/kg.

La OMS ha propuesto un nivel máximo aceptable de 5 µg/kg o ppb en cereales y subproductos. La presencia de 1 µg/kg de peso corporal/día de aflatoxina B1 o aún menos contribuye al riesgo de contraer cáncer hepático (Codex Alimentario). La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos estableció como límites máximos la concentración de 20 µg/kg para granos y otros forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras, 100 µg/kg para granos destinados a ganado y cerdos reproductores así como gallinas ponedoras, 200 µg/kg para granos empleados en el engorde de cerdos.

II. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por micotoxinas afecta de forma general a gran cantidad de alimentos y piensos. El maíz es uno de los cereales más consumidos en México y puede ser contaminado por *Aspergillus flavus* durante su formación en el campo, transporte y almacenamiento, por lo que es importante destacar el enorme riesgo que representa para la salud humana y animal, la presencia de este hongo en productos a base de maíz, ya que además de causar deterioro, es productor de aflatoxinas, que son metabolitos secundarios. Actualmente la industria alimentaria enfrenta una creciente exigencia, por parte del consumidor, de alimentos de calidad con mayor capacidad de conservación y sanidad, por lo que se hace cada vez más necesaria la eliminación de aditivos sintéticos y su sustitución por productos naturales con menor impacto contra el ambiente; tomando en cuenta lo anterior se ha tratado de buscar una alternativa de control para el crecimiento de *A. flavus* uno de los hongos productores de aflatoxinas y la producción de las mismas para evitar problemas de contaminación, que sean de bajo costo, que tenga fácil acceso y aplicación; esta alternativa es el uso de los extractos botánicos como son algunos aceites esenciales, siendo estos, una alternativa de importante alcance con potencial fungicida que cumplen con la mayoría de estos requisitos y que por su origen biológico son biodegradables y no provocan un impacto negativo en la salud humana o en el ambiente. Los aceites esenciales tienen capacidad para afectar una gran variedad de sistemas enzimáticos microbianos, incluyendo los relacionados con la energía celular y síntesis estructural. Sin embargo, se requiere de más investigación para eludir los mecanismos de acción e interacciones que pueden ocurrir tanto en el microorganismo, como en el alimento que se pretende conservar con aceites esenciales individuales o en mezclas, lo que conllevará a establecer su inocuidad como bioconservadores, estandarización, usos y la mejor forma de aplicación. Los aceites esenciales son la alternativa de conservadores naturales que promete competir con el amplio mercado de los agentes químicos y/o sintéticos que actualmente ofrecen. Los aceites esenciales tiene como gran ventaja que son obtenidos de vegetales que se han consumido históricamente como alimento de uso común y tienen demostrada su inocuidad en humanos.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

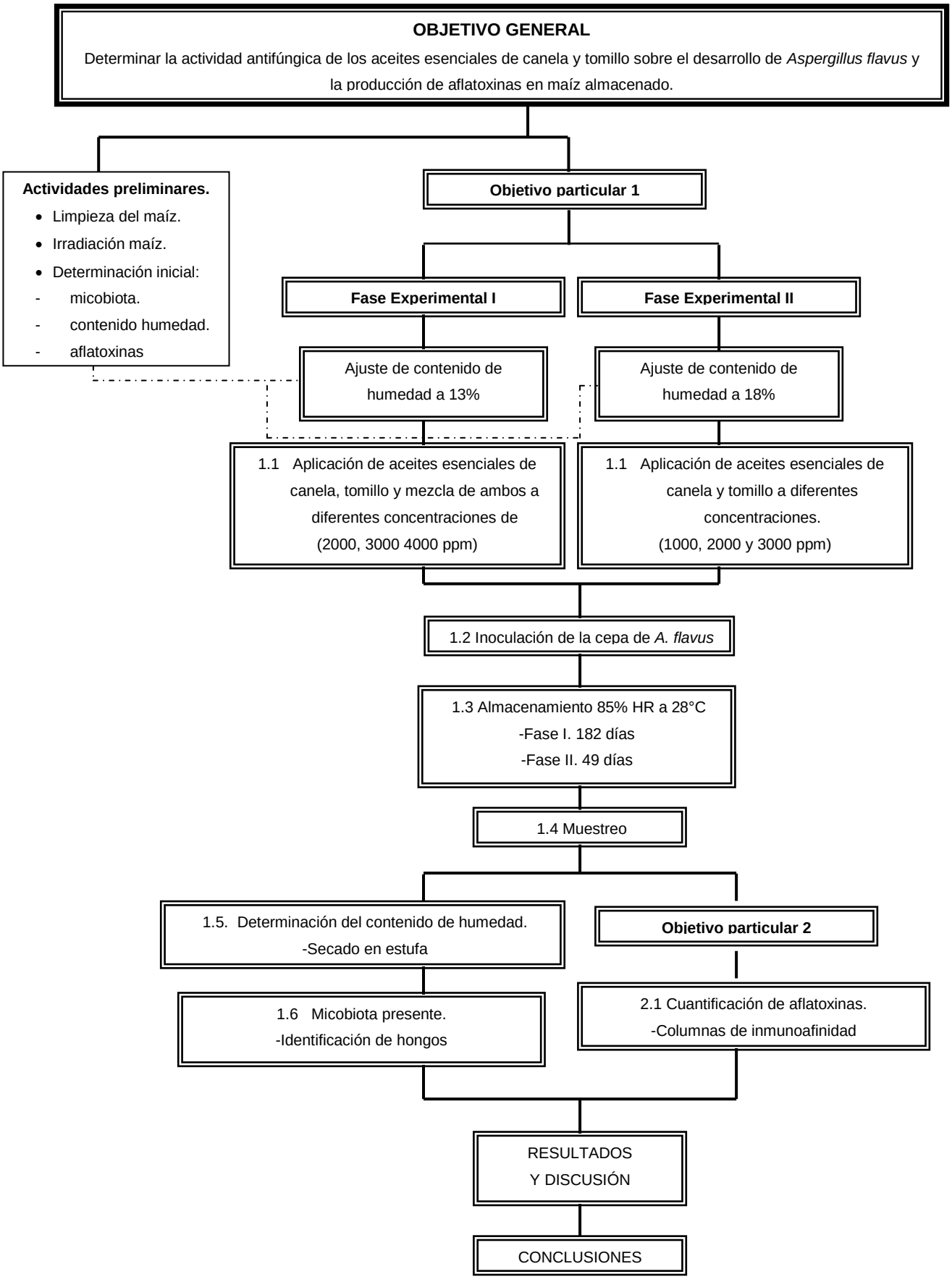
Determinar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de canela y tomillo sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en maíz almacenado.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de los aceites esenciales de canela y tomillo en diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus,* almacenado en diferentes contenidos de humedad.

2**.** Determinar el efecto de los aceites esenciales de canela y tomillo sobre la producción de aflatoxinas en maíz almacenado e inoculado con *Aspergillus flavus* almacenado en condiciones óptimas para la síntesis de dichas toxinas.

4.0 CUADRO METODOLÓGICO



IV. METODOLOGÍA

Procedencia del maíz

El maíz blanco utilizado (20 kg) en este trabajo fue proporcionado por la compañía ASPROS, de la variedad AS-910 procedente del bajio.

Procedencia de los aceites esenciales

Los aceite esenciales de canela de las hojas y tomillo blanco grado alimenticio fueron adquiridos en la compañía Aceites y Esencias S. A., México D.F.

4.1 Actividades preliminares

4.1.1 Limpieza del maíz

Se quitaron granos quebrados, hojas, piedras, basura, etc.

4.1.2 Irradiación del maíz

Se irradió el maíz con rayos gamma Co^{60} en una dosis de 10 kGy, para el primer experimento y para el segundo se irradió 15 kGy en el Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México en un irradiador Gamma Bean 651 PT.1 (Codex Alimentarius, 2003) y se guardó en refrigeración a 5°C hasta su uso posterior.

4.1.3 Determinación de la micobiota inicial

Se determinó la micobiota presente en maíz no irradiado e irradiado. En un área estéril se tomaron 100 granos de la muestra, se desinfectaron superficialmente agitándolos por 1 ó 2 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, se eliminó el agua por decantación y se eliminó el exceso de la solución con toallas de papel estéril. Se sembraron los 100 granos en las cajas de Petri en medio de Malta Sal Agar (MSA), se incubaron a 28°C, durante 7 días (Moreno, 1988).

Posteriormente se determinó el grado de inhibición utilizando la siguiente formula:

$$I = \frac{A \times 100}{B}$$

I= % Inhibición

A= Número de semillas invadidas con hongos

B= Número total de semillas.

4.1.4 Determinación del contenido de humedad inicial

Se determinó el contenido de humedad del maíz por secado en estufa por el método oficial para maíz y frijol del International Seed Testing Association (ISTA, 2005) del departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Se utilizaron cajas de aluminio limpias de 5 cm de diámetro y 3 cm de altura, previamente pesadas en una balanza analítica y se les añadieron semillas enteras hasta cubrir el fondo de la caja (10 g), se pesaron nuevamente las cajas con las semillas y se introdujeron en una estufa de convección mecánica LINDBERG/BLUE M con termómetro de precisión a una temperatura de 103°C por 72 h (Moreno, 1996).

4.2 Objetivo Particular I

Fase Experimental I

4.2.1 Ajuste del contenido de humedad

Se ajustó el contenido de humedad del maíz a 13% para el primer experimento y 18% para el segundo experimento utilizando el siguiente cálculo (Pixton, 1967):

$$CH = \frac{100 - CH_i}{100 - CH_f} - 1 \times kg \cdot de \cdot grano$$

Donde: CH_i = contenido de humedad inicial

CH_f = contenido de humedad final

4.2.2. Aplicación de los aceites esenciales al grano de maíz.

Una vez irradiado el maíz y ajustado al contenido de humedad a 13%, se tomaron 9 muestras de 2,500 kg a las cuales se les aplicaron los tratamientos de aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos (grado alimenticio) acondicionados con Tween 80 (10%) como agente emulsificante (Velluti *et al.*, 2004), aplicando concentraciones que se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Tratamientos de aceites esenciales aplicados al maíz,

Aceite esencial	Concentración (ppm)
Canela	2000, 3000, 4000
Tomillo	2000, 3000, 4000
Mezcla	2000, 3000, 4000
Testigo irradiado	0 , 0 , 0
Testigo s/irradiar	0 , 0 , 0

Posteriormente cada tratamiento y testigos se realizaron por triplicado repartiendolos en unidades experimentales de 100 gramos, para tener 24 unidades experimentales por cada tratamiento.

4.2.3. Inoculación

Los tratamientos al igual que el testigo irradiado se inocularon con un explante discoidal de 5 mm, tomado con un sacabocados de una colonia de *A. flavus* incubada durante 7 días a 28°C (Bluma y Etcheverry, 2007), la cepa utilizada se obtuvo de la micoteca de UNIGRAS.

4.2.4 Almacenamiento

Los diferentes tratamientos y los testigos se incubaron a 28°C, con humedad relativa de 85% en cámaras húmedas con una solución saturada de KCl; como agente regulador de la humedad relativa. Las muestras con los diferentes tratamientos se almacenaron durante 182 días.

4.2.5 Toma de muestras

Se tomaron tres unidades experimentales para cada muestreo; los tres primeros muestreos se realizaron cada 14 días, y los 5 posteriores cada 28 días a cada muestra se les determinó por triplicado: el contenido de humedad por el método de secado en estufa y micobiota presente siguiendo las metodologías anteriormente descritas en el punto 4.1.3 y 4.1.4 respectivamente.

4.3. Objetivo Particular II

4.3.1 Determinación de aflatoxinas

La determinación de la concentración de aflatoxinas totales de las muestras de maíz se realizaron por el método de Columnas de Inmunoafinidad (VICAM) utilizando el método 99.31 de inmunoensayo de la AOAC, (1995).

Fase Experimental II

4.3.1 Aplicación de tratamientos.

Una vez irradiado el maíz con rayos gamma Co^{60} en una dosis de 15 kGy y ajustando el contenido de humedad a 18% se tomaron 8 muestras de 2,0 kg, y se les aplicaron los tratamientos de aceites esenciales (grado alimenticio) de canela y tomillo preparados con Tween 80 (10%) como agente emulsificante (Velluti *et al*, 2004), con las siguientes concentraciones para cada uno de los experimentos y dos testigos irradiados sin tratamiento, uno inoculado y otro sin inocular (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tratamientos de aceites esenciales aplicados al maíz.

Aceite esencial	Concentración (ppm)
Canela	1000, 2000, 3000, 4000
Tomillo	1000, 2000, 3000, 4000
Testigo irradiado	0 , 0 , 0 , 0

Posteriormente cada tratamiento y el testigo se repartieron en unidades experimentales de 100 gramos, obteniendo 18 unidades experimentales.

Para este experimento se siguió la misma metodología que en el experimento I del punto 4.2.3 al 4.2.5 y la determinación de aflatoxinas se realizo como en el punto 4.3.1. Sin embargo, el primer muestreo se realizó a los 14 días, y los posteriores cada 7 días durante un periodo de 49 días de almacenamiento, ya que se observó mayor proliferación de hongos

4.4 Análisis Estadístico.

Los resultados se analizaron bajo un diseño factorial completamente al azar. Las medias obtenidas se sometieron a una comparación estadística de Tukey ($p<0.01$) en el paquete SAS, versión 9 (2002).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXPERIMENTO I

5.1.0 Contenido de humedad del maíz

En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos del maíz almacenado con un contenido de humedad inicial del maíz del 13% almacenado durante de 182 días, en una humedad relativa de 85%, temperatura de 28°C inoculado con una cepa de *Aspergillus flavus*; en el análisis de varianza se puede observar que existen diferencias altamente significativas entre tratamientos.

En el primer muestreo a los 14 días de almacenamiento no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de canela, tomillo, mezcla de ambos y testigos. Presentando el menor contenido de humedad el tratamiento de la mezcla de aceites de 2000 ppm el cual fue de 13% y los mayores en el tratamiento del aceite esencial de tomillo alcanzando un contenido de humedad de 13.62% para la concentración de 3000, 13.53% para la de 2000 y 13.49% en la de 4000 ppm. Para el aceite esencial de tomillo 3000 ppm, estos contenidos de humedad son propicios para el crecimiento de especies de el género *Eurotium* comúnmente conocidos por su estado anamorfo como especies del grupo *Aspergillus glaucus*, los cuales son hongos de almacén xerófilos, capaces de crecer en contenidos de humedad de 13.5 - 14%. De acuerdo con la FAO el maíz con un contenido de humedad de 13.5% se considera seguro para el almacenamiento. Sin embargo, en este trabajo nosotros encontramos la presencia de hongos del genero *Eurotium* en un contenido de humedad menor a 13.5%.

A los 28 días se observó un ligero aumento en el contenido de humedad siendo el mínimo para el aceite esencial de tomillo en una concentración de 3000 ppm (13.38%) y el máximo para el testigo irradiado e inoculado con 14.28%, observando diferencias entre los tratamientos.

Cuadro 8. Contenido de humedad en maíz almacenado durante 182 días en humedad relativa de 85% y 28 °C.

Tratamiento (ppm)	Contenido de humedad (%)								
	Periodo de almacenamiento (Días)								
	0	14	28	42	70	98	126	154	182
Canela									
2000	13.20 ^{a}	13.37 ^{a}	13.73 ^{bc}	14.83 ^{abcd}	15.51 ^{ab}	16.32 ^{b}	15.88 ^{ab}	15.90 ^{ab}	16.14 ^{a}
3000	13.35 ^{a}	13.45 ^{a}	13.81 ^{bc}	14.80 ^{bcd}	15.38 ^{ab}	16.16 ^{b}	16.12 ^{ab}	16.02 ^{ab}	16.14 ^{a}
4000	13.02 ^{a}	13.12 ^{a}	13.91 ^{bc}	14.83 ^{abcd}	15.55 ^{ab}	16.19 ^{b}	15.97 ^{ab}	15.89 ^{ab}	16.70 ^{a}
Tomillo									
2a000	13.43 ^{a}	13.53 ^{a}	13.94 ^{e}	14.82 ^{abcd}	15.27 ^{ab}	16.16 ^{b}	16.02 ^{ab}	15.76 ^{ab}	16.05 ^{a}
3000	13.22 ^{a}	13.62 ^{a}	13.38 ^{c}	14.19 ^{d}	14.78 ^{b}	16.13 ^{b}	15.80 ^{ab}	15.30 ^{b}	15.97 ^{a}
4000	13.34 ^{a}	13.49 ^{a}	13.94 ^{bc}	14.75 ^{bcd}	15.63 ^{ab}	16.35 ^{b}	15.99 ^{ab}	15.99 ^{ab}	16.25 ^{a}
Mezcla									
2000	13.50 ^{a}	13.00 ^{a}	14.24 ^{bc}	14.86 ^{adb}	15.49 ^{ab}	16.11 ^{b}	15.71 ^{ab}	15.93 ^{ab}	16.19 ^{a}
3000	13.08 ^{a}	13.17 ^{a}	13.89 ^{bc}	14.55 ^{bcd}	15.09 ^{ab}	16.11 ^{b}	15.83 ^{ab}	15.70 ^{ab}	16.08 ^{a}
4000	13.31 ^{a}	13.11 ^{a}	14.03 ^{ab}	14.17 ^{d}	15.50 ^{ab}	16.08 ^{b}	14.02 ^{b}	16.26 ^{ab}	16.13 ^{a}
Testigo									
T^{1} 0	13.22 ^{a}	13.42 ^{a}	14.28 ^{ab}	15.01 ^{ab}	15.70 ^{a}	16.94 ^{a}	16.35 ^{a}	16.00 ^{ab}	16.50 ^{a}
T^{2} 0	13.11 ^{a}	13.15 ^{a}	14.60 ^{a}	15.48 ^{a}	15.66 ^{ab}	16.46 ^{ab}	16.15 ^{ab}	16.47^{a}	16.29 ^{a}

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

T^{1}= Testigo irradiado e inoculado con *A. flavus*; T^{2}= testigo no irradiado y no inoculado

En el muestreo realizado a los 42 días de almacenamiento el contenido de humedad se mantuvo por arriba de 14% para todos los tratamientos y observando que en los testigos irradiado e inoculado y no irradiado se alcanzaron los mayores contenidos de humedad 15.01% y 15.48% respectivamente.

A los 70 días de almacenamiento el maíz se mantuvo por arriba de 15% de contenido de humedad con excepción del tratamiento de tomillo 3000 ppm en donde obtuvo 14.78%, observando una diferencia significativa con el testigo irradiado inoculado el cual presentó un contenido de humedad de 15.70%.

En el maíz almacenado durante 98 días se alcanzó un contenido de humedad por arriba del 16%. El tratamiento de la mezcla de aceites esenciales de canela y tomillo en 4000 ppm presentó el menor contenido de humedad con 16.08% y el mayor contenido de humedad se determinó en el tratamiento de tomillo 4000 ppm con 16.35%.

A partir de los 126 días el contenido de humedad disminuyó en la mayoría de los tratamientos a excepción del tomillo 2000 ppm y los testigos que se mantuvieron por arriba del 16%. En la mezcla 4000 ppm se obtuvo el mínimo contenido de humedad de 14.02%.

En el muestreo a los 154 días la humedad mínina fue de 15.30% en el tratamiento de tomillo 3000 ppm y la máxima se determinó en la mezcla 4000 ppm con 16.26% de contenido de humedad en el maíz.

En el último muestreo realizado a los 182 días se alcanzó el más alto contenido de humedad durante todo el almacenamiento que fue de 16.7% en canela 4000 ppm y el mínimo contenido de humedad de este muestreo fue de 15.97% en tomillo 3000 ppm. El contenido de humedad favorable para el crecimiento de *A. flavus* es de 16-18% (Moreno, 1988).

Se ha encontrado que en cualquier volumen de grano almacenado que no es artificialmente aereado el movimiento lento del aire, establecido por diferencia de temperatura entre diferentes porciones del grano, resulta una transferencia de humedad observando diferencia en el contenido de humedad del grano individuales de maíz de un lote supuestamente uniforme, pudiendo diferir en un rango de 0.5 hasta 2%. Lo cual explica por que algunos granos son invadidos

severa y rápidamente por los hongos de almacén, mientras que otros no son invadidos o lo son en forma menos severa (Christensen y Kaufmann, 1965).

Las fluctuaciones en el contenido de humedades obtenidas a lo largo de este experimento se debió a que el contenido de humedad inicial del grano fue de 13.02 hasta 13.5%, que al der almacenado en una humedad relativa de 85% el grano de maíz tiende a alcanzar el equilibrio con la humedad relativa presente, hasta llegar a un contenido de humedad de 16 a 18% (Moreno, 1988). Especialmente en los últimos tres muestreos probablemente las fluctuaciones (14.02 hasta 16.7%) se debieron a que se estuvieron abriendo las cámaras de humedad para tomar las unidades experimentales, presentándose una pérdida de la humedad relativa en equilibrio, provocando que a los 126 y 154 días de almacenamiento se presentara una disminución en el contenido de humedad del maíz. Los resultados encontrados en este trabajo a lo largo de todo el periodo de almacenamiento (182 días) son similares a los reportado por Sánchez, 2005, en maíz almacenado por 84 días en humedad relativa de a 85% a 25 °C, en donde observó las fluctuaciones en el contenido de humedad del maíz obteniendo contenidos de humedad iniciales de 12.7% hasta 17.4% al final del periodo de almacenamiento.

En un trabajo realizado por Velluti *et al* (2004), la variación de la temperatura presentó poco efecto sobre la actividad de los aceites esenciales probados entre estos la canela. Así mismo la actividad de agua tampoco mostró ningún efecto sobre la efectividad de los aceites, observando un ligero incremento en el efecto de los aceites en la actividad de agua más baja probada por ellos (0.95).

5.1.1 Efecto de los aceites esenciales de tomillo y canela sobre la micobiota presente.

Los aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos en todas las concentraciones inhibieron el crecimiento de los hongos por un periodo de 70 días (Cuadro 9). Sin embargo, en el testigo sin irradiar y sin inocular *A. flavus* se observó la presencia de colonias de hongos correspondientes a la especie

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg a los 14 y 28 días de almacenamiento con 42 y 39 aislamientos respectivamente.

A los 42 días de almacenamiento, en el testigo no irradiado y no inoculado, además de la presencia de *F. verticillioides* (9 aislamientos) se aisló la especie *Eurotium herbarorium* y el género *Penicillium sp.* (29 y 7 aislamientos respectivamente en el testigo no irradiado y no inoculado).

Cuadro 9. Micobiota presente en maíz tratado con aceites esenciales de canela, tomillo y una mezcla de ambos almacenados a 85% de humedad relativa, 13% de contenido de humedad a 28° C y un periodo 182 días.

TRATAMIENTO (ppm)	Periodo de almacenamiento (Días)					
	0					
	No. De Colonias					Grado de Inhibición (%)
	A	B	C	D	E	
CANELA						
2000	0b	0a	0a	0a	0a	100
3000	0b	0a	0a	0a	0a	100
4000	0b	0a	0a	0a	0a	100
TOMILLO						
2000	0b	0a	0a	0a	0a	100
3000	0b	0a	0a	0a	0a	100
4000	0b	0a	0a	0a	0a	100
MEZCLA						
2000	0b	0a	0a	0a	0a	100
3000	0b	0a	0a	0a	0a	100
4000	0b	0a	0a	0a	0a	100
TESTIGO						
T^1 0	0b	0a	0a	0a	0a	
T^2 0	22a	0a	0a	0a	0a	

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

T^1=Testigo irradiado inoculado con *A.flavus;* T^2= Testigo no irradiado no Inoculado

A) *F. verticillioides,* B) *E. herbarorium,* C) *E. rubrum,* D) *Penicillum sp,* E) *A.flavus*

CONTINUACIÓN Cuadro 9. Micobiota presente en maíz tratado con aceites esenciales de canela, tomillo y una mezcla de ambos almacenados a 85% de humedad relativa, 13% de contenido de humedad a 28° C y un periodo 182 días.

TRATAMIENTO (ppm)	Periodo de almacenamiento (Días)																	
	14						28						42					
	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)
	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E		A	B	C	D	E	
CANELA																		
2000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
3000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
4000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
TOMILLO																		
2000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
3000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
4000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
MEZCLA																		
2000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
3000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
4000	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0a	0a	0a	0a	100	0b	0b	0a	0b	0a	100
TESTIGO																		
T^1 0	0b	0a	0a	0a	0a		0b	0a	0a	0a	0a		0b	0b	0a	0b	0a	
T^2 0	42a	0a	0a	0a	0a		39a	0a	0a	0a	0a		9a	29a	0a	7a	0a	

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

T^1=Testigo irradiado inoculado con *A.flavus;* T^2= Testigo no irradiado no Inoculado

A) *F. verticillioides,* B) *E. herbarorium,* C) *E. rubrum,* D) *Penicillum sp,* E) *A.flavus*

CONTINUACIÓN CUADRO 9. Micobiota presente en maíz tratado con aceites esenciales de canela, tomillo y una mezcla de ambos almacenados a 85% de humedad relativa, 13% de contenido de humedad a 28° C y un periodo 182 días.

TRATAMIENTO (ppm)	Periodo de almacenamiento (Días)																	
	70						98						126					
	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)
	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E		A	B	C	D	E	
CANELA																		
2000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	0c	0b	0b	0b	100	0a	0c	2b	0a	0b	100
3000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	0c	0b	0b	0b	100	0a	1c	0c	0a	0b	99
4000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	1c	0b	0b	0b	99	0a	1c	0c	0a	0b	99
TOMILLO																		
2000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	0c	0b	0b	0b	100	0a	1c	1c	0a	0b	98
3000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	1c	0b	0b	0b	99	0a	0c	0c	0a	0b	100
4000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	0c	0b	0b	0b	100	0a	0c	0c	0a	0b	100
MEZCLA																		
2000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	1c	0b	1b	0b	98	0a	2c	0c	0a	0b	98
3000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	1c	0b	0b	0b	99	0a	1c	0c	0a	0b	99
4000	0b	0c	0c	0b	0b	100	0a	0c	0b	0b	0b	100	0a	1c	0c	0a	0b	99
TESTIGO																		
T^1 0	0b	31a	36a	0b	19b		0a	67b	14a	21a	28a		0a	49b	1b	0a	25a	
T^2 0	27a	12b	52b	2a	0a		0a	95a	8a	0b	0b		0a	76a	22a	0a	0b	

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

T^1=Testigo irradiado inoculado con *A.flavus;* T^2= Testigo no irradiado no Inoculado

A) *F. verticillioides,* B) *E. herbarorium,* C) *E. rubrum,* D) *Penicillum sp,* E) *A.flavus*

CONTINUACIÓN CUADRO 9. Micobiota presente en maíz tratado con aceites esenciales de canela, tomillo y una mezcla de ambos almacenados a 85% de humedad relativa, 13% de contenido de humedad a 28° C y un periodo 182 días.

TRATAMIENTO (ppm)	Periodo de almacenamiento (Días)											
	154						182					
	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)	No. De Colonias					Grado de Inhibición(%)
	A	B	C	D	E		A	B	B	A	E	
CANELA												
2000	0a	9dc	0c	0a	0b	91	0a	10b	7ab	0a	0b	83
3000	0a	32b	7b	0a	0b	51	0a	9b	7ab	0a	0b	84
4000	0a	11dc	0c	0a	0b	89	0a	8b	8ab	0a	0b	84
TOMILLO												
2000	0a	18e	2c	0a	0b	80	0a	9b	8ab	0a	0b	83
3000	0a	0e	0c	0a	0b	100	0a	0b	0b	0a	0b	100
4000	0a	0e	0c	0a	0b	100	0a	0b	0b	0a	0b	100
MEZCLA												
2000	0a	1e	0c	0a	0b	99	0a	6b	0b	0a	0b	94
3000	0a	0e	0c	0a	0b	100	0a	2b	0b	0a	0b	98
4000	0a	3edc	0c	0a	0b	97	0a	0b	0b	0a	0b	100
TESTIGO												
T^1 0	0a	41a	18ab	0a	30a		0a	29b	23b	0a	34a	
T^2 0	0a	74b	20a	0a	0b		0a	86a	9ab	0a	8ab	

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

T^1=Testigo irradiado inoculado con *A.flavus;* T^2= Testigo no irradiado no Inoculado

A) *F. verticillioides,* B) *E. herbarorium,* C) *E. rubrum,* D) *Penicillum sp,* E) *A.flavus*

En el muestreo a los 70 días de almacenamiento el testigo sin irradiar e inocular se identificaron 27 colonias de *F. verticillioides,* 12 colonias de *E. herbarorium*, 52 de *E. rubrum* y 2 de *Penicillium sp.* Así mismo en este mismo muestreo en el testigo irradiado se aislaron e identificaron 31 colonias de la especie *E. herbarorium*, 36 de *E. rubrum* y 19 de *Aspergillus flavus.* A partir de este periodo de almacenamiento se hace evidente la presencia de *A. flavus* (especie inoculada) debido a un incremento en el contenido de humedad (15.70) del grano.

A los 98 días de almacenamiento no se observó la presencia de la especie *Fusarium verticilliodes* en ambos testigos debido a que es un hongo de campo, el cual requiere contenidos de humedad y humedades relativas superiores para su desarrollo, a los que prevalecieron en éstas condiciones de almacenamiento; favoreciendo el desarrollo de los hongos de almacén.

En el testigo irradiado e inoculado se aislaron los hongos *E. herbarorium*, *E. rubrum y Penicillium sp.* (67, 14 y 21 colonias respectivamente) además se observó una mayor incidencia de *A. flavus* con 28 aislamientos. En el testigo no irradiado y sin inocular con *A. flavus* el hongo que predominó fue *E. herbarorium* con 95 aislamientos y 8 de *E. rubrum*. En los tratamientos el desarrollo de hongos de almacén en comparación con los testigos se observó una inhibición del 99 al 100%; aislando una colonia de *E. herbarorium* en los tratamientos de aceites esenciales de canela 4000 ppm, tomillo 3000 ppm y la mezcla de ambos aceites en 2000 y 3000 ppm, así como una colonia de *A. flavus* en la mezcla de aceites en la concentración de 2000 ppm.

En el muestreo realizado a los 126 días el número de colonias de hongos de almacén fue bajo para el maíz tratado aislando una colonia de *E. herbarorium*, en los tratamientos de canela 3000 y 4000 ppm, tomillo 2000 ppm, mezclas de aceites 3000 y 4000 ppm y 2 colonias en la mezcla de aceites 2000 ppm. Se aislaron 2 colonias de *E. rubrum* en el tratamiento canela 2000 ppm y una colonia en tomillo 2000 ppm. En comparación con el testigo irradiado e inoculado en donde se aislaron 49 colonias de *E. herbarorium*, 1 de *E. rubrum* y 25 de *A. flavus*; para el testigo sin irradiar y no inoculado se aislaron 76 colonias de *E. herbarorium* y 22 de *E. rubrum*.

A los 154 días de almacenamiento se observó un mayor número de colonias de la especie *E. herbarorium*, en el tratamiento con aceite esencial de canela en las tres concentraciones 2000, 3000 y 4000 ppm, teniendo 9, 32 y 11 aislamientos respectivamente. En el tratamiento con aceite de tomillo las dosis que presentaron una mayor actividad antifúngica e inhibieron el desarrollo de *E. herbarorium*, fueron las concentraciones de 3000 y 4000 ppm en comparación con la de 2000 ppm en donde se aislaron 18 colonias de esta especie. En el tratamiento con la mezcla de ambos aceites se observó una inhibición en el desarrollo de este hongo ya que solo se aisló una colonia en el tratamiento de 2000 ppm y 3 en el de 4000 ppm. La especie *E. rubrum* se presentó en el tratamiento de canela 3000 ppm y tomillo 2000 ppm con 7 y 2 aislamientos respectivamente. En el testigo tanto irradiado e inoculado y en el no irradiado y no inoculado se sigue observando una alta presencia de *E. herbarorium* 41 y 74 aislamientos respectivamente y de *E. rubrum* 18 y 20 colonias en comparación con los tratamientos los cuales presentaron un menor número de aislamientos de hongos. También se observó la presencia de 30 colonias de *A. flavus* en el testigo irradiado e inoculado. En el periodo de 182 días el aceite esencial de tomillo en concentraciones de 3000 y 4000 ppm inhibió el desarrollo de *E. herbarorium*, *E. rubrum* y *A. flavus* (esta última fue la especie inoculada) en comparación con el tomillo 2000 ppm en donde se aislaron 9 colonias de *E. herbarorium*, 8 de *E. rubrum* y ninguna de *A. flavus*. En el tratamiento con la mezcla de ambos aceites esenciales también se observó un buen efecto inhibitorio del desarrollo de las tres especies anteriormente mencionadas, presentándose solo *E. herbarorium* con 6 y 2 colonias en las concentraciones de 2000 y 3000 ppm respectivamente. El tratamiento con aceite de canela en todas las concentraciones de 2000, 3000 y 4000 ppm fue el que presentó menor actividad fúngica sobre el desarrollo de *E. herbarorium*, y *E. rubrum* sin embargo inhibió el desarrollo de *A. flavus* por que se estableció competencia entre estas especies. En el testigo irradiado e inoculado y el testigo sin irradiar e inocular la presencia de *E. herbarorium* (29 y 86 respectivamente), *E. rubrum* (23 y 9 aislamientos) y *A. flavus* (34 y 8 colonias para cada tratamiento

respectivamente) fue alta en comparación con el maíz tratado con los aceites esenciales (Cuadro 9).

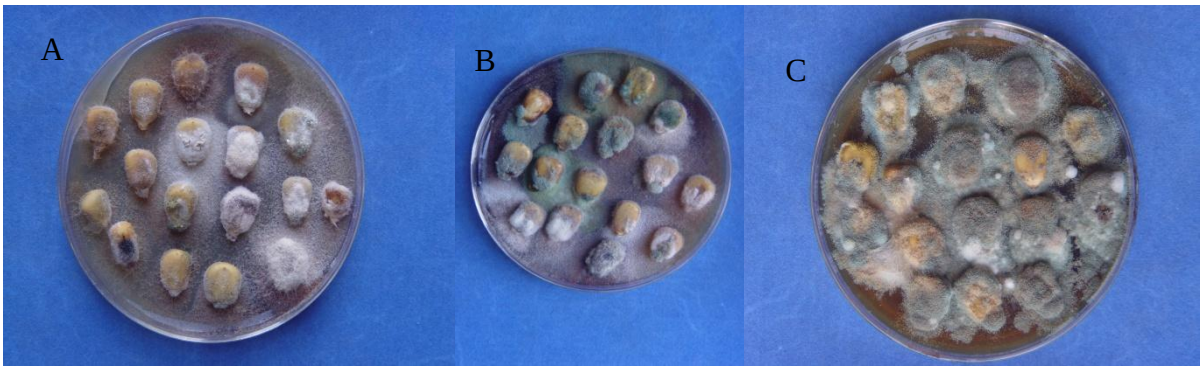


Figura 12. A) Micobiota presente en los testigos a los 14 días. B) Micobiota presente en los testigos a los 98 días. C) Micobiota presente en los testigos a los 182 días. Almacenados a 85% de humedad relativa y 28° C.

En el calentamiento se produce una conocida sucesión de hongos. Cada organismo eleva la temperatura al nivel más alto que puede resistir y al hacerlo producen agua como consecuencia de su metabolismo, con lo que se eleva el valor de la actividad de agua (a_w), hasta el punto que pueden crecer hongos menos xerófilos. Las especies xerófilas de *Eurotium* puede subir la temperatura a 35-40°C y proporcionar suficiente humedad para que puedan crecer *Aspergillus candidus* y *A. flavus.* Estos hongos a su vez pueden elevar la temperatura a 50°C y mantenerla a este nivel durante meses; si el calor y el agua se disipan la acción microbiana cesa.

Matan *et al*, (2005) encontraron que el aceite esencial de canela en 1000 ppm inhibió el crecimiento de *A. flavus* durante 17 días y de *Eurotium sp.* por 20 días, a 3000 ppm, el aceite de canela también inhibió el crecimiento de *A. flavus* por 19 días y a 4000 ppm inhibió completamente el crecimiento de todos los hongos y levaduras probados por más de 40 días. Sin embargo en este trabajo los resultados obtenidos demuestran que los aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos presentan actividad fungicida hasta por 70 días de almacenamiento y a los 98 y 126 días de almacenamiento el número de aislamiento fue muy bajo en comparación con los testigos presentando una

actividad fungistática, con excepción de los tratamiento con aceite de tomillo en concentraciones de 3000 y 4000 ppm en donde se observó una inhibición total de los hongos. En los periodos de 154 y 182 días aunque hubo un incremento en el número de granos de maíz invadidos por hongos, la invasión fue relativamente baja en comparación con los testigos (Cuadro 9), durante este periodo de almacenamiento los aceites esenciales de tomillo 3000 y 4000 ppm continuaron presentando una actividad fungicida del 100%. En un trabajo realizado por Soliman y Badeaa, (2002) demostraron que el aceite de tomillo presentó el mayor efecto tóxico contra el desarrollo *in vitro* de las especies *A. flavus, A. parasiticus, A. ochraceus* y *Fusarium moniliforme*.

En el campo y almacén los hongos compiten con otras especies (Magan y Lacey, 1984). En esta primera etapa experimental *Aspergillus flavus* no se estableció durante los tres primeros periodos de almacenamiento debido a que el contenido de humedad del grano estaba entre 13 y 15.4% (Cuadro 8), favoreciendo el desarrollo de *E. rubrum* y *E. herbarorium* (Cuadro 9).

A partir de los 70 días de almacenamiento hasta los 182, se observó un incremento en el contenido de humedad del grano entre 15 y 16.7%, requeridos para el desarrollo de *A. flavus*. Estos resultados tambien fueron observado por Sánchez (2005), encontrando que las especies de *A. flavus, A restrictus Smith y A. ochraceus* son malos competidores, pues no lograron establecerse a lo largo del almacenamiento de grano de maíz inoculado con una mezcla de especies de *A.restrictus, A. amstelodami, A. chevalieri, A. repens, A ruber, A. ochraceus y A. flavus* con contenidos de humedad de 17 y 18% en diferentes humedades relativas de 75, 80 y 85% a 25°C.

La dosis aplicada de rayos gamma Co^{60} de 10 kGy (Vázquez *et al*, 2001), no fue suficiente para eliminar en su totalidad la micobiota inicial presente en el grano de maíz permitiendo el desarrollo de otras especies principalmente del género *Eurotium* además de la cepa de *Aspergillus flavus* inoculada. Sin embargo, a los 70 días de almacenamiento en el testigo irradiado e inoculado se determinó la presencia *A. flavus* y en el testigo no irradiado e inoculado se aisló *A. flavus* hasta el final del periodo de almacenamiento (182 días) y en los tratamientos se inhibió

el crecimiento de esta especie, casi a lo largo de todo el periodo de almacenamiento. Estos resultados difieren con los obtenidos en la metodología seguida por Velluti *et al.,* 2003 quienes irradiaron con rayos gamma con una mayor dosis (12 kGy) eliminando la micobiota presente en el grano de maíz.

5.1.2 Determinación de aflatoxinas

En el Cuadro 10 se muestran los niveles de aflatoxinas determinados en los diferentes tratamientos con los aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos a lo largo de un periodo de almacenamiento de 182 días, en el cual se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo no irradiado y no inoculado en donde no hubo producción de aflatoxinas o fue mínima. En comparación con el testigo irradiado e inoculado con *A. flavus*.

En el primer muestreo a los 14 días de almacenamiento la producción de aflatoxinas en los tratamiento de canela 2000 y 3000 ppm fueron de 0.5 y 3 μg/kg respectivamente, no presentando producción de aflatoxinas en los demás tratamientos de canela 4000 ppm, tomillo y la mezcla de ambos. En el segundo muestreo a los 28 días de almacenamiento en el tratamiento de canela en todas las concentraciones se determinaron de 0.5 a 1 μg/kg; presentando la mayor producción de aflatoxinas en este periodo en la mezcla de ambos aceites en la concentración de 2000 ppm con 1.5 μg/kg. A los 42 días de almacenamiento solo en el tratamiento de canela 2000 ppm se determinaron 0.5 μg/kg. En el siguiente periodo a los 70 días los niveles de aflatoxinas se determinaron en el testigo no irradiado y no inoculado con 0.3 μg/kg, en tomillo 2000 y 3000 ppm con 1.5 y 0.5 μg/kg respectivamente, en canela 2000 ppm con 1 μg/kg y presentado la mayor producción en este periodo con 11.7 μg/kg el testigo irradiado e inoculado. En el siguiente muestreo a los 98 días de almacenamiento solo hubo presencia en el testigo irradiado con 480 μg/kg, siendo este el nivel más alto de aflatoxinas determinado en todo el periodo de almacenamiento. A las 126 días la presencia de aflatoxinas se determinó en canela 2000 con 0.8 μg/kg y en el testigo inoculado con 420 μg/kg, al igual que en el siguiente periodo a los 154 días en el mismo testigo con 465 μg/kg y en el último muestreo a los 182 días la presencia de

Cuantificación de aflatoxinas

Cuadro 10. Efecto de los aceites esenciales de canela, tomillo y mezcla de ambos sobre la producción de aflatoxinas.

Tratamiento (ppm)	Nivel de Aflatoxinas (μg/kg) Período de Almacenamiento (Días) 0	14	28	42	70	98	126	154	182
Canela									
2000	0 b	0.5 b	0.5 a	0.5 a	1 b	0 b	0.8 b	0 b	0.5 b
3000	0 b	3 a	1 a	0 b	0 b	0 b	0 c	0 b	1.5 b
4000	0 b	0 b	0.5 a	0 b	0 b	0 b	0 c	0 b	0 b
Tomillo									
2000	0 b	0 b	0 a	0 b	1.5 b	0 b	0 c	0 b	1 b
3000	0 b	0 b	0 a	0 b	0.5 b	0 b	0 c	0 b	0 b
4000	0 b	0 b	0 a	0 b	0 b	0 b	0 c	0 b	0.5 b
Mezcla									
2000	0 b	0 b	1.5 a	0 b	0 b	0 b	0 c	0 b	0.5 b
3000	0 b	0 b	0 a	0 b	0 b	0 b	0 c	0 b	0.5 b
4000	0 b	0 b	0 a	0 b	0 b	0 b	0 c	0 a	0 b
Testigo									
T^1 0	0 b	0 b	0 a	0 b	11.7 a	480 a	420 a	465 a	440 a
T^2 0	0.3a	0 b	0 a	0 b	0.3 b	0 b	0 c	0 b	0.5 b

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

T^1=Testigo irradiado inoculado con *A.flavus;* T^2= Testigo no irradiado no Inoculado

aflatoxinas en el testigo inoculado fue de 440 μg/kg, teniendo también presencia en el testigo no irradiado y no inoculado (0.5 μg/kg) y los tratamiento de canela 2000 y 3000 ppm (0.5 y 1.5μg/kg), tomillo 2000 y 4000 ppm (1 y 0.5 μg/kg), mezcla 2000 y 3000 ppm con 0.5 μg/kg cada uno. La presencia de aflatoxinas determinadas en todos los tratamientos y testigo no irradiado y sin inocular se encuentran por debajo del límite permitido para consumo humano según la NOM-188-SSA1-2002 que es de 20 μg/kg y para animales de 21-300 μg/kg. En comparación con el testigo irradiado e inoculado en donde se determinó una producción de aflatoxinas de 11.7 μg/kg a partir de los 70 días de almacenamiento, y la presencia significativa de éstas fue de 480 μg/kg y se determinó a partir de 98 días y se mantuvo elevada hasta los 182 días. De acuerdo con los resultados obtenidos encontramos que los tratamientos de aceites esenciales de canela, tomillo, y la mezcla de ambos en todas las concentraciones aplicadas al maíz inhibieron la producción de aflatoxinas en comparación con el testigo inoculado, demostrando que pueden ser utilizados para inhibir el desarrollo de *A. flavus*, y por tanto la producción de aflatoxinas. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Soliman y Badea (2002) en donde los aceites esenciales de canela y tomillo en concentraciones de 1000, 2000 y 3000 ppm *in vitro* inhibieron el desarrollo de las especies de *A. flavus, A. parasiticus, A. ochraceus* y *Fusarium moniliforme*. Los ingredientes activos que han sido identificados en el aceites de canela son el aldehído cinamico, O-metoxicinamaldehído y carfone (Bullerman, 1979, Morozumi, 1978, Dwividi y Dubey, 1993). Así mismo, muchos estudios han demostrado que el aceite de canela tiene actividad fungicida y fungistática contra muchos hongos toxigénicos (Salmera y Pozo, 1991; Patkar *et al*., 1993; Ryu y Holt, 1993; Mukherjee Ryu y Nandy, 1994). En el tomillo se ha encontrado que el ingredientes activo con mayor actividad fungicida y fungistática es el timol (40%) (Soliman y Badea, 2002).

Rasooli y Owlia, (2005) encontraron que el aceite esencial de tomillo *in vitro* en 250 ppm inhibió el crecimiento de *A. flavus* presentando una acción fungicida y por lo tanto no hubo producción de aflatoxinas.

EXPERIMENTO II

5.2.0 Contenido de humedad del maíz

En el cuadro 11 se muestran los resultados del contenido de humedad del maíz durante el almacenamiento por un periodo de 49 días, con humedad relativa de 85% y temperatura de 27°C inoculado con una cepa de *Aspergillus flavus* en el cual se observa que existen mínimas diferencias significativas entre los muestreos.

En el primer muestreo a los 14 días de almacenamiento se tuvo un contenido de humedad del maíz de 17.13% en el testigo y máxima de 18.27% en el tratamiento de canela 4000 ppm, al igual que en el segundo muestreo a los 21 días se tuvo la humedad máxima en este tratamiento con 17.35% y un mínimo de 16% en el tratamiento con tomillo 4000 ppm, estos contenidos de humedad son favorables para el crecimiento de *A. flavus* quien es capaz de crecer en humedades con un contenido de humedad de 16-18%. Para el tercer muestreo a los 28 días de almacenamiento el máximo contenido de humedad se determinó en el tratamiento de tomillo 1000 ppm con 16.83% y el mínimo contenido de humedad con 15.54% en canela 2000 ppm en este mismo tratamiento se determinaron los mínimos contenidos de humedad en el almacenamiento a los 35 y 42 días con 15.58 y 16.08% respectivamente; el máximo contenido de humedad a los 35 y 42 días fue en el tratamiento de tomillo 3000 ppm con 16.85% para ambos periodos de almacenamiento. A los 49 días de almacenamiento el mínimo contenido de humedad 16.04% fue en el testigo y el máximo fue 17.61% en el tratamiento de canela 1000 ppm, siendo estas condiciones favorables para el desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas.

En este trabajo se observó que la humedad inicial ajustada no se mantuvo constante a lo largo del periodo de almacenamiento, observando una disminución y variación en el contenido de humedad debido a la absorción de agua y crecimiento de hongos en el grano, estos resultados también fueron encontrados por Moreno, (2004).

Cuadro 11. Contenido de humedad en maíz almacenado durante 49 días en humedad relativa de 85% y temperatura de 27°C

Tratamiento	Contenido de Humedad (%)						
	Periodo de Almacenamiento (Días)						
(ppm)	0	14	21	28	35	42	49
Canela							
1000	18.30 a	18.18 a	16.54[a]	15.70[a]	15.97[bc]	16.32[a]	17.61[ab]
2000	17.93 b	17.73 ab	16.95[a]	15.54[c]	15.58[bc]	16.08[a]	16.79[a]
3000	18.23[ab]	17.83[ab]	16.97[a]	16.51[a]	16.58[ab]	16.5[a]	16.43[b]
4000	18.57[a]	18.27[a]	17.35[a]	16.37[a]	16.48[a]b	16.17[a]	16.35[b]
Tomillo							
1000	17.89 b	17.46[b]	17.07[a]	16.83[a]	16.33[abc]	16.29[a]	16.16[b]
2000	18.11 ab	17.32[b]	17.12[a]	16.78[a]	16.48[ab]	16.17[a]	16.15[b]
3000	18.34 a	17.72[ab]	16.81[a]	16.74[a]	16.85[a]	16.85[a]	16.30[b]
4000	18.23 ab	17.75[ab]	16.00[a]	16.71[a]	15.91[bc]	16.18[a]	16.30[b]
Testigo							
0	18.04 ab	17.13[a]	17.10[a]	16.77[a]	16.55[ab]	16.49[a]	16.04[b]

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

5.2.1 Efecto de los aceites esenciales de tomillo y canela sobre *A. flavus* presente en maíz.

En el Cuadro 12 se muestra el porcentaje de inhibición de los aceites esenciales de canela y tomillo durante 49 días de almacenamiento con una humedad inicial de ± 18% a 85% de humedad relativa, en donde se observa que existen diferencias significativas entre muestreos. La concentración del aceite esencial de canela en 1000 ppm, no tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* presentando un grado de inhibición del 0-1% al igual que el testigo irradiado e inoculado durante todo el periodo de almacenamiento.

La concentración de canela 2000 ppm presentó una mayor actividad antifúngica e inhibió el crecimiento del hongo en un 95 % a los 14 días, esta inhibición varió a lo largo del almacenamiento oscilando entre el 98 y 78% de los 21-49 días. La mejor actividad antifúngica de este aceite fueron las concentraciones de canela 3000 y 4000 ppm observando un 99 a 100% de inhibición de *A. flavus* durante todo el almacenamiento (Figura 13A). A diferencia de Soliman y Badeaa, (2002) en donde el aceite esencial del canela en las concentraciones de 1000, 2000 y 3000 ppm causó la inhibición completa del crecimiento hongos probados *in vitro* entre los cuales se encontraba *A. flavus*. En el trabajo realizado por Couladis *et al*, (2004) encontraron que el aceite de canela también presentó un efecto inhibitorio contra *A. flavus.*

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren con los encontrados por Soliman y Badeaa, (2002) en que el aceite esencial de tomillo a concentraciones de 1000 ppm no presentó efecto inhibitorio durante el almacenamiento; en la concentración de 2000 ppm de tomillo se tuvo un porcentaje de inhibición de 77 % a los 14 días de almacenamiento está inhibición fue disminuyendo en 43, 40 y 25 % (a los 21, 28 y 35 días respectivamente), a los 42 días se obtuvo un aumento de 33% y a los 49 días 0 % de inhibición.

En la concentración de tomillo 3000 ppm se inhibió el desarrollo de *A. flavus* en 91 % a los 14 días, la inhibición en este aceite fue disminuyendo en 77 y 53 % a los 21 y 28 días, a los 35 y 42 días se presentó una inhibición de 50% para ambos muestreos y al final del almacenamiento se obtuvo un 43 %.

Cuadro 12. Crecimiento de *A. flavus* en maíz tratado con aceites esenciales de canela y tomillo almacenado a 85% de humedad relativa, 28° C durante 49 días.

Tratamiento (ppm)	Periodo de Almacenamiento													
	0		14		21		28		35		42		49	
	No. de Colonias	Grado de deinhibición (%)	No. de Colonias	Grado de inhibición (%)	No. de Colonias	Grado de inhibición (%)	No. de Colonias	Grado de inhibición (%)	No. de Colonias	Grado de inhibición (%)	No. de Colonias	Grado de inhibición (%)	No. de Colonias	Grado de inhibición (%)
Canela														
1000	0 a	100	99 a	1	100 a	0	100 a	0	100 a	0	100 a	0	100 a	0
2000	0 a	100	5 d	95	13 d	87	11 d	89	2 d	98	7 d	93	22 d	78
3000	0 a	100	0 e	100	0e	100	0 e	100	1 e	99	0 e	100	0 e	100
4000	0 a	100	0 e	100	0e	100	1 e	99	0 e	100	0 e	100	0 e	100
Tomillo														
1000	0 a	100	100 a	0	100 a	0	100 a	0	100 a	0	100 a	0	100 a	0
2000	0 a	100	23 b	77	57 b	43	60 b	40	75 b	25	67 b	33	100 a	0
3000	0 a	100	9 c	91	23 c	77	47 c	53	50 c	50	50 c	50	57 c	43
4000	0 a	100	3 e	97	3 e	97	3 e	97	4 e	96	0 e	100	2 e	98
Testigo														
0	0 a		100 a		100 a		100 a		100 a		100 a		100 a	

Diferentes letras dentro de las columnas presenta diferencias significativas (Tukey, p<0.01).

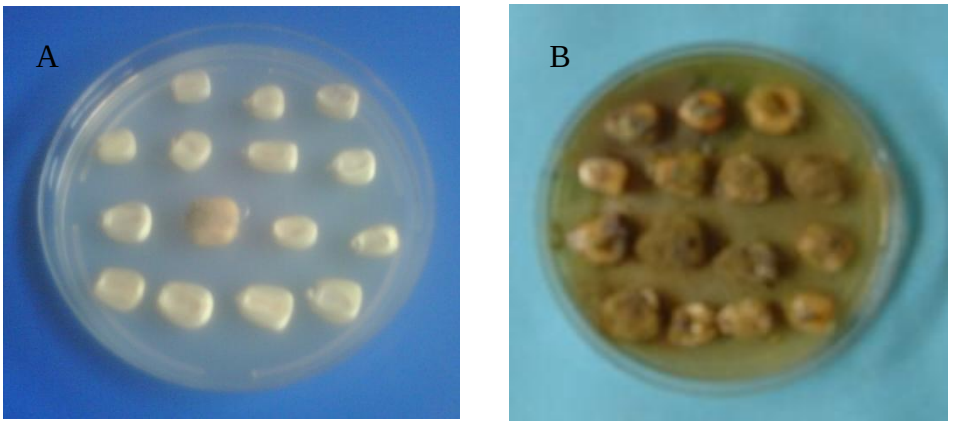


Figura 13. A) Inhibición de *Asperguillus flavus* con el aceite esencial de canela (3000 y 4000 ppm). B) Crecimiento de *A. flavus* en maíz sin tratamiento e inoculado con *A. flavus*. Almacenado a 85% de humedad relativa, 28° C durante 49 días.

Bluma y Etcheverry, (2007 y 2008) encontraron que el aceite de tomillo a 3000 ppm presenta actividad antifúngica sobre el crecimiento de *A. flavus* durante 35 días en maíz almacenado a 20% de contenido de humedad.

En la concentración de 4000 ppm el aceite de tomillo fue el que presentó mejor efecto inhibitorio durante el almacenamiento teniendo de 96 a 98% de inhibición a lo largo del almacenamiento. El testigo que fue inoculado con la cepa de *A. flavus*, presentó el mayor número de colonias aisladas (100) a lo largo de toda la fase experimental (Figura 13B).

Estos resultados difieren con los obtenidos por Ngueфack *et al*, (2004) en donde encontraron que el aceite esencial de tomillo en una concentración de 300 ppm, redujo el crecimiento micelial de *A. flavus* en 81% *in vitro* presentando un efecto fungistático, así mismo inhibió la germinación de los conidios de las especies del *F. moniliforme, A. fumigatus.* y de *A. flavus* en concentraciones de 500, 600 y 1000 ppm respectivamente. Es importante señalar que en muchos estudios realizados *in vitro* se ha encontrado la eficiencia de los aceites esenciales y las oleorresinas como antimicrobianos o antioxidantes naturales (Ponce *et al*., 2003; Holley y Patel,

2005; Sandasi *et al*., 2008 y Nedurostova *et al*., 2009). Sin embargo, *in vitro* suelen requerirse mayores concentraciones de los extractos.

5.2.2 Determinación de aflatoxinas

En el Cuadro 13 se muestran los niveles de aflatoxinas determinados en los diferentes muestreos durante el periodo de almacenamiento, se observa que entre tratamientos hay diferencias significativas.

En el primer muestreos a los 14 días de almacenamiento la mayor producción de aflatoxinas se determinó en el tratamiento de canela 1000 ppm con 723 µg/kg seguido del testigo inoculado e irradiado con 693 µg/kg y el tratamiento con tomillo 1000 ppm con 670 µg/kg. En el tomillo 2000 y 3000 ppm se determinaron 346 y 92 µg/kg respectivamente. A los 21 días la mayor presencia de aflatoxinas se determinaron en el testigo inoculado con 3500 µg/kg, seguido por canela 1000 ppm con 1240 µg/kg y todos los tratamiento con tomillo con 1239, 660, 169 y 64 µg/kg correspondiendo desde la menor concentración de tomillo hasta la mayor. En el siguiente periodo a los 28 días de almacenamiento la producción de aflatoxinas en los tratamientos de canela 1000 ppm (2383 µg/kg), canela 2000 ppm (38 µg/kg), canela 3000 ppm (1 µg/kg), canela 4000 ppm (20 µg/kg). En los tratamiento de tomillo en 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm, son de 2707, 460, 583 y 104 µg/kg respectivamente y teniendo el nivel más alto el testigo inoculado con 6700 µg/kg. A los 35 días de almacenamiento los niveles mas altos de producción de aflatoxinas se determinaron en los tratamientos de tomillo con 5900, 453, 536 y 65 µg/kg, en el tratamiento de canela 1000 ppm con 3967 µg/kg y en el testigo inoculado 3867 µg/kg. Al igual que en el siguiente periodo los niveles de aflatoxinas más altos se determinaron en el tratamiento de tomillo con 4467, 397, 357 y 121 µg/kg. En el de canela 1000 ppm con 1300 µg/kg y el nivela más alto de este periodo de 42 días en el testigo inoculado con 5267 µg/kg. En el ultimo periodo de almacenamiento a los 49 días, los niveles más altos son similares a los dos periodos anteriores presentado los tratamiento de tomillo 4733, 553, 397 y 209 µg/kg, el tratamiento de canela 1000 ppm 713 µg/kg y el testigo inoculado 3533

Cuantificación de aflatoxinas

Cuadro 13. Nivel de aflatoxinas en maíz inoculado con *Aspergillus flavus* y tratado con aceites esenciales de canela y tomillo.

Tratamiento	Nivel de aflatoxinas (μg/kg)						
	Periodo de almacenamiento (Días)						
(ppm)	0	14	21	28	35	42	49
Canela							
1000	0 a	723 a	1240b	2383 b	3967 ab	1300 b	713 b
2000	0 a	1 c	6 c	38 cd	3 e	4 cde	1 c
3000	0 a	0 c	1 c	1 d	1 e	2 de	1 c
4000	0 a	0 c	1 c	20 cd	8 e	1 de	0 c
Tomillo							
1000	0 a	670 a	1239 b	2707 b	5900 a	4467 a	4733 a
2000	0 a	346 ab	660 b	460 cd	453 cd	397 bc	553 bc
3000	0 a	92 bc	169 c	583 c	536 c	357 bcd	397 bc
4000	0 a	0 c	64 c	104 cd	65 de	121 cde	209 bc
Testigo							
Inoculado	0a	693 a	3500 a	6700 a	3867 b	5267 aa	3533 a

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas (Tukey, p< 0.01)

µg/kg. Los tratamientos que presentaron mayor efecto inhibitorio fueron los de canela en concentraciones de 2000, 3000 y 4000 ppm ya que la presencia de aflatoxinas determinadas en todos los tratamientos y testigo se encuentran por debajo de los limites permitidos para el consumo humano por la NOM-188-SSA1-2002 que es de 20 µg/kg de aflatoxinas. Con excepción de canela 2000 ppm a los 28 días de almacenamiento en donde la producción de toxinas fue de 38 µg/kg. Estos resultados concuerdan con el trabajo de (Sinha *et al*, 1993) en el cual encontró que en el grano de maíz almacenado durante 10 días bajo condiciones favorables, el aceite esencial de canela y clavo son efectivos contra la inhibición de la síntesis de las aflatoxinas produidas por *A. flavus*.

En un trabajo realizado por Gowda *et al*, (2004), encontró que el aceite esencial de canela en concentración de 2000 ppm no inhibió el crecimiento micelial de *A. flavus*, sin embargo observó la inhibición de la producción de aflatoxinas. El cual sugiere que el modo posible de acción de estos compuestos esté interfiriendo en la vía biosintética de la producción de las aflatoxinas, sin afectar al crecimiento del hongo, dando por resultado la inhibición parcial o completa de la producción de aflatoxinas.

El tratamiento del aceite esencial de tomillo en 4000 ppm (64-209 µg/kg) podría ser utilizado para el consumo animal ya que los niveles de aflatoxinas determinados a lo largo del almacenamiento están por debajo de 300 µg/kg de aflatoxinas permitidas por la NOM-188-SSA1-2002.

En su estudio Bluma y Etcheverry, (2007), demostraron que el aceite esencial de tomillo tuvo efecto inhibitorio sobre la fase lag, la fase exponencial de crecimiento y en la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* inoculado en maíz estéril con contenidos de humedad mayores a 20%. Mahmound, (1994) observó que el cinamaldehído en 1000 ppm suprimió totalmente el crecimiento de *A. flavus in vitro* por lo tanto la formación de aflatoxinas. También encontró que la concentración mínima efectiva de inhibición del cinamaldehído fue de 200 ppm. Hitokoto, *et al*, (1980) extrajo el timol del tomillo y encontró que la inhibición del crecimiento del género *A. flavus in vitro* fue en concentración de 400 ppm. En una concentración de 200 ppm, el timol presentó una actividad parcial con 72% y un 98%, de inhibición del crecimiento y síntesis de aflatoxinas.

La producción de aflatoxinas en las dos etapas experimentales fue diferente siendo el contenido de humedad inicial de 18% donde se presentó la mayor

producción de aflatoxinas, debido a que es la humedad óptima para la producción en maíz, a diferencia de el contenido de humedad inicial de 13%. Durante el segundo experimento hubo más desarrollo de *A. flavus* y por lo tanto mayor producción de aflatoxinas, debido a la actividad de agua que es un parámetro importante que determina el crecimiento de *A. flavus* en los granos de maíz durante el almacenamiento (Moreno, 1996).

En un estudio realizado por Soliman y Badeaa (2002) en trigo inoculado con *A. flavus, A. parasiticus, A. ochraceus y F. moniliforme,* almacenados de 2 a 8 semanas observaron que el grado de inhibición del crecimiento de estos hongos y la producción de micotoxinas es dependiente de la concentración de aceites esenciales usados. Es decir el efecto inhibitorio del aceite es proporcional a su concentración.

Muchos aceites esenciales ejercen actividad antimicrobiana, pero el mecanismo de la acción no se entiende a menudo completamente. Nguefack *et al,* (2004) demostró en su trabajo la bioactividad de los aceites esencial, tal como su propiedad antimicrobiana.

Según Chao *et al,* (2005) la mayor parte de los componentes químicos de los aceites esenciales son compuestos terpenoides, incluyendo los monoterpenos, los sesquiterpenos, y sus derivados oxigenados. Estos compuestos de poco peso molecular fácilmente se difunden a través de las membranas celulares para inducir las reacciones biológicas.

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos (2000, 3000 y 4000 ppm) presentaron mejor efecto sobre el desarrollo de hongos de almacén en contenidos de humedad de 13 a 16% protegiendo al grano por un periodo de 182 días.

En el contenido de humedad de 13% los aceites esenciales de canela, tomillo y la mezcla de ambos; inhibieron la producción de aflatoxinas, en todas las concentraciones utilizadas

El grano de maíz almacenado en 13% de contenido de humedad el aceite esencial de tomillo en concentraciones de 3000 y 4000 ppm presentaron la mejor actividad antifúngica sobre el desarrollo de *A. flavus* y otros hongos de almacén.

En la segunda fase experimental los aceites esenciales de canela y tomillo (2000, 3000 y 4000 ppm) presentaron un efecto fungistático sobre el crecimiento micelial de *A. flavus* reduciendo la producción de aflatoxinas en el grano de maíz almacenado con contenido de humedad de 18%.

Los aceites esenciales de canela y tomillo en 1000 ppm no presentaron actividad antifúngica sobre el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas.

El aceite esencial que presentó la mejor actividad antifúngica sobre le desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas fue el de canela en concentraciones de 2000, 3000 y 4000 ppm en grano de maíz almacenado en contenidos de humedad de 18% durante 49 días.

Los aceites esenciales de tomillo y canela produjeron la inhibición del crecimiento miceliar de *A. flavus* y de la producción de aflatoxinas.

El aceite de canela en concentraciones altas redujo el crecimiento del hongo de modo que impidieron la producción de aflatoxinas.

El mecanismo de la inhibición y de la destrucción por aceites esenciales es variado por que los compuestos microbianos son diversos desde el punto de vista químico.

Los aceites esenciales son una alternativa de aplicación práctica en la inhibición de la producción de aflatoxinas en el maíz almacenado, ya que estos aceites esenciales pueden ser usados como sustitutos de fungicidas químicos con la ventaja de carecer de efectos secundarios y no dejan residuos tóxicos en los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceites Esenciales. 2002. Cátedra de farmacognosia y productos naturales. Universidad Nacional de San Luis. Facultad de Química. Unidad 4. 1-18 p. Consulta julio, 2007. http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/bolilla4.pdf.
- AOAC, 1995. Official Method 991.31. Aflatoxins in corn, raw peanuts, and peanut butter. Inmunoaffinity column (aflatest) methods. First action 1991. AOAC-IUPAC method. In:AOAC. International (Ed.). Official method of Analysis Natural Toxins, chapter 49. Arlington, VA, USA.
- Badui Dergal, S. 1993. Química de alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. Mexico.
- Bennett, J.W y Klich, M. 2003. Clinical Microbiology Reviews. 16:497-516.
- Bluma, R. V., Etcheverry, M. G. 2007. Application of Essentials oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. Food Microbiology 25:324-334.
- Bluma R. Amaiden, M. R., Daghero, J., Etcheverry, M., 2008. Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. Journal of Aplplied Microbiology 105:203-214.
- Bourgeois, C. M. 1994. Microbiología Alimentaría. Volumen I. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad de alimentaría.
- Bosquez-Molina, E.,Bautista-Baños, S., Morales-López, J. 2009. Aceites Esenciales: Bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. Industria Alimentaria 31:12-22.
- Boyer, C. D., Shannon, J. C. 1987. Carbohydrates of the kernel. En S.A. Watson y P.E. Ramstad. Eds. Corn: chemistry and technology, p 253-272. St Paul, Minn., EE.UU.., AVI Publishing.
- Bressani, R., Breuner, M. y Ortiz, M.A. 1989. Contenido de fibra ácido y neutrodetergente y de minerales menores en maíz y su tortilla. Arch. Latinoam. Nutr., 39:382-391.

- Bullerman , L. B., 1979. significance of mycotoxins to food safety and human health, J, Food Prot 42:65.
- Cerovich, M., Miranda F. 2004. Almacenamiento de semillas: Estrategia básica para la seguridad alimentaria. Maracay, Aragua, Venezuela. CENIAP 4:1-7p.
- Chao, L. K., Hua, K., Hsu, H., Cheng, S., Liu, J., & Chang, S. (2005). Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7274–7278.
- Chelkowski, J. 1991. Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Elsevier. Holanda.
- Christensen, C. M. y Kaufmann. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. Ann. Rev. Phytophol. 3: 69-84.
- Code of Federal Regulations. U. S. Govermment Printing Office. 2003. Title 21, Vol3. Chapter I, Part 182, Subpart A. 456-460.
- Código de Prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas, con anexos sobre la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los Tricotecenos. CAC/RCP 51-2003. www.codexalimentarius.net
- Couladis, M., Tzakou, O., Kujundzic, S., Sokovic, M. y Mimica-Dukic, N., 2004. Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus*. Phytotherapy Research 18, 40–42.
- Cruz, D. Ma. S., Gomez, V. M., Ortiz, P. M., Entzana, T. A., Suárez H. C., Santillan, M. V. 2008. Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/SP_AG/Maiz/PortalesFijos/Situacion/maiz96-12.pdf, julio, 2009.
- Davies. N. D., Diener, U. L. Agnihotri, V. P. 1969. Production of aflatoxin B1 and aflatoxin G1 in chemically defined medium by *Aspergillus flavus*. Mycol. Appl. 13:251.
- Deepack, B., Santos, G., 2001. *Aspergillus.* Guide to food borne pathogens. Ed. Wiley-Interscience. Toronto EUA. 35p.

- Denli, M. y Pérez, J.F., 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamientos y prevención. Departamento de Ciencia Animal i dels Aliments. Facultad de Veterinaria. UAB. Barcelona.
- Dixon, R. C. y Hamilton, P. B., 1981. Effects of feed ingredients on the antifugal activity of propionate. Poultry Sci. 60:2407.
- D´Mello, J.P.F. y McDonald, A.M.C. 1997. Anim Feed Sci Technol. 69:155-166.
- Draughon, F. A. 2004. Use of botanicals as biopreservatives in foods. Food Technologgy 58 (2), 20-28
- Dwividi, S. A. y Dubey, B. L., 1993. Potentiality use of essential oil of the traschyepenrmun ammy against seed borne fungi of guar (*Cyanopsis tetragonoloba* L.). Mycopathología 121 (2), 101-104.
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, S. y Oldham, J. H., 1991. Aflatoxins in food. Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection an methods of control. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 30:403-439.
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. Roma, Italia.
- Flores- Moctezuma, H. E., 2008a. Obtención de extractos, caracterización e identificación. Memorias del X Congreso Internacional / XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Monterrey, Nuevo León.
- Flores- Moctezuma, H. E., 2008b. Plantas con propiedades antimicrobianas. Memorias del X Congreso Internacional / XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Monterrey, Nuevo León.
- Frazier, W. C. 1993. Microbiología de los alimentos. 3ra. Edición. Ed. Acribia.
- Gams, W., Christensen, M. Onions, A. H. S., J. I., Pitt, J. I., Samson, R. A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus.* En: Samson, R. A. y J. I. Pitt (Eds.) Advances in *Penicillum* and *Aspergillus* systematics. New York. Plenum Press.
- Gimeno A., Ligina M. 2003. I Simposium Panamericano de Micotoxinas para la Industria. Abril 1-4. Ciudad de México.

- Goldblatt, L. 1972. Implications of mycotoxins. Clin. Toxico., 5, p.453.
- Gowda, N. K. S., Malathi, V., Suganthi, R. U, 2004. Effect of some chemical and herbal compounds in growth of *Aspergillus parasiticus* an aflatoxin production. Animal Feed Science and Technology. 116:281-291
- Granados, G. R. 2001. El maíz en los trópicos. FAO.
- Hall, D. W. 1981. FAO. Cuadernos de fomento agropecuario. Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las zonas tropicales y subtropicales. ONU. Roma 54-70 p.
- Hitokoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. y Kurata H. 1980. Inihibitory effects ofsSpices on growth and toxinpProduction of toxigenic fungi. Departmente of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 Japan. p 818-822.
- Holley, R. y Patel, D. 2005 Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essentials oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology. 22.273-292.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), 2001. Microorganismos de los alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Ed. Acribia.
- IARC, (International Agency for Research on Cancer) 1993. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human, vol. 56. IARC, Lyon, France, pp. 257–263.
- INFOASERCA (Información económica y comercial para el sector agropecuario) 1994. www.infoaserca.gob.mx
- Jinks, J. L., 1969. Selection for adaptability to new enviroment in *Aspergillus glaucus,* J. Gene Microbiol. 20:223.
- ISTA, (International rules for seed testing) 2005. www.seedtest.org.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, , E. A., Stevens, P. F.Doohhue, M. J. 2002. Secondary Plant Compounds. Plan Systematics : A Phylogenetic Approach 2nd. Ed. Sinauer 4:115-116.
- Klich M. A., Cleveland T. E., 2000. *Aspergillus* systematics and the molecular genetics of mycotoxin biosynthesis. pp. 425-434 en: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus*

Classification. Samson RA, Pitt JI, Editores. Harwood Academic Publishers, Australia.

- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Lambert, R. J. W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas, G. J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91: 453-462.
- Landers, K. E., Davis, N. D. and Diener, U. L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts, Phytopathol., 57: 1086-1967.
- Landry, J., Moureaux, T.1982. Distribution and amino acid composition of protein fractions in opaque-2 maize grain. Phytochemistry, 21:1865-1869.
- Magan, N., Lacey, J., 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 82, 83- 93.
- Mahmound, A.L.E., 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. Lett. Appl. Microbiol.19, 110– 113.
- Marin, S., Sanchis, V., Arnau, F., Ramos, J., Magan, N. 1998. Colonization and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* International Journal of Food Microbiol. 45: 107-117p.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P. Haruthaithanasan, V., Parker M. 2005. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. International Journal of Food Microbiology. 107:180-185.
- Miller, K. 1987. Toxicological Aspects of Food. Elsevier Applied Science. Great Britain.
- Minto, R. E., Townsend, C. A., 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Rev. 97, 2537-2555-

- Montes-Belmont R., Carvajall, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize whit plan essential oils and their components. Journal of Food Protection. 61:616-619.
- Mora, M. 1997. Glosario técnico sobre factores de calidad en granos. FAO.
- Moreno, M. E. 1988. Contaminación por hongos en granos almacenados México Editorial Pax México. Cap. 4.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Tercera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Moreno, L. J. 2004. Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. Cuautitlan Izcalli. Edo. Mex.
- Morozumi, S., 1978. Isolation, purficiation and antibiotic activity of o-methoxycinnamaaldyde from cinnamon. Applied Environmental Microbiology 36: 577–583.
- Mossel, D. A. A.1982. Microbiología de los alimentos. Fundamentos biológicos para garantizar y comprobar la inocuidad de los alimentos. Ed. Acribia.
- Mukherjee, P.S., Nandi, B., 1994. Poultry feed preservation from fungal infection by cinnamon oil. Journal of Mycopathological Research 32 (1), 1-5.
- Nedurostava, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M. y Pulkrabek, J. 2009. Food Control. 20. 157-160.
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P.H. y Mathur, S. B. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology 94:329-334.
- Nhu-Trang, T., Casabianca, H. y Grenier, L. M., 2006. Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ- terpinene and

p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1132:219-227.

- NOM-188-SSA-1-2002. Bienes y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones. www.economia.gob.mx.
- Panizzi L., FlaminI G., Cioni P.L., Morelli I. 1993. Copmposition and antimicrobial properties of esssential oils of four Mediterranean Lamiaceae. Journal of Ethnopharmacology 39:167-1770
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H., D. Violic, A. 2001. El maíz en los trópicos. Grupo de cultivos alimentarios extensivos. FAO.
- Patkar, K., Usha, C., Shetty, H., Paster, N., Lacey, J., 1993. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1 production by *A. flavus*. Letters in Applied Microbiology :17 (2), 49–51.
- Pérez, R. M. 1997. Micobiota en granos de sorgo: Incidencia natural de alternarioles. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias, UNAM.
- Pixton, S.W. 1967. Moisture content-Its, significance and measurement in Stored Products. Journal of stored prod. Res. 3:35-47.
- Ponce, A., Fritz, R., Del Valle C. y Roura, S. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenchart und Technologie. 36. 679-684.
- Raper, K. B. y Fennell, D. I. 1965. The Genus *Aspergillus.* Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- Rasooli, I., Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Department of Biology, Shahed University. Phutochemestry. 66: 285-2856.
- Reineccius, G. 1994. Souurce book of flavors. Chapman & Hall. New York, USA. 928p.
- Ruiz, O. Ma. 2007. Cantificación de aflatoxinas en salas picantes de chiles secos de tercera calidad expedidos en la zona metropolitana de la ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

- Ryu, D., Holt, D.L., 1993. Growth inhibition of *Penicillium expansum* by several commonly used food ingredients. Journal of Food Protection: 56 (10), 862–867.
- Salmeran, J., Pozo, R., 1991. Effect of cinnamon *(Cinnamomum zeylanicum)* and clove *(Eugenia caryophyllus)* on growth and toxigenesis of *A. flavus*. Microbiologie Aliments et Nutrition 9 (1), 83–87.
- Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohe, M. D., Wei, C.I. 1990. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. J. Food protect. 53: 489-501.
- Sandstead, H.H., Munoz, J.M., Jacob, R.A., Kelvay, L.M., Reck, S.J., Logan, G.M., Dintzis, F.R., Inglett, G.E. y Shvey, W.C. 1978. Influence of dietary fiber on trace element balance. Am. J. Clin. Nutr., 31:5180-5184.
- Sandasi, M., Leonarad, C y Viljoen, A. 2008. The effect of five common Essentials oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food control. 19. 1070-1075.
- Sánchez, C. F. 2006. Extracción de Aceites Esenciales. II congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Bogotá D. C.
- Sánchez, H. G. 2005. Estudio comparativo del efecto de diferentes especies del genero *Aspergillus* y de la humedad de almacenamiento sobre el vigor y la longevidad de la semilla de maíz.
- Sauer, D. B., Meronuck, R. A. Cristensen, C. M. 1992. Microflora. Storage of cereal their products. Cuarta edición. St. Paul, Editorial American Association of cereal Chemists. Inc. Cap. 9, 339 p.
- Sinha, K.K., Sinha, A.K., Prasad, G., 1993. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 6, 114– 117.
- Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON-SIAP) http://w4.siap.sagarpa.gob.mx , julio 2009.
- Soliman, K.M., Badeaab, R.I.. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi .*Food Technology and Dairy Departments, National Research Center, Dokki, Cairo, Egypt.*

- Soriano, C. J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Ediciones Diaz de Santos. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Velencia España.
- Swaminathan, M. S. 1998. Foreword In. Grainge and S. A. S., Ahmed Handbook of plants with pest control properties. John Willey and Sons. New York. U. S. A. 470 p.
- Tabak, H. H., Cooke, W. B. 1968. The effect of gaseous environment on the growth and metabolism of fungi. Bot. Rev. 34:124.
- Vargas-Arispuro, I. 2008. Preparación de extractos vegetales. Laboratorio de Ecología de Química del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). . Memorias del X Congreso Internacional / XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Monterrey, Nuevo León.
- Vazquez Barrios, M.E., Martinez Ponce, R., Fernandez Escartin, E. 2001. Development of toxigénico *Aspergillus flavus* and *A parasiticus* on kernels of native pecan [*carya illinoensis* (wangenh) K. Koch] genotypes under different water activities.
- Velluti, A., Sanchis, B. A., Ramos, J., Egido, J. and Marín S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. Food Technology Department, Lleida University, Lleida, Spain.
- Velluti, A., Marin, S., Gonzalez, P., Ramos, A. J., Sanchis, V. 2004. Initial Screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium* verticilliodes, F. proliferatum F. graminearum on maize-based agar media Food Technology Department, Lleida University, Lleida, Spain. p 649-656.
- VICAM., 1999 Micotoxin testing system. Aflatest Somerville, M. A.
- Watson, S. A. 1987. Measurement and maintenance of quality, in Corn: Chemistry and Technology. Ed. Stanley A. Watson y Paul E. Ramstad. American Association of Cereal Chemists, Inc. USA.

- Widstrom NW. 1992. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent econiche factors. pp. 23-58 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, editores. Marcel Dekker, New York.
- Willcock, J. y Morgan, N. 2001. Impact of environmental factors on fungal respiration and dry matter losses in wheat straw. Journal of Stored Product Resaerch 37: 35-45.
- Wrigley, C., Corke, H., Walker, E. Ch. 2004. Encyclopedia of Grain Science. Vol.II. Elsevier Academic Press. Spain. 501p.
- Yousef A. E., Marth E. H. 1983. Incorporation of (C^{14}) acetate into aflatoxin by resting cultures of *Aspergillus parasiticus* in the presence of antifungal agents. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech. Vol.18 :103.
- www.botanical-online.com. 2008.

ANEXOS

Anexo 1.

Efecto de diferentes aceites esenciales sobre el desarrollo micelial de *Aspergillus flavus.*

En el cuadro 1 se puede observar que los aceites esenciales de canela, clavo, orégano, tomillo blanco y tomillo rojo inhibieron al hongo en un 100%, presentando un efecto fungicida, también se observa que el aceite de hierbabuena tuvo efecto inhibitorio durante 9 días, sin embargo a los 15 días presentó un crecimiento de 1.17 cm, teniendo un efecto fugistático. Los aceites de anís, eucalipto, limón centrifugado no presentaron ningún efecto sobre el crecimiento micelial de la colonia, incluso algunos estimularon el desarrollo de *A. parasiticus* El limón frío y la toronja inhibieron ligeramente en un 9.62 y 5.31 % el desarrollo de la colonia, presentando un efecto fungistático. Los aceites de naranja presentaron una mayor inhibición (53.57a y 51.08b %), seguidos por la mejorana (23.22%) y romero (19.08%) teniendo efecto fungistático.

Cuadro 1. Actividad antifúngica de diferentes aceites esenciales en concentración de 2000ppm sobre el desarrollo micelial de *Aspergillus flavus.*

Aceite esencial (2000 ppm)	3 días	6días	9 días	15 días	Grado de Inhibición (%)	Actividad antifúngica
Control	1.13	2.58	3.88	6.03		
Anís	1.63	4.2	5.6	6.21	0	Ft
Canela	0	0	0	0	100	Fg
Clavo	0	0	0	0	100	Fg
Eucalipto	1.53	3.56	4.16	6.1	0	Se
Limón	1.13	3.06	4.3	6.33	0	Se
Limón centrifugado	1.31	2.76	3.43	6.48	0	Se
Limón frío	1.06	2.06	3.55	5.45	9.62	Ft
Mejorana	1.083	2.1	3.06	4.63	23.22	Ft
Naranja a	0.93	1.58	2.58	2.8	53.57	Ft
Naranja b	0.03	0.58	1.55	2.95	51.08	Ft
Orégano	0	0	0	0	100	Fg
Romero	0.7	1.93	2.71	4.88	19.08	Ft
Tomillo blanco	0	0	0	0	100	Fg
Tomillo rojo	0	0	0	0	100	Fg
Toronja	0.88	2.08	3.26	5.71	5.31	Se
Yerbabuena	0	0	0	1.17	80.6	Ft

** Ft = fungistático; Se = sin efecto; Fg = fungicida

Anexo 2.

Técnica de determinación de aflatoxinas

La determinación de la concentración de aflatoxinas totales de las muestras de maíz se realizaron por el método de Cromatografía de Inmunoafinidad utilizando el método 99.31 de inmunoensayo de la AOAC Internacional, (1995).

El cual consistió en pesar 50 g de las muestras del maíz, en vasos de plástico para licuadora de 250 ml, adicionando 5 g de NaCl y 100 ml de metanol al 80%, mezclando durante un minuto a máxima velocidad en la licuadora, se filtró la muestra con papel Watman No.1. Se tomaron 10 ml del filtrado y se diluyeron en 40 ml de agua destilada, de esta dilución se tomaron 10 ml y se filtraron en un embudo con papel microfibra de vidrio. Posteriormente se pasaron a través de la columna de inmunoafinodad Afla Test; se lavó la columna con 10 ml de agua destilada dos veces y después se agregó 1 ml de metanol grado HPLC a la columna, recibiendo el extracto en un vial. Se adicionó 1ml de revelador Afla Test (solución de bromo al 0.03 %) a la muestra obtenida, se mezcló en el Vortex por 10 segundos y finalmente se colocó la muestra en un fluorómetro marca VICAM Series – 4 Fluorometer registrando la lectura después de 1 minuto.