



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
Facultad de Ciencias Químicas

Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en fase de vapor contra *Aspergillus flavus* en maíz criollo (*Zea mays*)

Tesis para obtener el título en:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA: p. QFB Marinthia Zepeda Bello

DIRECTOR: Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez

CODIRECTOR: Dr. Ricardo Munguía Pérez

Julio 2023





OFICIO C.Q./CT 012P/2023

C. Marinthia Zepeda Bello
PRESENTE

Toda vez que se cuenta con la aprobación de la Coordinadora de la Licenciatura en QFB, le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

"Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en fase de vapor contra *Aspergillus flavus* en maíz criollo (*Zea mays*)"

ha sido autorizado, siendo:

D.C. Raúl Ávila Sosa Sánchez, Director de Tesis
D.C. Ricardo Munguía Pérez, Codirector de Tesis

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 23 de junio de 2023

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena digital: 9Rt-Sp\$Cd"Vw/Ys"Do/Yd#Nm"BwlQr-Vg\$Tg/Xe#Br"Gy%Hm!Pq'Pc\$Sc[Mn%Rc-Hg,Nz/Vb!q+We#Ra" Cg-Sx/Ck'Gf.SobDh"Zk'Kg"Oo/Mx!Jg[Ex%Xs,Q!+Uo.Ly"Ld\$If#Cj,El.Fj'Dx]Ad]Bo"Xm\$Tt-Pa"Gs,Ah&Zo"Uv!Hr)Vk%Gx"To-Yc#Dp+Gb!Ls/Uf-Ym"Ya"Zl'Ej"Ay-Ug.Nz/Me"Rl/Rx'Ar+Yl(Sy-!c"Be,Rf)Csi:Eg"Em.Mp&Ux(Zn,Ry,Di-Wc+

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
tel (222) 229 55 00 Ext. 7390



OFICIO C. Q./CT 026CR/2023

M.E.C Obdulia Vera López
Dra. Teresa Soledad Cid Pérez
Dra. Addi Rhode Navarro Cruz

Con toda atención comunico a Ustedes que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora del trabajo de Tesis que presenta el pasante de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Marinthia Zepeda Bello

cuyo título es:

"Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en fase de vapor contra *Aspergillus flavus* en maíz criollo (*Zea mays*)"

Asimismo, les solicitamos que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 26 de junio de 2023

Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Cadena Digital: 3Uf#Gn#Hr*Om+Rv-Jo,Ew+Fy,Jx/Gl&Nr/Yo+Oo%Mn+Uq]Ne#Ga&Gn*We"Dt(Nf)Mb"Ti)Me*Pg-Xa\$Ue&Vo/Xh+Aqj/Kv)Ar*Lu,Pw*Vi.Na#Hl'Kb)Ab*Of.Ya/Mf"Dq|Qk'G!Jb.Mg"Ha&Uu|Ci|Kk%Kv.Fx"lv"Sn+Os&Er/Gf+Ca+Rt"Ti(B c%Yy.Gq-Sl+Oe.Kg5Rs-Ft*Pp|Jl"Xb*JulRa-Tx"Bp&Bt%Sc-Gl-Eb,Ek'lk+Ps\$Wc)Wg#Md\$Pc'Pc&Qx,Xr{Sn%HF{

Facultad de Ciencias Químicas | San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390



OFICIO C.Q./CT 032A/2023

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis de la alumna de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Marinthia Zepeda Bello

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Raúl Avila Sosa Sánchez con el siguiente título:

"Evaluación del efecto inhibitorio de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en fase de vapor contra *Aspergillus flavus* en maíz criollo (*Zea mays*)"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 5 de julio de 2023.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 5 de julio de 2023


M.E.C. Abdulla Vera López, Presidente


Dra. Teresa Soledad Cid Pérez, Secretario


Dra. Addi Rhode Navarra Cruz, Vocal

c.c.p. Archivo

Cadena digital:

7Hp{Yw}Xv,Nd{Hk}C%Uv,Wj,Ga.Gl{Dh}Et.HN%Qn"No\$Lh.Zm"Is/Hz{Tv#Tl"NI%Ec+Af&Ix"Mu!Wb%Sk+Ad%Cg}TK.Aw-Lh[Ew#Su\$Sr{Sf+Ev{Eb,Qz'Ad'Nx+Lm"Hg,Is,Ge.ig%Tw%Qg'cw+Wt/Ta"Jo%Kk"Kq}Roj}Hs%Do+Xh%Ww"Pg.Ng{Ja,Gj}Hx{Nb&Yc{Nr-Cd#Qc+Ir+Wj}Hx+Hy#te\$Nt'Wk'Ex&Ib*Am/Qp-Od\$YU{Is&Gx#Ww}Mv,Wm-Lt&Ny'Rz}Pg{

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7360

Dedicatoria

"Si tenemos en cuenta el número casi infinito de posibilidades y caminos que conducen a nacer a una sola persona, debes estar agradecido de ser tú mismo en este preciso instante.

Piensa en el enorme número de posibles universos alternativos en los que, por ejemplo, tus tatarata-tatarata-abuelos nunca se encontraron y tú nunca llegaste a existir.

Tienes el placer de vivir en un planeta en el que has evolucionado para respirar el aire, beber el agua y adorar el calor de la estrella más cercana.

Estás conectada con todas las generaciones y los seres vivos de este mundo a través del ADN. También con el universo, porque cada célula de tu cuerpo fue creada en los corazones de las estrellas.

Tú estás viva en este segundo. Eso es algo increíble"

Carl Sagan

Quiero dedicar este último trabajo de mi licenciatura a mi papá, quien me acompañó de corazón en todo momento apoyando mis decisiones y siempre confiando en mí. De aquí hasta el cielo te digo gracias por tanto. Te amo mil millones de infinidades.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mi mamá, por permanecer fuerte y ser sincera con sus opiniones, además de brindarme el apoyo necesario para seguir superándome. A mis hermanos, les agradezco por crear un entorno propicio para mi crecimiento personal. A Jorge, le doy las gracias por su apoyo durante esta etapa, por enseñarme tanto en tan poco tiempo. A mis adoradas mascotas, les agradezco por ser mi consuelo en momentos difíciles. A mi director de tesis, le expreso mi gratitud por demostrarme su calidad como profesor y por brindarme confianza, comprensión y apoyo en este proyecto de la mejor manera posible. A la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, le agradezco por darme la oportunidad de crecer tanto a nivel académico como personal. Por último, pero no menos importante, me agradezco a mí misma por seguir avanzando en este camino.

Índice

Contenido

Índice.....	7
Índice de tablas	9
Índice de figuras	10
Resumen.....	11
1. Introducción.....	12
2. Revisión bibliográfica	15
2.1 El maíz y su producción	15
2.2 <i>Aspergillus flavus</i>	18
2.3 Micotoxinas y Aflatoxinas	20
2.3.1 Interacción <i>A. flavus</i> – maíz	22
2.3.2 Modo de acción de las aflatoxinas	25
2.3.3 Detección de aflatoxinas	26
2.3.4 Muestreo para aflatoxinas	31
2.4 Antimicrobianos de origen natural	34
2.4.1 Aceite de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	37
2.4.2 Aceite de árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	40
2.5 Fase de vapor	41
2.5.1 Mecanismo de acción del aceite esencial por fase de vapor.....	42
2.5.2 Técnica fase de vapor	45
3. Justificación.....	47
4. Objetivos	48
4.1 Objetivo general	48
4.2 Objetivos particulares	48

5. Diagrama general de trabajo	49
6. Materiales y métodos	50
6.1 Material biológico	50
6.2 Preparación del inóculo	50
6.3 Material de vidrio y reactivos de grado analítico.....	50
6.4 Métodos y equipos	50
7. Metodología.....	52
7.1 Realización de cinética de supervivencia de <i>A. flavus en maíz</i>	52
7.2 Identificación cualitativa de aflatoxinas en maíz contaminado	52
7.3 Determinación de la CMI de los aceites esenciales en fase de vapor.....	52
7.4 Análisis de datos	52
8. Resultados y discusión.....	54
8.1 Etapa experimental 1. Realización de la cinética de supervivencia de <i>A. flavus</i>	54
8.2 Etapa experimental 3 Determinación de la CMI de los aceites esenciales en fase de vapor	55
8.3 Etapa experimental 2. Identificación cualitativa de aflatoxinas en maíz criollo	61
9. Conclusiones.....	64
10. Recomendaciones.....	65
11. Bibliografía	67

Índice de tablas

Tabla 1. Métodos utilizados en el proyecto	50
Tabla 2. Equipos utilizados en el proyecto.....	51
Tabla 3 Resultados del análisis de datos experimentales obtenidos para aceite esencial de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>) y aceite esencial de árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	60

Índice de figuras

Figura 1 Evolución mensual de la producción de maíz amarillo 2018-2022 (miles de toneladas). Recuperado de: SIAP Escenario mensual de productos agroalimentarios. Dirección de Análisis Estratégico, 19 de abril del 2023.	16
Figura 2 Evolución mensual de las importaciones y exportaciones mexicanas de maíz amarillo 2019-2022 (miles de toneladas). Recuperado de: SIAP Escenario mensual de productos agroalimentarios. Dirección de Análisis Estratégico, el 19 de abril del 2023.	17
Figura 3 Estructura química de las principales aflatoxinas: B1, B2, G1, G2 y M1 producidas por cepas toxígenas de <i>A. flavus</i> . Recuperado de: Martínez et al., (2019) Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención, el 14 de octubre del 2022	22
Figura 4 Comportamiento de <i>Aspergillus flavus</i> inoculado en maíz criollo (<i>Zea mays</i>) durante 15 días a 25° C de almacenamiento.	55
Figura 5 Inhibición de <i>Aspergillus flavus</i> inoculado en maíz criollo (<i>Zea mays</i>) por 15 días a 25° C con diferentes concentraciones de aceites esenciales ($\mu\text{l/litro}$ de aire) de A) clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>) y B) árbol de té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) por contacto en fase de vapor.	58
Figura 6 Identificación cualitativa de aflatoxinas en maíz criollo (<i>Zea mays</i>) contaminado con <i>Aspergillus flavus</i> por el método de exposición a luz UV.	61

Resumen

Buscando una manera más eficiente y segura de descontaminación en los alimentos, se ha estudiado en los últimos años la acción antimicrobiana que ejercen ciertos aceites esenciales sobre los microorganismos responsables del deterioro de muchos alimentos. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la concentración mínima inhibitoria y evaluar el efecto fungicida de dos tipos de aceites esenciales: el aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*) y el aceite de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*). Para ello se llevó a cabo la inoculación de *Aspergillus flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) y se inhibió empleando la técnica fase de vapor. De esta forma, se expuso al hongo (*A. flavus*) por contacto indirecto haciendo uso del vapor generado por los aceites esenciales a diferentes concentraciones. Se utilizó el método de diluciones seriadas y vertido en placa para cuantificar la inhibición, así como un método cualitativo de fluorescencia para la detección de aflatoxinas, los resultados obtenidos se encuentran representados gráficamente en curvas de supervivencia de *A. flavus*, bajo condiciones ambientales generadas por las diferentes concentraciones de aceite esencial. En conclusión, ambos aceites esenciales presentan actividad antifúngica por contacto indirecto, siendo 750 μ l la concentración mínima inhibitoria (CMI) para ambos aceites esenciales contra *A. flavus* inoculado en maíz criollo (*Zea mays*).

1. Introducción

En México, el maíz ocupa el primer puesto como el cultivo de mayor importancia en términos de la extensión de tierra destinada a su cultivo cada año y su consumo por persona. Las pérdidas en la producción de este grano están estrechamente relacionadas con su manejo durante la cosecha en el campo, el almacenamiento, el transporte y el procesamiento tanto para el consumo humano como animal. Esto se debe a que el maíz posee una microbiota específica compuesta por bacterias, insectos y hongos que pueden causar daños en su calidad. Entre ellos, el género fúngico conocido como *Aspergillus*, en particular las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*, juegan un papel especialmente relevante debido a su capacidad de producir aflatoxinas, las cuales son sustancias que, al ser ingeridas, pueden desencadenar procesos cancerígenos (Martínez et al., 2013).

El impacto tóxico de las aflatoxinas generadas por *Aspergillus* puede variar desde ser carcinogénico, teratogénico o mutagénico, hasta la inducción de trastornos hormonales o inmunosupresión. Este efecto depende de varios factores, tales como el tipo de aflatoxina presente, la dosis, el tiempo de exposición y el organismo expuesto (Carvajal, 2013). El principal desafío radica en que las aflatoxinas tienen la capacidad de acumularse, lo cual implica que, una vez que contaminan el grano o cualquier otro producto agrícola, ya sea en el campo o en las instalaciones de almacenamiento, persisten incluso después de procesos como la digestión, la cocción o la congelación. Estas aflatoxinas son ingeridas por los seres humanos no solo a través del consumo directo de granos, semillas o frutas, sino también mediante productos derivados como la leche o la carne de animales que han sido alimentados con alimentos contaminados (Requena et al., 2005).

El problema que se presenta abarca dos situaciones distintas pero interrelacionadas, con implicaciones tanto económicas como de salud pública. Por un lado, los agricultores enfrentan pérdidas económicas debido a la presencia de productos contaminados, mientras que, por otro lado, existe un riesgo para la salud de la población al consumir alimentos contaminados, algunos de los cuales pueden pasar desapercibidos a simple vista. Ambas situaciones plantean desafíos que

requieren una atención y acción en el ámbito de la salud pública. En México, las regulaciones actuales establecen límites permisibles únicamente para las aflatoxinas en cereales y sus productos, dejando de lado la presencia de otras micotoxinas. Con el fin de regular la presencia de aflatoxinas en cereales, se emitió en 2008 la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008. Esta norma establece un límite máximo permitido de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas tanto para el consumo humano como para el consumo animal. Además, brinda especificaciones sanitarias para el transporte y almacenamiento de cereales, y establece un límite máximo de 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas en la harina de maíz nixtamalizado y la masa utilizada para la elaboración de tortillas (DOF, 2008).

Dado el creciente interés por los efectos perjudiciales que las plagas y sus metabolitos, como las aflatoxinas, pueden tener en la salud humana, los científicos están trabajando en encontrar métodos que sean a la vez económicos y sencillos para descontaminar los alimentos, sin generar compuestos tóxicos secundarios ni alterar las características nutricionales y organolépticas de los alimentos. El objetivo es lograr una eliminación efectiva de estas plagas y sus productos secundarios de manera segura y sin comprometer la calidad de los alimentos. En este contexto, se ha propuesto un nuevo método conocido como eliminación por contacto indirecto en fase de vapor, aunque todavía se encuentra en una etapa inicial de evaluación en cuanto a la diversidad de microorganismos y aceites esenciales utilizados en este proceso. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los vapores generados por los aceites esenciales poseen propiedades antimicrobianas, lo que plantea la posibilidad de utilizarlos como agentes antifúngicos mediante contacto indirecto. Esta estrategia podría mitigar en mayor medida el impacto en las características sensoriales de los alimentos, asegurando al mismo tiempo la inocuidad del producto (Martínez, 2013).

La investigación sobre el uso de aceites esenciales ha adquirido una importancia significativa como una forma de reemplazar los conservantes sintéticos por opciones naturales. Sin embargo, existe una limitación en cuanto a su eficacia como agentes antimicrobianos cuando se utilizan directamente en forma líquida, ya que

en los alimentos suelen ser menos efectivos que en estudios in vitro. Como resultado, se requieren concentraciones más altas para lograr el mismo efecto, lo que conlleva la desventaja de alterar los atributos sensoriales y la calidad del alimento (Phillips et al., 2011). Por lo tanto, es crucial explorar otras alternativas de aplicación para asegurar la inocuidad de los alimentos.

2. Revisión bibliográfica

2.1 El maíz y su producción

El maíz (*Zea mays*) es una planta gramínea originaria de América, con un centro de origen que se encuentra en América Central y México, y diversos centros de diversidad a lo largo de la Cordillera de los Andes. El origen del maíz cultivado ha sido objeto de diversas teorías, pero en general se acepta que las especies silvestres han desempeñado un papel importante en su evolución. Esta especie se reproduce a través de semillas resultantes de la fecundación cruzada de óvulos presentes en una inflorescencia femenina, conocida como espiga, que generalmente es única y se encuentra en posición axial. La fecundación se lleva a cabo mediante granos de polen producidos en una inflorescencia masculina llamada panoja, que se ubica en la parte superior del tallo. La polinización se realiza a través del viento (polinización anemófila) y el porcentaje de autofecundación es muy bajo. El maíz es una de las plantas domesticadas más antiguas y ha sido cultivado durante muchos siglos por los pueblos indígenas de América, quienes lograron mejoras genéticas significativas, desarrollando variedades de maíz con características amiláceas, dulces, duros y dentados. Este cultivo es uno de los alimentos más importantes para la población de México y muchos más (Rodríguez, 2018).

2.1.1 Producción de maíz en México

En México, la producción de maíz se divide en dos tipos principales: maíz blanco y maíz amarillo. El maíz blanco representa aproximadamente el 86.94% de la producción total y se destina principalmente al consumo humano. Por otro lado, el maíz amarillo se utiliza principalmente en la industria y solo satisface alrededor del 24% de los requerimientos nacionales. Durante el periodo 2021/22, la oferta total de maíz fue de 26 millones 355 mil toneladas. De esta cantidad, aproximadamente el 89% provino de la producción nacional, mientras que el 8% provino de inventarios y el 3% restante se importó; estos datos indican que la producción nacional es la principal fuente de suministro de maíz en México, lo que resalta la importancia de la producción interna para cubrir la demanda nacional. (SAGARPA, 2017).

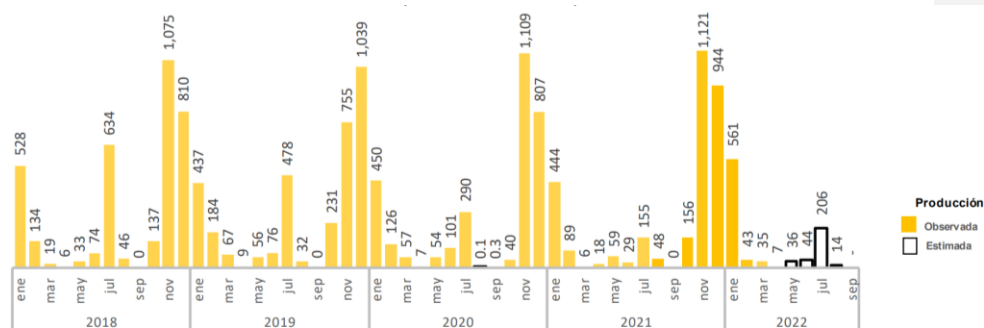


Figura 1 Evolución mensual de la producción de maíz amarillo 2018-2022 (miles de toneladas). Recuperado de: *SIAP Escenario mensual de productos agroalimentarios. Dirección de Análisis Estratégico, 19 de abril del 2023.*

Según los datos presentados en la Figura 1, durante el periodo comprendido entre 2021 y 2022, se cosecharon un total de 62,328 hectáreas de maíz, lo que resultó en una producción de 356,092 toneladas. Esto representa un aumento del 14.2% en comparación con el periodo anterior. Entre los principales productores de maíz se encuentra el estado de Tamaulipas, que contribuyó con el 69% de la cosecha total. Le sigue el estado de Sinaloa con un 24% y en tercer lugar se encuentra Chiapas, aportando un 5%. Por otro lado, durante el mismo periodo, se cosecharon un total de 1,000,000 hectáreas de maíz blanco, lo que resultó en una producción de 6.9 millones de toneladas. Sin embargo, esto representa una disminución del 10.1% en comparación con el periodo anterior donde el estado de Sinaloa se destaca como el mayor productor de maíz blanco, aportando el 75% de la cosecha total. Chiapas y Oaxaca ocupan el segundo lugar, con un 2.6% de producción cada uno (SIAP, 2022)

1. Importación y exportación del maíz.

Es importante considerar que las importaciones y exportaciones de maíz a lo largo del año están sujetas a la disponibilidad y nivel de las cosechas nacionales. En el caso del maíz amarillo, las importaciones provienen principalmente de Estados Unidos, siendo este país el proveedor principal. Sin embargo, también se adquiere grano de otros países, como Brasil, con un total de alrededor de 839 mil toneladas

anuales. Hasta julio de 2022, se han importado 78 mil toneladas de maíz amarillo de Estados Unidos. Durante el periodo 2021/22, se acumularon un total de 13,000,373 toneladas importadas, lo que representa una disminución del 1.1% en comparación con el periodo anterior. Las importaciones provienen de cuatro naciones en total. Estados Unidos es el principal proveedor, contribuyendo con el 72.5% del total. Brasil representa el 24.6%, Argentina el 2.8%, y Francia también es un proveedor en menor medida. En resumen: las importaciones y exportaciones de maíz están influenciadas por la disponibilidad de las cosechas nacionales. Estados Unidos es el principal país proveedor de maíz amarillo, seguido por Brasil. Sin embargo, también se adquiere maíz de otros países como Argentina y Francia, aunque en menor proporción. (SIAP, 2022).



Figura 2 Evolución mensual de las importaciones y exportaciones mexicanas de maíz amarillo 2019-2022 (miles de toneladas). Recuperado de: *SIAP Escenario mensual de productos agroalimentarios. Dirección de Análisis Estratégico, el 19 de abril del 2023.*

Según el informe de mayo del World Corn Trade del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para el ciclo 2022/23, se observa que las exportaciones de maíz siguen siendo lideradas por Estados Unidos, con un total de 62 millones de toneladas. En segundo lugar se encuentra Brasil, con 46 millones 500 mil toneladas, lo que representa un aumento de 12.5 millones de toneladas en comparación con el ciclo anterior. Argentina ocupa el tercer puesto con 41 millones de toneladas exportadas.

Por otro lado, los principales importadores de maíz son China, con 18 millones de toneladas, lo cual representa una disminución de 5 millones de toneladas en comparación con el ciclo anterior. México se sitúa como el segundo mayor importador, con 17 millones 700 mil toneladas. Japón sigue en tercer lugar con 15 millones 200 mil toneladas, y Vietnam en cuarto lugar con 12 millones de toneladas. Estos datos muestran la dinámica del comercio mundial de maíz, con Estados Unidos como el principal exportador y China y México como los mayores importadores. Es importante tener en cuenta que esta información se basa en el informe del USDA y puede estar sujeta a cambios a medida que se actualicen los datos.

2.2 *Aspergillus flavus*

El género *Aspergillus* fue inicialmente descrito en 1729 por P. A. Micheli, quien observó que la estructura conidial de este hongo se asemejaba a un "*aspergillum*", el instrumento utilizado para rociar agua bendita. Se trata de un hongo filamentoso, compuesto por cadenas de células conocidas como hifas, a diferencia de las levaduras, que consisten en una sola célula redonda. Taxonómicamente, *Aspergillus flavus* se clasifica dentro del reino *Fungi*, la clase *Eurotiomycetes*, el orden *Eurotiales* y la familia *Trichocomaceae*. Al cultivarse, este hongo forma colonias de crecimiento rápido, que pueden alcanzar entre 3 y 5 días. Inicialmente, las colonias presentan un color blanco-amarillento, con una textura algodonosa, pero a medida que pasa el tiempo, se vuelven pulverulentas y adquieren tonalidades verdosas o verde-amarillentas (Rodríguez, 2018).

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas, se ha convertido en el hongo más ampliamente reportado en alimentos, lo que refleja su importancia tanto económica como sanitaria, así como su presencia generalizada. Este hongo muestra una afinidad particular por nueces, maní y maíz, siendo el maní la especie más comúnmente aislada y el maíz la segunda (después de *Fusarium moniliforme*) (Patriarca, 2004).

El género *Aspergillus* se encuentra naturalmente en el suelo, donde sobrevive y se desarrolla en materia orgánica en descomposición. Este género es uno de los más

abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en diversos ambientes. Se reproduce mediante conidios, que germinan para formar hifas. Para su crecimiento óptimo, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70% y el 90%, un contenido de agua en la semilla de entre el 15% y el 20%, y un amplio rango de temperatura que va desde los 0°C hasta los 45°C (Klich, 2002).

Aspergillus flavus es un componente normal de la microflora del suelo en áreas tropicales, subtropicales y templadas, y sus esporas pueden ser transportadas por el aire. Una característica destacada de las especies de *Aspergillus* es su capacidad para producir micotoxinas, en este caso, aflatoxinas. El contenido de agua y la temperatura del grano son factores críticos que afectan la producción de micotoxinas (Bogantes et al., 2004). Es importante mencionar que la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de cada cepa de *Aspergillus*, no de la especie en general. Además de las aflatoxinas, *A. flavus* también produce otra toxina llamada ácido ciclopiazónico. Los hongos del género *Aspergillus* también pueden inhibir la germinación de las semillas y causar cambios de color, aumento de temperatura, moho, aglomeración y pudrición (Martínez, 2013).

El género *Aspergillus* presenta un ciclo biológico relativamente simple y una de sus características más destacadas es su alta capacidad de esporulación, lo que conlleva a la generación de concentraciones elevadas de esporas en el aire. Estas esporas se producen en forma de conidiosporos, los cuales se forman en cadenas a partir de células especializadas llamadas esterigmas o fálides. Los conidioforos, por su parte, cuentan con una célula basal o célula pie bien diferenciada. El órgano de reproducción asexual de estos hongos se asemeja a un hisopo o aspersorio, de ahí proviene el nombre "*Aspergillus*" (Medina, 2010).

La especie predominante asociada a la producción de aflatoxinas es *A. flavus*, la cual se divide en dos morfotipos conocidos como L y S (Martínez, 2013). Según Cotty (1989), los aislamientos del morfotipo L no producen o generan esclerocios mayores a 400 µm, pero sí producen grandes cantidades de conidios. Por otro lado, los aislamientos del morfotipo S producen numerosos esclerocios con un diámetro menor a 400 µm y pocos conidios. Los aislamientos del morfotipo L muestran una

variabilidad considerable en la producción de aflatoxinas, con algunos aislamientos siendo altamente toxigénicos y otros no toxigénicos. En contraste, los aislamientos del morfotipo S producen concentraciones consistentemente altas de aflatoxinas, llegando hasta 10,000 µg/kg.

2.3 Micotoxinas y Aflatoxinas

A partir de la década de 1960, se intensificó la investigación sobre las micotoxinas debido a una serie de casos de micotoxicosis en animales. El primer caso documentado involucró la muerte de pavos que se habían alimentado con harina de maní contaminada con hongos. En ese momento, la causa de la enfermedad era desconocida, por lo que los investigadores del Tropical Products Institute de Inglaterra la denominaron "Enfermedad X del pavo". Poco después, se registraron pérdidas significativas en patos en Kenia debido a una enfermedad similar. Al mismo tiempo, se informaron casos de carcinoma hepatocelular (CHC) en truchas arcoiris de criaderos en Estados Unidos y Europa. Los análisis de los alimentos revelaron que el hongo *A. flavus* era el responsable de la producción de la toxina (Bogantes et al., 2004).

El término "aflatoxina" se compone de la letra A, que corresponde a la inicial del género *Aspergillus*; FLA, las iniciales de la especie *flavus*; y "toxina", que hace referencia a un veneno. Sin embargo, las aflatoxinas son micotoxinas producidas por cepas tóxicas de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas micotoxinas son derivados difuranocumarínicos y su nomenclatura se basa en cuatro estructuras: AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Los subíndices 1 y 2 indican la mayor movilidad de las AF₁ en comparación con las AF₂ en una separación cromatográfica. Entre las veinte aflatoxinas diferentes identificadas hasta ahora, solo las AFs B₁, B₂, G₁ y G₂ se producen de forma natural en sustratos contaminados por *Aspergillus* aflatoxigénicos. Las demás aflatoxinas (M₁, M₂, P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) son productos metabólicos de sistemas microbianos o animales. De todas las aflatoxinas identificadas, la AFB₁ es la más común y la más tóxica. Además, mientras que las toxinas tipo B se forman a partir de la fusión de dos anillos (una

lactona y una ciclopentanona), las toxinas tipo G contienen un anillo lactona fusionado en lugar del anillo ciclopentanona (Reátegui et al., 2012).

Las cepas toxicógenas de *Aspergillus flavus* usualmente generan solo aflatoxinas de tipo B₁ y B₂, mientras que las cepas de *Aspergillus parasiticus*, producen aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Experimentos realizados en animales han demostrado que las aflatoxinas pueden producir toxicidad aguda y crónica: los efectos agudos incluyen necrosis hepática, nefritis, y congestión pulmonar y los crónicos incluyen daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad en modelos animales. Biológicamente, las aflatoxinas se comportan como inmunosupresores que inhiben la fagocitosis e interrumpen la formación del DNA, RNA y las proteínas en el ribosoma (Martínez et al., 2013).

Comentado [VLO1]: No está en la bibliografía

Inicialmente, el crecimiento del hongo *Aspergillus flavus* y su metabolismo primario no generan cantidades significativas de aflatoxinas. Sin embargo, a medida que el tiempo avanza y ciertos nutrientes, como el fosfato, el nitrógeno y algunos elementos traza, se vuelven limitados, el crecimiento primario se ve reducido. Las temperaturas de crecimiento adecuadas para este hongo son las siguientes: una temperatura mínima de 6-8 °C, una temperatura óptima de 36-38 °C y una temperatura máxima de 44-46 °C. Sin embargo, para que se produzcan las aflatoxinas, se requieren condiciones térmicas específicas, como una temperatura mínima de 12 °C, una temperatura óptima de 27-30 °C y una temperatura máxima de 40-42 °C (Bogantes et al., 2004).

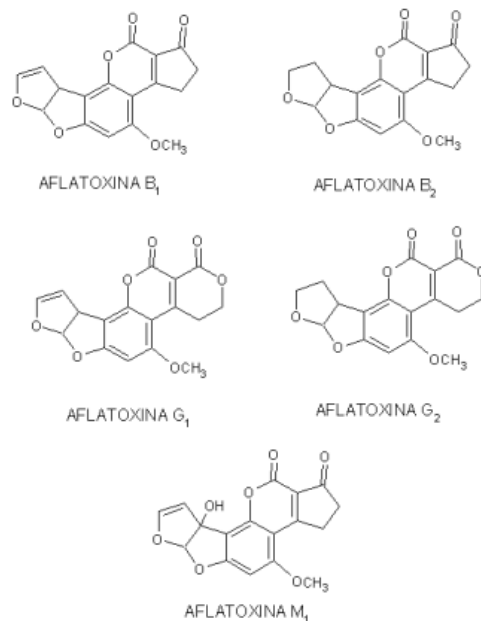


Figura 3 Estructura química de las principales aflatoxinas: B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁ producidas por cepas toxígenas de *A. flavus*. Recuperado de: *Martínez et al., (2019) Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención, el 14 de octubre del 2022*

La estructura básica de las aflatoxinas (Figura 3), consiste en un anillo dihidridifurano o tetrahidro-difurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), entre otras. Sólo las mencionadas se sintetizan naturalmente; las otras AF son hidroxilados producto del metabolismo animal o microbiano (Bogantes, 2004).

2.3.1 Interacción *A. flavus* – maíz

A pesar de que México es reconocido como el lugar de origen y diversidad del maíz, no se ha realizado un análisis exhaustivo y consistente de esta diversidad para identificar variedades genéticas más tolerantes a la contaminación por aflatoxinas.

Dado que el maíz es un alimento de importancia mundial, es fundamental monitorear su calidad sanitaria en todas las etapas del cultivo, desde el uso de semillas libres de patógenos hasta la cosecha y el almacenamiento posterior. Es relevante destacar que en México, la mayoría de los cultivos de maíz se llevan a cabo en condiciones de temporal, que suelen ser deficientes y variables, lo que a menudo resulta en la combinación de estrés hídrico y altas temperaturas durante la fase de reproducción del maíz. Estas condiciones propician la infección por *Aspergillus* en el campo, como señalan Martínez y colaboradores en 2013.

Los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son hongos comúnmente encontrados en el maíz, tanto en el campo como durante el almacenamiento, y todos ellos tienen el potencial de producir micotoxinas. El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son el resultado de la interacción entre el hongo, el huésped y el entorno. Esta interacción entre estos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de aflatoxinas que se producen. (Rodríguez, 2018).

La producción de aflatoxinas es influenciada por una variedad de factores tanto en el campo como en el almacenamiento. En el campo, la presencia de aflatoxinas aumenta en situaciones de estrés hídrico, altas temperaturas y daños causados por insectos que infestan las mazorcas, como las especies de los géneros *Heliothis* y *Spodoptera*. Además de esto, la incidencia de aflatoxinas se ve favorecida por el ataque de plagas que se desarrollan en condiciones específicas, como la fecha y densidad de siembra elevadas, así como una alta presencia de malezas. En el almacenamiento, las condiciones de temperatura y humedad elevadas, junto con la falta de una adecuada ventilación, y la presencia de inóculo primario proveniente del campo, también desempeñan un papel determinante en el aumento de la síntesis de aflatoxinas en los granos de maíz (Martínez et al., 2013). Estos factores combinados pueden contribuir al riesgo de contaminación por aflatoxinas en la cadena de producción y almacenamiento de maíz.

En condiciones de alta temperatura y baja disponibilidad de agua, *A. flavus* se vuelve altamente competitivo y puede convertirse en una de las especies

dominantes de hongos en el suelo. Durante períodos de estrés hídrico, las plantas se convierten en la única fuente de agua para el hongo, lo que resulta en ataques más severos en comparación con los cultivos con riego, donde la contaminación tiende a ser menor. Se cree que los conidios son el principal inóculo primario, transportados desde el suelo y depositados en los estigmas o en granos dañados por el viento o insectos. El ciclo de la podredumbre de la espiga causada por *Aspergillus* comienza con las esporas que sobreviven el invierno en cultivos, especialmente en cereales o residuos de cultivos anteriores. Estas esporas son transportadas por agentes abióticos como el viento y el impacto de gotas de lluvia, así como agentes bióticos como insectos y aves, hasta las espigas de maíz. Una vez en las espigas, encuentran dos principales vías de entrada: los estigmas y las heridas en los granos en desarrollo. La penetración y colonización de los estigmas ocurre principalmente después de la polinización y puede continuar hasta la senescencia de los estigmas, dependiendo del patógeno específico. Una vez que los estigmas están infectados, las hifas pueden crecer a través de ellos y alcanzar los granos. Por lo general, estos hongos no invaden los granos a través del pericarpio sano, pero si hay daños físicos o heridas en las brácteas foliáceas, algunos pocos granos pueden ser colonizados, y a partir de ellos, la infección puede extenderse a toda la espiga (Rodríguez, 2018).

La actividad de agua, la temperatura y el tiempo son parámetros críticos en la producción de aflatoxinas. Es difícil, estudiar por separado el efecto de estos factores. La temperatura óptima, al igual que las temperaturas máxima y mínima que permiten el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas, son dependientes de la composición y de las condiciones de humedad del sustrato. Es la interacción entre estos parámetros y otros tales como disponibilidad de oxígeno y nutrientes, lo que condiciona el desarrollo de los hongos y la formación de toxinas (Patriarca, 2004).

Según Martínez (2014), las aflatoxinas tienen un impacto económico significativo, causando pérdidas en cultivos y animales. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que alrededor del 25%

de los cultivos en todo el mundo se ven afectados por micotoxinas, especialmente las aflatoxinas. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas variedades de plantas resistentes y a la implementación de políticas mejoradas en la industria alimentaria.

En México, se han establecido normativas para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008, se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, que establece el límite máximo permisible de aflatoxinas en cereales en 20 µg/kg, tanto para el consumo humano como para el consumo animal. Además, esta norma proporciona información sobre las especificaciones sanitarias para el transporte y almacenamiento de cereales. En cuanto a la harina de maíz nixtamalizado y la masa para tortillas, la norma establece un límite máximo de aflatoxinas de 12 µg/kg (NOM-247-SSA1-2008). Estas regulaciones son importantes para garantizar la seguridad alimentaria y reducir la exposición a las aflatoxinas en México.

2.3.2 Modo de acción de las aflatoxinas

Una vez que la aflatoxina es absorbida en el intestino delgado, se transporta a través de los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado a través de la circulación portal. En el hígado, se metaboliza mediante enzimas oxidantes que la convierten en metabolitos, algunos de los cuales son altamente reactivos y tienen la capacidad de unirse de manera covalente a centros nucleofílicos de macromoléculas celulares como el ADN, ARN y proteínas. Esto representa un riesgo biológico para la célula (Bolet et al., 2005).

Guzmán-de Peña (2007) señala que las aflatoxinas se forman mediante la condensación de la acetil-coenzima A y la malonil-coenzima A, lo cual da lugar a la acetil-S coenzima A, que es la molécula inicial de la AFB₁. En la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es especialmente relevante, ya que es la primera molécula en la ruta hacia la AFB₁ y contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula de bis-furano. Este doble enlace es el objetivo de activación de una molécula altamente reactiva. Durante la síntesis, se llevan a cabo al menos 23 reacciones enzimáticas y se producen 15 intermediarios. A nivel molecular, están implicados 25 genes en los pasos de interconversión, los cuales han sido

secuenciados y confirmados mediante la interrupción génica y estudios enzimáticos, y se encuentran agrupados en una región de 70 kb del ADN.

Padrón et al. (2013), menciona en su artículo titulado “*The Genus Aspergillus and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives*” que la biosíntesis de las aflatoxinas es afectada por factores genéticos y ambientales. Adicionalmente, la regulación de la producción de aflatoxinas también está influenciada por la ubicación de los genes en el cromosoma y la acción de factores de transcripción globales que responden a señales de nitrógeno, carbono y pH. Estos factores desempeñan un papel crucial en la expresión de los genes estructurales responsables de la síntesis de aflatoxinas. Las fuentes de nitrógeno y carbono, el pH del entorno, la temperatura, la disponibilidad y actividad del agua, así como los metabolitos presentes en las plantas, todos ellos afectan directamente las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de aflatoxinas. Bajo condiciones de estrés, como altas temperaturas o humedad, la producción de aflatoxinas es mínima. Sin embargo, cuando se dan combinaciones favorables de factores ambientales, se incrementa tanto la síntesis de aflatoxinas como los perfiles de expresión de los genes asociados con dicha síntesis. Se ha observado que la relación de expresión entre los genes *afIR/afIJ* se correlaciona con un aumento en la biosíntesis de aflatoxinas. Estos hallazgos subrayan la complejidad de los mecanismos de regulación genética y las interacciones entre diferentes factores que influyen en la producción de aflatoxinas en el hongo *Aspergillus*.

2.3.3 Detección de aflatoxinas

La detección de aflatoxinas en alimentos y piensos es de vital importancia para garantizar la seguridad alimentaria y proteger la salud de los consumidores. Los programas de pruebas de aflatoxina se han convertido en una parte integral de las políticas de comercio internacional, tanto en la importación como en la exportación de productos, y también desempeñan un papel fundamental en los procesos de comercialización de los productores, especialmente en productos como el maíz, en numerosos países alrededor del mundo.

Existen una amplia variedad de métodos disponibles para evaluar la presencia de aflatoxinas en las muestras, ya sean directos o indirectos, cuantitativos o cualitativos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que algunos de estos métodos pueden resultar costosos y requerir equipos especializados.

La American Association of Cereal Chemists International (AACCI) ha respaldado y clasificado los diferentes procedimientos en tres categorías principales: métodos visuales, métodos cromatográficos y pruebas rápidas. Cada uno de estos métodos presenta sus propias características y ventajas, pero también difieren en términos de precisión, costos de los instrumentos necesarios, gastos asociados por cada muestra analizada y el nivel de habilidad técnica requerido para llevar a cabo las pruebas de manera adecuada. Es importante considerar estos factores al seleccionar el método más apropiado para la detección y cuantificación de aflatoxinas en alimentos y piensos, con el objetivo de garantizar resultados confiables y precisos en beneficio de la salud pública y la seguridad alimentaria en general.

Estos métodos son:

- Método espectroscópico (visual)

El método más simple y rápido para determinar la posible presencia de aflatoxinas en muestras consiste en realizar una inspección visual de los granos utilizando luz ultravioleta o "luz negra". La luz ultravioleta ha sido ampliamente utilizada como una técnica económica y rápida para la detección de aflatoxinas en diversos tipos de muestras. La luz ultravioleta es una forma de radiación electromagnética con una longitud de onda de 200-400 nm, que puede ser absorbida por los compuestos químicos presentes en las muestras. En particular, las aflatoxinas tienen una absorción máxima en torno a los 360 nm, lo que permite su detección en alimentos y piensos cuando se exponen a esta radiación (Dowell, 2016).

Es importante tener en cuenta que todas las aflatoxinas tienen una absorción máxima alrededor de los 360 nm y pueden exhibir fluorescencia, ya sea brillante

o tenue, cuando se les expone a la radiación ultravioleta. Sin embargo, es necesario destacar que la fluorescencia no es exclusiva de las aflatoxinas, ya que hay otras sustancias presentes en los alimentos que también emiten fluorescencia bajo la radiación ultravioleta de onda larga. Además, la fluorescencia no es una propiedad estable, desaparece después de 4 a 6 semanas de exposición continua a la radiación visible o ultravioleta, aunque la toxina en sí misma puede permanecer. Por lo tanto, la fiabilidad de este método depende del tamaño de la muestra analizada y se utiliza principalmente como una evaluación preliminar, especialmente en el ámbito de la alimentación animal (Espinosa et al., 2011).

Este método de detección puede llevarse a cabo de manera manual o electrónica, si bien en lugares donde los costos laborales han aumentado, se han introducido técnicas automatizadas debido a que el enfoque manual resulta más lento. En términos de clasificación, se ha observado que la presencia de hongos puede modificar las características visuales y bioquímicas de los granos, como decoloración o manchado, cambios en la transmitancia y reflectancia, así como la aparición de fluorescencia. Estas variaciones en la forma, densidad y tamaño de los granos se consideran como indicadores del crecimiento del hongo. A partir de esta información, se han propuesto y probado diversas tecnologías que buscan detectar el daño causado por el micelio del hongo y permitir la remoción del maíz contaminado por aflatoxina (Reátegui et al., 2012).

En un estudio realizado por Wacoo y sus colaboradores en 2014, titulado "Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops", se señala que la espectroscopía infrarroja es otro método espectroscópico de utilidad en el análisis de aflatoxinas. Este enfoque se basa en la modificación de las vibraciones moleculares que ocurren cuando las moléculas son expuestas a radiación infrarroja. La espectroscopía infrarroja permite medir las vibraciones que se generan en los enlaces químicos dentro de una molécula.

Dado que el tamaño, la longitud y la fuerza de los enlaces varían significativamente de una molécula a otra, la absorción de radiación infrarroja

por parte de un enlace específico variará según el tipo de enlace y el modo de vibración. Por ejemplo, los distintos tipos de enlaces presentes en las moléculas orgánicas vibran a diferentes frecuencias, dependiendo del tipo de enlace excitado. Al utilizar un espectrómetro infrarrojo para analizar una muestra, se hacen pasar radiaciones infrarrojas que abarcan una variedad de frecuencias a través de la muestra, y se mide la cantidad de energía radiante absorbida por cada tipo de enlace presente en las moléculas. Como resultado, se genera un espectro infrarrojo que representa gráficamente el porcentaje de transmitancia en función de la frecuencia.

La espectroscopía infrarroja es una técnica valiosa en el análisis de aflatoxinas, ya que permite identificar y cuantificar la presencia de estas toxinas en muestras agrícolas. Este método se basa en las características vibracionales únicas de los enlaces químicos y ofrece información detallada sobre la estructura y composición molecular de las muestras analizadas. Aunque la interpretación de los espectros infrarrojos puede requerir experiencia y conocimiento especializado, esta técnica proporciona resultados rápidos y precisos, lo que la hace adecuada para aplicaciones en la detección de aflatoxinas en alimentos y cultivos agrícolas

- Métodos cromatográficos

Las técnicas cromatográficas desempeñan un papel fundamental en la separación y análisis de aflatoxinas, aprovechando la interacción física entre una fase móvil y una fase estacionaria, así como la distribución de los componentes a separar entre ambas fases. Uno de los sistemas más utilizados en este ámbito es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), que ofrece una estimación precisa, alta sensibilidad y automatización en la detección de aflatoxinas.

La cromatografía líquida de alta resolución es ampliamente reconocida y empleada en el análisis de aflatoxinas debido a su capacidad para proporcionar resultados confiables. Sin embargo, cabe destacar que su implementación implica la realización de pasos complejos de extracción y limpieza de las

muestras, lo cual añade tiempo y requiere experiencia en su ejecución. Además, la sensibilidad y especificidad de la técnica dependen en gran medida de la calidad de los reactivos y columnas utilizados, así como de la experiencia del operador en la interpretación de los resultados obtenidos.

A pesar de los desafíos y requisitos asociados con la cromatografía líquida de alta resolución, su aplicación en el análisis de aflatoxinas ha demostrado ser valiosa en la garantía de la seguridad alimentaria. La capacidad de este método para separar y cuantificar aflatoxinas en muestras de alimentos y piensos lo convierte en una herramienta indispensable en los programas de control y monitoreo de contaminantes en la industria alimentaria. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, debido a la complejidad y los recursos necesarios para su implementación, es recomendable contar con personal capacitado y equipos especializados para llevar a cabo este tipo de análisis (Sinha, 1999).

2. Pruebas rápidas

En su artículo titulado "Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening" publicado en 2011, Sarah de Saeger destaca que los métodos inmunoquímicos son ampliamente utilizados para la detección rápida de micotoxinas, ya sea de forma cuantitativa o semicuantitativa. Estos métodos se basan en equipos relativamente simples, como lectores de microplacas, iluminómetros y sistemas de electroforesis capilar.

A diferencia de los métodos cromatográficos, los inmunoensayos suelen combinarse con un proceso simple de extracción, preconcentración y limpieza de las muestras. Entre los enfoques más comunes para los inmunoensayos de micotoxinas se encuentran la unión de anticuerpos específicos a un soporte sólido, utilizando formatos de ensayo inmunoenzimáticos (ELISA) directos y competitivos, o mediante el recubrimiento de antígenos en formatos de ELISA indirectos y competitivos. Estos formatos se aplican en inmunoensayos

realizados en microplacas y sensores, y son considerados métodos no homogéneos.

Los métodos inmunoquímicos son altamente selectivos y sensibles, permitiendo la detección de micotoxinas en concentraciones bajas. Además, son relativamente rápidos y fáciles de implementar en el análisis de muestras, lo que los convierte en herramientas atractivas para el monitoreo y control de micotoxinas en la industria alimentaria. No obstante, es importante tener en cuenta que estos métodos dependen de la disponibilidad de anticuerpos específicos y su adecuado desarrollo, así como de la validación y estandarización adecuadas de los procedimientos inmunoquímicos para garantizar la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos.

- Inmunosensores.
- Sensores colorimétricos y luminiscentes.
- Sensores de resonancia de plasmón de superficie.
- Sensores electroquímicos.
- Ensayos de inmunofluorescencia de polarización.
- Ensayos de inmunoelectroforesis de capilar.

2.3.4 Muestreo para aflatoxinas

El muestreo de granos es un proceso esencial en la evaluación de la calidad de los granos, ya que permite obtener una muestra representativa del lote o partida, sin importar su tamaño o forma de almacenamiento. Durante este procedimiento, se extrae una porción del grano, generalmente de aproximadamente 2 kilogramos, que conserva todas las características de calidad presentes en el lote. Esta muestra se utiliza posteriormente para llevar a cabo el análisis de los granos, el cual consiste en una serie de operaciones y procedimientos sistemáticos diseñados para determinar la calidad de los granos. Es fundamental realizar tanto el muestreo como el análisis en dos momentos clave:

A) Durante la transacción comercial de compra-venta de granos: En este caso, se realiza el muestreo para obtener una muestra representativa del lote que se está negociando. Esto permite evaluar la calidad de los granos antes de concretar la transacción, asegurando la satisfacción de ambas partes involucradas en la operación.

B) Durante el almacenamiento: Durante el periodo de almacenamiento de los granos, se deben realizar muestreos periódicos para evaluar la calidad y detectar posibles cambios o problemas, como la presencia de aflatoxinas u otras contaminaciones. Esto garantiza la seguridad y conservación de los granos a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Estas prácticas están en concordancia con las recomendaciones establecidas por DICONSA (2008), con el objetivo de asegurar la integridad y calidad de los granos en los procesos de compra-venta y almacenamiento.

Según el "Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por aflatoxinas en el maíz" de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC/RCP 51-2003), existen tres planes de muestreo recomendados para la detección de aflatoxinas en maíz:

1.- Plan de muestreo básico: Este plan se aplica en el punto de recepción de lotes de maíz a granel o en sacos. El tamaño del lote y el número de submuestras a tomar se determinan en función del tamaño del lote y el nivel de confianza deseado. Este enfoque permite inspeccionar los lotes en su etapa inicial y establecer una evaluación preliminar de la presencia de aflatoxinas.

2.- Plan de muestreo intermedio: Este plan se utiliza durante el almacenamiento de los lotes de maíz a granel o en sacos. Aquí, el tamaño del lote y el número de submuestras se determinan considerando el tamaño del lote, el tiempo de almacenamiento y el nivel de confianza requerido. Este enfoque permite monitorear la calidad de los granos durante su permanencia en el almacenamiento, detectando posibles problemas o cambios en la presencia de aflatoxinas.

3.- Plan de muestreo avanzado: Este plan se implementa en lotes de maíz destinados a la exportación o al procesamiento de alimentos de alta calidad. El tamaño del lote y el número de submuestras se determinan en función del tamaño del lote, el nivel de confianza deseado y la tolerancia permitida para la contaminación por aflatoxinas. Este enfoque se utiliza en situaciones donde se requiere un control más riguroso y una garantía adicional de la calidad del maíz, especialmente cuando se destina a mercados internacionales o a la producción de alimentos de alto nivel.

Estos planes de muestreo se basan en las normas internacionales ISO 24333:2009 "Productos alimenticios para animales. Métodos de muestreo y preparación de la muestra" y ISO 15528:2019 "Productos alimenticios. Guía para la selección de planes de muestreo para la inspección por atributos". Su implementación adecuada proporciona un marco confiable para evaluar la presencia de aflatoxinas en los lotes de maíz, garantizando la seguridad y calidad de los productos derivados.

Por su parte, Dowell (2016) propone dos planes diferentes de muestreo:

- Planes tradicionales de muestreo

En el caso de los planes tradicionales de muestreo de aflatoxinas, se sigue un enfoque más exhaustivo y detallado. Se requiere obtener múltiples muestras de gran tamaño de una corriente en movimiento de granos o mediante la extracción de probetas insertadas en el montón de granos. Estas muestras se mezclan minuciosamente y se vuelven a tomar submuestras hasta obtener un tamaño de muestra adecuado para su análisis. El objetivo principal de este método es proporcionar un nivel de confianza en los valores resultantes de aflatoxina que representen fielmente la composición del lote de granos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la cantidad de aflatoxina medida en una muestra específica puede ser mayor o menor que el nivel contenido en todo el lote. Esto se debe a las variaciones inherentes en la distribución de aflatoxinas dentro del lote de granos, para mitigar esta variabilidad, se recomienda obtener muestras repetidamente durante la cosecha y el proceso de manejo de los granos. Este enfoque repetitivo ayuda

a aumentar la confianza en cuanto al nivel promedio de aflatoxina presente en los granos que se están comprando o vendiendo. Al recolectar muestras en diferentes momentos y ubicaciones dentro del lote, se tiene una visión más completa de la distribución de aflatoxinas, lo que permite realizar una evaluación más precisa de la calidad y seguridad de los granos.

- Muestreo de semillas de alto riesgo

Si el objetivo principal del plan de muestreo de aflatoxina es garantizar que el lote de granos no contenga niveles elevados de aflatoxina, existe una estrategia alternativa que puede ser más eficiente. En lugar de realizar un muestreo exhaustivo de todo el lote, se recomienda centrarse en las semillas que tienen más probabilidades de contener aflatoxinas, como aquellas que están dañadas por insectos o enfermedades. Estas semillas suelen ser más pequeñas y suelen concentrar la aflatoxina. En este enfoque, se realiza una selección específica de las semillas sospechosas y se someten a un tamizado o separación para identificar cualquier problema potencial de aflatoxina. Al tamizar la muestra, es posible detectar visualmente las semillas dañadas y determinar si están contaminadas con aflatoxinas. Si no se encuentra aflatoxina en esta fracción de semillas sospechosas, es poco probable que el resto del lote tenga niveles elevados de aflatoxina. Esta estrategia de muestreo de semillas de alto riesgo se basa en la premisa de que las semillas dañadas suelen ser un indicador confiable de la presencia de aflatoxinas en el lote. Al concentrarse en estas semillas problemáticas, se ahorra tiempo y recursos al evitar el muestreo y análisis exhaustivos de todo el lote. Es importante destacar que este enfoque puede ser especialmente útil cuando se trata de lotes de gran tamaño o cuando se requiere una evaluación rápida de la presencia de aflatoxinas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este método no proporciona una estimación precisa de los niveles promedio de aflatoxina en el lote en su totalidad. Por lo tanto, se recomienda complementar este enfoque con un monitoreo regular y

exhaustivo de la calidad y seguridad de los granos a lo largo de la cadena de suministro.

2.4 Antimicrobianos de origen natural

En los últimos años, ha surgido una preocupación creciente entre los consumidores debido al uso excesivo de antimicrobianos sintéticos como conservantes en la industria de alimentos, ya que se ha evidenciado que su consumo en grandes cantidades puede tener efectos negativos para la salud. Por tanto, se ha generado la necesidad de encontrar alternativas que puedan reemplazar a estos antimicrobianos tradicionales y mejorar la aceptación de los productos procesados. En este contexto, se han descubierto nuevos agentes antimicrobianos de origen natural que pueden utilizarse como sustitutos de los convencionales (Nychas, 1995).

La alteración de los alimentos causada por la acción de diversos microorganismos, como bacterias, levaduras y mohos, constituye la principal preocupación en la industria alimentaria. Este problema tiene consecuencias económicas significativas tanto para los fabricantes, en términos de deterioro de las materias primas y los productos elaborados antes de su comercialización, así como pérdida de la reputación de la marca, entre otros aspectos; como también para los distribuidores y consumidores, en relación con la deterioración de los productos una vez adquiridos y antes de su consumo (Matamoros, 1998). Los antimicrobianos o conservantes pueden ejercer al menos tres tipos de acción sobre los microorganismos:

- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos o de la formación de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con una amplia gama de procesos metabólicos esenciales.

Como resultado, existen agentes antimicrobianos que tienen la capacidad de actuar sobre diversos tipos de microorganismos, abarcando un amplio espectro de acción, mientras que otros tienen un efecto más limitado. Además, es importante destacar que algunos antimicrobianos tienen la capacidad de eliminar directamente los

microorganismos, mientras que otros simplemente detienen su crecimiento (Frazier et al., 1993).

Numerosas especias y hierbas exhiben propiedades antimicrobianas, como el apio, cilantro, laurel, almendra, albahaca, café, angélica, puerro, rábano picante, hierbabuena, tomillo, entre otros, que se utilizan en alimentos como agentes saborizantes. Estos ingredientes contienen compuestos derivados del fenol, tanto simples como complejos, que poseen actividad antimicrobiana y son volátiles a temperatura ambiente. Desde tiempos antiguos, se ha reconocido que las especias y sus aceites esenciales tienen diferentes grados de actividad antimicrobiana. De hecho, el primer registro del uso de especias como conservantes se remonta a aproximadamente 1,550 años antes de Cristo, cuando los antiguos egipcios las empleaban para preservar alimentos y en el proceso de embalsamamiento de los difuntos (Davidson, 2001).

Algunas especias tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, aunque su efectividad varía dependiendo del tipo de organismo. En general, se ha observado que las especias son más efectivas contra bacterias Grampositivas que contra bacterias Gramnegativas. Por ejemplo, la canela, el clavo y la mostaza tienen un poder conservante destacado. La pimienta negra/roja y el jengibre presentan una capacidad inhibidora moderada frente a una amplia variedad de microorganismos. Por su parte, la pimienta, el laurel, el cilantro, el comino, el orégano, el romero, la salvia y el tomillo tienen una actividad antimicrobiana intermedia. Estas propiedades conservantes se deben a la presencia de aceites esenciales en su composición, que contienen compuestos como el eugenol o el aldehído cinámico con propiedades antimicrobianas. También se ha observado actividad antimicrobiana en las oleorresinas de estas especias (Rodríguez, 2011).

Los compuestos antimicrobianos de origen natural han demostrado poseer actividad antimicrobiana y antifúngica, pero su aplicación en alimentos se ve limitada debido a sus propiedades fisicoquímicas y la posible interacción con los componentes de los alimentos (Martínez, 2019).

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos extraídos de diferentes partes de las plantas, como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces. Son mezclas complejas de ésteres, aldehídos, cetonas y terpenos. Además, son compuestos con un olor característico, altamente solubles en alcohol y poco solubles en agua. Para obtener estos compuestos se pueden utilizar distintos solventes, como acetato, etanol y cloruro de etileno. Los aceites esenciales derivados de plantas son conocidos por su actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias y hongos. Aunque existen pocos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos o en alimentos reales, se ha observado que su eficacia *in vitro* suele ser mucho mayor que en los propios alimentos (Rodríguez, 2011).

2.4.1 Aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*)

El clavo, cuyo nombre científico es *Syzygium aromaticum* y pertenece a la familia *Myrtaceae*, es originario de la zona tropical de Indonesia. Se cultiva en diversos países como Brasil, China, Guinea, Kenia, Madagascar, Malasia, Mauricio y México, entre algunos otros. Esta planta crece y se desarrolla en suelos ricos en humus arcillosos, así como en suelos característicos de las regiones cálidas, los cuales suelen ser pobres en sílice pero ricos en hierro. Prefiere suelos profundos y sueltos. En el cultivo, el clavo es una planta siempre verde que puede alcanzar grandes alturas que van de los 3 a los 6 metros. El tronco y las ramas principales presentan una corteza característica de aspecto grisáceo y textura lisa, las hojas tienen forma de lanza. Las flores son de color amarillento y poseen un aroma fenólico intenso y un sabor acre. Los botones florales comienzan con un tono pálido y, a medida que maduran, van cambiando de color de verde a marrón oscuro hasta llegar a un tono rojo polvoriento (Singh et al., 2012).

Desde tiempos remotos, se han reconocido las propiedades curativas y calmantes de la hierba en cuestión. El aceite extraído de esta planta ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su alto contenido de eugenol, el cual se ha demostrado eficaz para contrarrestar trastornos digestivos como la diarrea, así como poseer propiedades anti mutagénicas. Además, se destaca por su capacidad

antiséptica, analgésica, antibacteriana, antifúngica, anestésica, anticancerígena, antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria e insecticida (Kueete, 2017).

El aceite esencial de clavo es un líquido que puede ser incoloro o de un tono amarillo-marrón claro. Tiene un aroma distintivo y un sabor picante, siendo soluble en etanol y éter etílico, ligeramente soluble en agua y adquiriendo un color marrón al exponerse al aire o al envejecer (Farmacopea Japonesa, 2001). Debido a su sensibilidad a la luz y al calor, su vida útil de almacenamiento es limitada si no se protege adecuadamente. Una vez obtenido el aceite, se pueden identificar sus componentes mediante diversas técnicas, siendo el análisis mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas el método principal (Nonsee et al., 2011).

La composición del aceite obtenido por arrastre de vapor presenta en su composición al eugenol (83.6%); acetato de eugenilo (11.6%) y cariofileno (4.2%) como componentes mayoritarios, aunque otros autores establecen que estas cantidades pueden variar de la siguiente manera: eugenol 49-87%, cariofileno (4-21%) y acetato de eugenilo (0.5-21%), y adicionan a esta información la presencia en pequeñas cantidades de α -humuleno (Mendoza, 2021).

Según Aguilar et al. (2013), los componentes activos de las especias que exhiben actividad contra los microorganismos suelen ser metabolitos secundarios, como alcaloides y glucósidos, entre otros. En particular, el aceite esencial de clavo ha sido estudiado por su actividad antimicrobiana, y Rahnama et al. (2012) atribuyen esta propiedad a los compuestos fenólicos presentes en el aceite. Se ha observado que a mayor cantidad de compuestos fenólicos en el aceite esencial, mayor es su actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales puede deberse a diferentes mecanismos. Según Nonsee et al. (2011), los compuestos presentes en los aceites esenciales pueden provocar la desnaturalización de proteínas y interactuar con los fosfolípidos de la membrana celular de los microorganismos, alterando su

permeabilidad. Esto puede conducir a la muerte del microorganismo. Cabe destacar que el proceso de extracción utilizado para obtener los aceites esenciales puede influir en su composición y, por lo tanto, en su capacidad para actuar como agentes antimicrobianos.

En el caso específico del aceite esencial de clavo, se ha observado actividad antifúngica contra diversas especies de hongos y levaduras. Por ejemplo, se ha encontrado que es efectivo contra especies de *Candida*, incluyendo *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, especies de *Aspergillus*, hongos asociados a la *Onicomycosis*, *Saccharomyces cerevisiae* y varios dermatofitos. Esta actividad antifúngica se atribuye principalmente al compuesto eugenol presente en el aceite esencial (Aguilar et al., 2013).

En resumen, los componentes activos de las especias, como los aceites esenciales, poseen propiedades antimicrobianas debido a la presencia de metabolitos secundarios. En el caso del aceite esencial de clavo, su actividad antimicrobiana se atribuye a los compuestos fenólicos, como el eugenol, que interactúan con las proteínas y las membranas celulares de los microorganismos. Estas propiedades hacen que el aceite esencial de clavo sea efectivo contra una variedad de hongos y levaduras, incluyendo especies patógenas.

Según Aguilar y su equipo de investigación (2013), se han realizado diversos estudios que demuestran la actividad antifúngica de tres aceites esenciales: tomillo (*Thymus vulgaris*), ajedrea (*Satureja hortensis*) y clavo de olor, contra *A. flavus*. Los resultados obtenidos in vitro indicaron que el aceite esencial de tomillo presentó la mayor actividad antifúngica, seguido por el de ajedrea y el de clavo de olor. Se observó una inhibición completa del crecimiento del hongo con concentraciones de 350 y 500 ppm de tomillo y ajedrea, respectivamente, mientras que el aceite de clavo mostró un porcentaje de inhibición del 87.5% con una concentración de 500 ppm. Además de su evaluación in vitro, la actividad antifúngica del aceite esencial de clavo de olor también ha sido investigada en alimentos, con el objetivo de probar su eficacia como conservante o agente antimicrobiano.

2.4.2 Aceite de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*)

El aceite esencial de árbol de té, obtenido de la destilación de las hojas y ramas frescas del árbol *Melaleuca alternifolia*, es reconocido desde hace mucho tiempo por sus propiedades antimicrobianas. Este árbol es nativo de Australia y ha sido utilizado por los aborígenes Bundjalung de Nueva Gales del Sur para tratar diversas afecciones de salud. Tradicionalmente, las hojas trituradas del árbol de té se utilizaban para tratar la tos, el resfriado y curar heridas, aplicándolas directamente sobre ellas. Además, se preparaban infusiones de hojas para aliviar dolores de garganta y tratar diferentes problemas de la piel; aunque las propiedades del aceite esencial de árbol de té eran conocidas desde hace mucho tiempo, su popularidad aumentó en el primer tercio del siglo pasado, especialmente después de las primeras publicaciones científicas que describían su actividad antimicrobiana (Victores, 2013). Estas publicaciones respaldaron empíricamente las prácticas tradicionales de uso del aceite esencial y despertaron un mayor interés en su potencial terapéutico.

Hoy en día, el aceite esencial de árbol de té se utiliza ampliamente en productos cosméticos y de cuidado personal, así como en productos de limpieza y desinfección. Su eficacia antimicrobiana lo hace útil para tratar afecciones de la piel, como el acné, las infecciones por hongos y las picaduras de insectos. Además, se utiliza en formulaciones para el cuidado oral, productos para el cabello y como desinfectante en el hogar.

En un estudio realizado por Brophy y sus colegas en 1989, se examinaron más de 800 muestras de este aceite utilizando técnicas de cromatografía de gases y cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se identificaron aproximadamente 100 componentes y sus rangos de concentraciones. El aceite está compuesto principalmente por hidrocarburos terpénicos, como monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes y sus asociados. Los terpenos son hidrocarburos volátiles y aromáticos que se pueden considerar como polímeros de isopreno, con la fórmula C_5H_8 . El componente mayoritario es el terpinen-4-ol, un alcohol

monoterpénico que representa más del 30% del aceite y generalmente se encuentra alrededor del 40%, aunque puede alcanzar hasta el 48%.

El aceite de árbol de té es un líquido transparente o ligeramente ámbar con un olor fuerte y característico. Desde 1996, la composición del aceite ha sido regulada por la Organización Internacional de Normalización (ISO4730-2004: Aceite de Melaleuca, tipo terpinen-4-ol, aceite de árbol de té). En los últimos años, su uso como agente antiinfeccioso en diversas afecciones de la piel y mucosas se ha vuelto muy popular (Cabello et al., 2016).

El aceite de árbol de té tiene una densidad relativa de 0.885 a 0.906 y es escasamente soluble en agua pero miscible con disolventes no polares. Se considera que el terpinen-4-ol y el α -terpineol son los compuestos responsables de las actividades antibacterianas y antifúngicas del aceite. Sin embargo, otros componentes como el α -terpineno, el β -pineno y el linalol, aunque se encuentran en proporciones menores, también pueden contribuir a la actividad antimicrobiana (Victores, 2013). La composición del aceite de árbol de té puede cambiar considerablemente durante el almacenamiento, con un aumento en los niveles de cimeno

2.5 Fase de vapor

Estudios recientes han puesto de manifiesto que los vapores generados por los aceites esenciales presentan efectos bactericidas, lo que ha llevado a algunos investigadores a proponer su uso como alternativa para la aplicación de agentes antimicrobianos mediante contacto indirecto. Esto significa que, en lugar de aplicar directamente el aceite esencial sobre la superficie, se utilizarían los vapores que este emite para ejercer su acción antimicrobiana. Este enfoque busca minimizar el impacto en las características sensoriales del producto, al tiempo que garantiza su inocuidad (Reyes, 2012).

En cuanto a la obtención de los aceites esenciales de plantas y especias, se emplean diversos métodos, siendo dos de los más comunes la destilación por arrastre de vapor y la extracción con solventes orgánicos. Ambos métodos requieren un manejo y almacenamiento cuidadoso debido a las propiedades de los aceites

esenciales. Estos líquidos son viscosos, altamente volátiles y sensibles a altas temperaturas, por lo que se deben tomar precauciones para preservar su integridad y calidad durante todo el proceso (Kalemba y Kunicka, 2003).

La composición de los aceites esenciales varía según la parte de la planta de donde se extraen, y como los compuestos volátiles son los que tienen efecto antimicrobiano, es importante determinar su composición. Para este fin, muchos investigadores utilizan la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas. Los componentes principales de los aceites esenciales provienen de terpenoides, sesquiterpenos y posiblemente diterpenos, que contienen diversos grupos químicos, como hidrocarburos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres y cetonas. La composición principal de cada aceite esencial se deriva de su grupo químico funcional. Los componentes fenólicos son los que principalmente brindan propiedades antimicrobianas a los aceites esenciales. Los componentes principales pueden representar hasta el 85% de la composición total del aceite esencial, mientras que otros pueden estar presentes solo en pequeñas cantidades. (Reyes et al., 2012).

2.5.1 Mecanismo de acción del aceite esencial por fase de vapor

Cada aceite esencial posee un efecto antimicrobiano único, por lo que su actividad puede ser evaluada mediante diferentes parámetros. Uno de ellos es la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que se refiere a la concentración mínima requerida del aceite esencial para detener el crecimiento del microorganismo. Esta propiedad bacteriostática o fungistática indica la capacidad de frenar el crecimiento sin necesariamente causar la muerte del microorganismo (Smith-Palmer, et al., 1998). Otro parámetro de evaluación es la Concentración Mínima Letal (CML), que asegura una reducción del 99.9% de la población del microorganismo. Esta concentración mínima letal indica la capacidad bactericida o fungicida del aceite esencial, es decir, su capacidad de causar la muerte del microorganismo (Burt, 2004).

Además, la actividad de los aceites esenciales contra los mohos también puede ser evaluada mediante el control de la inhibición de la esporulación y la producción de

toxinas. Esto implica verificar si el aceite esencial tiene la capacidad de prevenir la formación de esporas y la producción de sustancias tóxicas por parte de los hongos (Kalemba y Kunicka, 2003).

Se han realizado diversos estudios para investigar las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales, principalmente examinando su efecto directo sobre varios microorganismos. Sin embargo, también se ha observado que los aceites esenciales pueden mostrar actividad antimicrobiana en forma de vapor, lo que sugiere que pueden actuar como agentes bioactivos sin necesidad de contacto directo. Se ha observado que la fase de vapor es especialmente eficaz contra los hongos, y varios estudios han demostrado que los aceites esenciales son más efectivos como antifúngicos en estado de vapor que en estado líquido. Una posible explicación de este fenómeno es que las moléculas lipofílicas responsables de parte de la actividad antimicrobiana podrían asociarse en la fase acuosa para formar micelas, lo que suprimiría su capacidad de unión al organismo. Por otro lado, la fase de vapor permitiría la unión libre de los componentes del aceite esencial. Además, las cepas de hongos tienden a crecer más en la superficie del agar en comparación con las bacterias, lo que significa que estarían más expuestas al vapor, mientras que las bacterias se verían más afectadas por los componentes del aceite esencial que se acumularon en el sustrato (Puškárová et al., 2017).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales depende de tres factores: su hidrofobicidad o hidrofiliidad, su composición química y el tipo de microorganismo a combatir. Sus componentes también pueden interferir con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Reyes et al., 2013).

Cuando la cantidad de bacterias alcanza un número suficiente, los individuos liberan moléculas señalizadoras que permiten que la colonia funcione como un grupo, expresando ciertos genes. A este proceso de comunicación se le conoce como "quorum sensing", y a través de él, las colonias bacterianas pueden realizar las siguientes acciones:

- Formar biofilms.
- Adquirir virulencia y secretar toxinas.

- Acelerar su crecimiento.
- Penetrar la barrera intestinal y entrar en el torrente sanguíneo.

Se ha demostrado que muchos aceites esenciales (como el ajo, la mejorana, el orégano, el laurel, el romero, el tomillo, la albahaca, el árbol de té, la cúrcuma, la vainilla, entre otros) interfieren con el quorum sensing bacteriano a concentraciones mucho más bajas que las necesarias para eliminar las bacterias por completo (PlusVet, 2021).

A concentraciones elevadas, ciertos aceites esenciales tienen actividad bactericida, lo que significa que eliminan por completo a las bacterias. Esto se debe a varios mecanismos de acción:

- Toxicidad en la pared celular.

Este es el mecanismo de acción más conocido. Los aceites esenciales tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular, perturbando las estructuras celulares y llevando a la desnaturalización de las proteínas y la destrucción de la membrana celular. Esto hace que las membranas sean más permeables, lo que resulta en rupturas o fugas citoplásmicas, lisis celular y, finalmente, la muerte del microorganismo (Reyes et al., 2013).

- Acción sobre la síntesis de proteínas.

Los diferentes componentes de los aceites esenciales alteran el sistema celular de síntesis de proteínas. Por ejemplo, los compuestos activos presentes en el aceite de canela pueden inhibir la reproducción de *Bacillus cereus* al interferir en la síntesis de ciertas proteínas (PlusVet, 2021).

- Reducción de los niveles intracelulares de ATP.

El trifosfato de adenosina (ATP) es la "moneda molecular" de transferencia de energía en las células y es vital para el metabolismo. Algunas moléculas presentes en los aceites esenciales, como el eugenol, el cinamaldehído y el carvacrol, pueden inhibir las enzimas que producen ATP, lo que altera el metabolismo bacteriano (PlusVet, 2021).

- Reducción del pH intracelular.

Algunos aceites esenciales, como el orégano, la mostaza o la canela china, reducen significativamente el pH dentro de las células bacterianas, lo que interfiere con procesos celulares cruciales como la transcripción de ADN, la síntesis de proteínas y la actividad enzimática (PlusVet, 2021).

2.5.2 Técnica fase de vapor

La producción de vapores de aceites esenciales implica generar una atmósfera con una temperatura específica o crear un microambiente utilizando los propios aceites (López et al., 2005). Aunque no hay un método estándar para evaluar de forma detallada la inhibición microbiana mediante el contacto con los vapores de aceites esenciales, la literatura sugiere enfoques "caseros" que se destacan, como:

1.- Uso de cajas invertidas: Se coloca agar inoculado con el microorganismo de prueba separado (aproximadamente 5 mm) de los aceites esenciales (previamente disueltos en acetato de etilo u otro solvente) sobre un papel filtro, manteniendo la temperatura controlada. Este método se utiliza principalmente para bacterias, que tienen un crecimiento más rápido que los mohos (Inouye et al., 2001).

2.- Creación de una atmósfera mediante aceites esenciales: Se utilizan cámaras de plástico (aproximadamente de 1-1.7 litros) con tapa transparente y selladas herméticamente. En el centro de la cámara se coloca una concentración determinada de aceite esencial, mientras que en una rejilla se colocan los agar inoculados. Las cámaras se mantienen a una temperatura controlada estándar de 25 °C durante 72 horas para mohos (Suhr y Nielsen, 2003; Gómez-Sánchez et al., 2011) y 37 °C durante 18-24 horas para bacterias (Kloucek et al., 2011). De esta manera, los vapores generados por los aceites esenciales entran en contacto con los microorganismos, lo que puede resultar en zonas de inhibición debido a su evaporación en el microambiente. Este método se utiliza principalmente para mohos, que tienen un crecimiento más lento (Reyes et al., 2012).

3. Justificación

Desde tiempos remotos, la medicina tradicional ha confiado en el uso de plantas debido a sus componentes, los cuales tienen efectos de gran importancia y en su mayoría beneficiosos para los seres humanos. El conocimiento sobre el uso y los efectos de ciertas especies ha sido limitado en diversos campos, como es el caso de la industria alimentaria.

A nivel global, se puede observar una creciente tendencia en los últimos años hacia el consumo de alimentos naturales, seguros y de alta calidad. Además, numerosas investigaciones han explorado el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales extraídos de plantas y especias. En este sentido, el control de microorganismos mediante el uso de aceites esenciales se ha convertido en un área de investigación crucial, con el objetivo de reemplazar conservantes sintéticos por alternativas naturales que proporcionen productos seguros y asequibles. Esto implica buscar un proceso adecuado a nivel industrial, que sea económico y efectivo.

Con base en lo mencionado, el propósito de este proyecto es utilizar un tratamiento alternativo y menos complejo basado en la aplicación de compuestos naturales para eliminar patógenos en un alimento de gran relevancia a nivel mundial: el maíz. Los aceites esenciales exhiben una actividad antimicrobiana significativa en contacto directo, pero pueden alterar ciertas características organolépticas de los productos. Por lo tanto, como solución a esta problemática, se propone una exposición indirecta a través de la fase de vapor de aceites esenciales de clavo y árbol de té contra *A. flavus*.

En resumen, se busca utilizar los beneficios de los aceites esenciales de manera efectiva y segura para combatir los patógenos en el maíz, permitiendo así ofrecer alimentos más seguros y de alta calidad a nivel industrial.

4. Objetivos

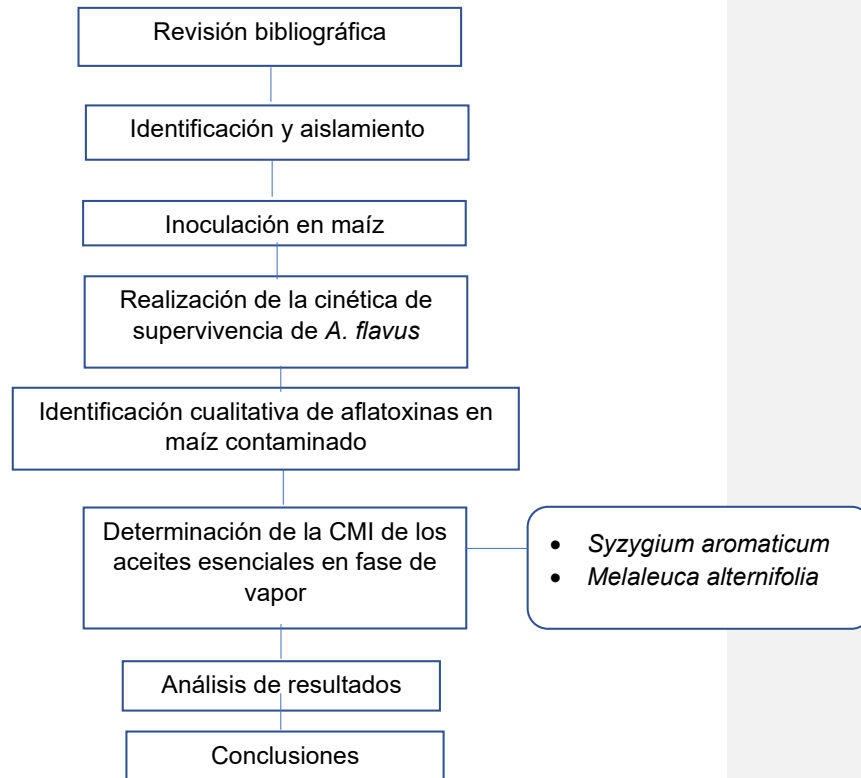
4.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia antifúngica de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en fase de vapor contra *Aspergillus flavus* en maíz criollo (*Zea mays*).

4.2 Objetivos particulares

- Cuantificar el crecimiento fúngico de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) a temperatura ambiente.
- Identificar de forma cualitativa la presencia de aflatoxinas de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) contaminado.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) para la inhibición de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) por fase de vapor.

5. Diagrama general de trabajo



6. Materiales y métodos

Aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) y aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*).

6.1 Material biológico

La cepa utilizada, fue proporcionada por el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP (*Aspergillus flavus* 36 28921) La cepa fue inoculada en placas Petri de vidrio con agar papa dextrosa para mantener viable al hongo.

6.2 Preparación del inóculo

A. flavus fue inoculado en agar papa dextrosa e incubado a 37°C por 120 h, después de ese lapso, se vertieron 10 ml de agua destilada sobre el hongo y con asa micológica se raspó para obtener una suspensión de esporas. Posteriormente, se añadieron 50 µl de esta suspensión en 1 g de arena estéril que funcionó como vehículo para la inoculación en maíz.

6.3 Material de vidrio y reactivos de grado analítico

Los necesarios para cada determinación.

6.4 Métodos y equipos

Los mencionados en la Tabla 1 y Tabla 2 respectivamente

Tabla 1. Métodos utilizados en el proyecto

Método	Técnica	Referencia
Método para la cuenta de mohos y levaduras en placa	Conteo en placa	NOM-111-SSA1-1994 - DOF
Método para la determinación cualitativa de aflatoxinas	Óptico	Norma Venezolana COVENIN 1935-87, 2017.
Fase de vapor	Adsorción	Reyes-Jurado, et al., 2012.
Método de vertido en placa	Diluciones seriadas	NOM-111-SSA1-1994 - DOF
Método recuento de esporas en cámara de Neubauer	Conteo en cámara	Bustillo Pardey, 2010.

Tabla 2. Equipos utilizados en el proyecto.

Equipo	Marca	Modelo
Estufa de cultivos EFC-51 convección mecánica	BG	ECF-51
Microscopio	ZEISS	Primo Star
Bascula	Ohaus	Scout Pro-202
Micropipeta ajustable 100-1000 µl	Continental lab products	Beta Pette
Micropipeta ajustable 20-200 µl	SCIENCE MED	KE0026531
Autoclave	Presto	
Super mixer	Lab line instruments, inc.	SM No. 1290
Cámara de Neubauer	Baluue	
Lámpara de luz UV	UVP	UVLS.28

7. Metodología

7.1 Realización de cinética de supervivencia de *A. flavus* en maíz

Se inoculó *A. flavus* en agar papa dextrosa por 7 días a 25° C. Una vez se obtuvo crecimiento en la placa, se tomó el hongo y se mezcló con 10 ml de agua destilada para obtener una suspensión de esporas, de la cual, se colocó una muestra en cámara de Neubauer y se realizó el conteo. Se inoculó aproximadamente 10^6 esporas/ml (50 μ l) en 1 g de arena estéril y se homogenizó. Posteriormente se inoculó el hongo en el maíz estéril haciendo uso de la arena contaminada. El maíz contaminado se incubó a temperatura ambiente y se tomaron muestras por dilución seriada y vertido en placa al tiempo 0, 7, 14 y 21 días.

7.2 Identificación cualitativa de aflatoxinas en maíz contaminado

Una vez terminada la cinética del comportamiento del hongo, se observó bajo lámpara de luz negra el maíz contaminado, haciendo uso de una lámpara de luz ultravioleta de onda larga (aproximadamente 365 nm). Se inocularon placas como lo indica el punto 7.1 (manejando un control y las diferentes concentraciones) y al día 20, se hizo incidir luz ultravioleta sobre los granos, por 4 minutos, los granos de maíz se cambiaron de posición a medida que se hacía incidir la luz sobre ellos.

7.3 Determinación de la CMI de los aceites esenciales en fase de vapor

Para la tercera etapa, en una caja Petri de vidrio de 100 x10 mm, se colocó dentro la tapa de una caja Petri pequeña desechable de 60 x15 mm, que contuvo el maíz previamente contaminado (usando la misma técnica que en la primera etapa). Junto a esta, se colocó un rectángulo de papel de lenta filtración grado 609 (poro de 20 micras) dónde se pipeteó el aceite esencial. Este proceso se realizó con cada aceite esencial a una concentración baja (125 μ l), media (250 μ l), alta (500 μ l) y muy alta (750. μ l).

7.4 Análisis de datos

La variable para correlacionar en la primera y tercera etapa del proyecto fue el crecimiento del hongo en UFC/g. Para obtener una visión integral del comportamiento de la variable ya mencionada se realizó una tabla tiempo vs concentración de aceite esencial, a partir de esta tabla creada para ambos aceites

esenciales, se obtuvieron los respectivos logaritmos, promedios y desviaciones estándar de los datos generados en los experimentos.

Posteriormente, haciendo uso de un software para análisis de datos: KaleidaGraph (Versión 3.51, Synergy Software, Reading PA, USA), los datos se ajustaron a la distribución de Weibull (Ávila et al., 2013).

$$\log_{10} S t = -b t^n$$

La función de supervivencia $S(t)$ representa la probabilidad de que un componente o sistema sobreviva más allá de un tiempo (t) dado. En otras palabras, $S(t)$ es la probabilidad de que el componente o sistema no falle antes del tiempo dado.

El parámetro b se conoce como el parámetro de escala, ya que determina la ubicación de la curva de la distribución de Weibull en el tiempo. Un valor más alto de b indica que el tiempo medio hasta la falla es mayor.

El parámetro n se conoce como el parámetro de forma, ya que determina la forma de la curva de la distribución de Weibull. Si n es mayor que 1, la tasa de falla aumenta con el tiempo. Si n es menor que 1, la tasa de falla disminuye con el tiempo. Si n es igual a 1, la tasa de falla es constante con el tiempo.

Esta ecuación se utiliza a menudo para ajustar los datos de supervivencia a la distribución de Weibull y estimar los parámetros b y n . Esto se hace típicamente mediante el uso de técnicas de regresión no lineal para encontrar los valores de b y n que mejor se ajusten a los datos de supervivencia observados.

Se obtuvieron valores para cada dato experimental, donde entonces “ b ” es igual a la velocidad de muerte del hongo, “ n ” es igual al comportamiento de la curva generada y “ r ” es igual al coeficiente de correlación

8. Resultados y discusión

8.1 Etapa experimental 1. **Realización de la cinética de supervivencia de *A. flavus***

Los resultados obtenidos para medir el crecimiento de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) se encuentran representados en la Figura 4, donde se visualiza la comparación de una curva de ajuste obtenida a partir de la iteración de datos y una curva generada con los datos obtenidos experimentalmente, donde el comportamiento del hongo está expresado como un aumento en el crecimiento seguido de un descenso radical que puede ser atribuido a las condiciones deficientes que se manejaron para su crecimiento en maíz criollo (*Zea mays*).

Un experimento realizado por Carrillo (2003) en donde evalúa el efecto de la temperatura y el pH sobre el crecimiento de *A. flavus*, este, indica que la colonización de los granos durante el almacenamiento se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente se eleva por sobre el 70%. Compara tres temperaturas de crecimiento: 25°, 30° y 37° C, obteniendo un crecimiento óptimo en un rango de 35° - 37°.

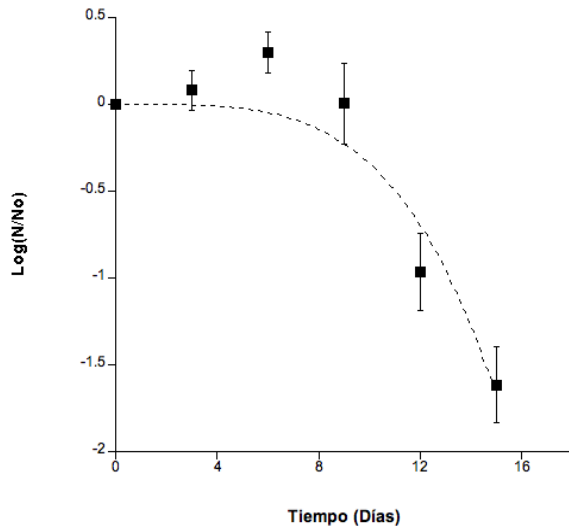


Figura 4 Comportamiento de *Aspergillus flavus* inoculado en maíz criollo (*Zea mays*) durante 15 días a 25° C de almacenamiento.

8.2 Etapa experimental 3 Determinación de la CMI de los aceites esenciales en fase de vapor

En la Figura 5, se puede observar el comportamiento de *A. flavus* inoculado en maíz criollo (*Zea mays*) expuesto a diferentes concentraciones de aceite esencial de A) clavo y B) árbol de té, teniendo como referencia la cepa control. La línea punteada que se muestra en cada gráfico es una representación del ajuste matemático realizado para los datos experimentales. Esta línea ajustada se utiliza para determinar la tendencia general de los datos experimentales. A menudo, los datos experimentales pueden tener cierta variabilidad o ruido, la línea ajustada se utiliza para eliminar este ruido y obtener una representación más clara de los datos.

En ambos gráficos, la línea de ajuste representa la tendencia general del crecimiento del hongo en cada concentración de aceite utilizado. Por lo tanto, se puede utilizar para determinar cómo debería cambiar el crecimiento del hongo a medida que cambia la concentración de aceite. Las figuras presentes en los gráficos son los datos reales que se obtuvieron durante el experimento. Por lo tanto, se

pueden utilizar para evaluar la precisión del ajuste matemático y para determinar si hay alguna variabilidad significativa en los datos experimentales.

La curva correspondiente a la mayor concentración de aceites (750 µl) muestra una tendencia a la disminución del crecimiento del hongo en comparación con las curvas de las concentraciones más bajas. Además, la disminución en la tasa de crecimiento del hongo es más rápida y marcada en esta curva de mayor concentración de ambos aceites, lo que sugiere que esta concentración tiene un efecto inhibitorio más fuerte sobre el crecimiento del hongo en comparación con las concentraciones más bajas.

Se observa como el crecimiento en el control, es similar a la obtenida en la etapa experimental 1, mientras que el crecimiento en las demás placas es indirectamente proporcional al aumento de la concentración del aceite en función del tiempo.

Las cinéticas presentadas, se evalúan como una medida de la biomasa del hongo a una escala logarítmica en el eje vertical, mientras que el tiempo se representa en el eje horizontal. En resumen, el crecimiento del hongo varía a lo largo del tiempo dependiendo de la concentración de aceite a la que está expuesto y en general, se observa que a medida que aumenta la concentración de aceite, el crecimiento del hongo disminuye. Esto se debe a que los aceites esenciales utilizados tienen propiedades antifúngicas y pudieron afectar la capacidad del hongo para crecer y reproducirse. Sin embargo, también se observa en las concentraciones bajas, que después de un cierto tiempo, el crecimiento del hongo se recupera en cierta medida. Esto podría indicar que el hongo puede adaptarse o desarrollar resistencia al aceite de clavo después de un cierto tiempo.

Un estudio realizado en 2016 por Matej Bozik donde él y sus colaboradores evaluaron las actividades antifúngicas en fase de vapor de los aceites esenciales de: hojas de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), clavo (*Syzygium aromaticum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) y jengibre (*Zingiber officinale* Rosc) frente a cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. clavatus* aisladas de avena cada uno utilizando concentraciones finales de 125, 250 y 500 µl/l y haciendo uso de la misma técnica utilizada en el presente proyecto. Las cajas de Petri se

Comentado [VLO2]: Repetido, et al y colaboradores es lo mismo

cerraron y se dejaron a 50 °C durante 2 horas, seguidas de 20 min a temperatura ambiente.

El efecto fungicida de los aceites esenciales ensayados se evaluó tres días después del tratamiento, utilizando dos parámetros: el porcentaje de semillas con crecimiento micelial y el porcentaje de semillas con crecimiento micelial con esporulación. Los aceites esenciales de limoncillo, orégano y tomillo mostraron el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Entre las cepas probadas, *A. clavatus* fue considerablemente la más resistente, seguida de *A. parasiticus* y *A. flavus*. Se observaron diferencias significativas del efecto inhibitorio entre todas las concentraciones de aceites esenciales en general, siendo la concentración de 500 µl/l la más efectiva. Los aceites esenciales a una concentración de 125 µl/l fueron los menos efectivos. Las más efectivas fueron las concentraciones más altas de limoncillo, orégano y tomillo (500 µl/l), y la concentración moderada de limoncillo (250 µl/l). Por otro lado, la concentración más baja de aceites esenciales de jengibre y clavo fue significativamente menos efectiva, con un efecto comparable al de los controles.

También evaluaron el efecto de los aceites esenciales sobre la esporulación de las cepas probadas obteniendo que los aceites esenciales de limoncillo, orégano y tomillo mostraron el efecto inhibitor más fuerte sobre la esporulación de *A. flavus* y *A. parasiticus*. *A. clavatus* fue nuevamente la más resistente de las cepas probadas. El limoncillo y el orégano a una concentración de 500 µl/l fueron capaces de inhibir completamente la esporulación. En la misma concentración, el tomillo y el clavo inhibieron más del 90% de la esporulación. Se observaron efectos inhibitorios moderados para todos los aceites esenciales a una concentración de 250 µl/l, y el limoncillo también fue efectivo a una concentración de 125 µl/l. Sin embargo, la mayoría de los aceites esenciales probados a una concentración de 125 µl/l no fueron efectivos.

Comparando resultados con el experimento ya mencionado, podemos decir que la efectividad contra la inhibición y por lo tanto esporulación del hongo, fue comparable en todos los experimentos, con excepción de la concentración más baja manejada

(125 μ l) de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*).

Según lo reportado por Cisarová y su equipo en 2016, los aceites esenciales de clavo, tomillo y orégano demostraron una eficacia significativa haciendo uso del método de micro atmósfera, con dosis inhibitorias mínimas de 31,5 a 62,5 μ l/l de aire. Con base en lo anterior, se puede considerar una variación en las dosis inhibitorias mínimas reportadas debido a la utilización de diferentes métodos de evaluación de actividad antifúngica en fase gaseosa, así como la variación en los tipos de mohos y aceites esenciales estudiados.

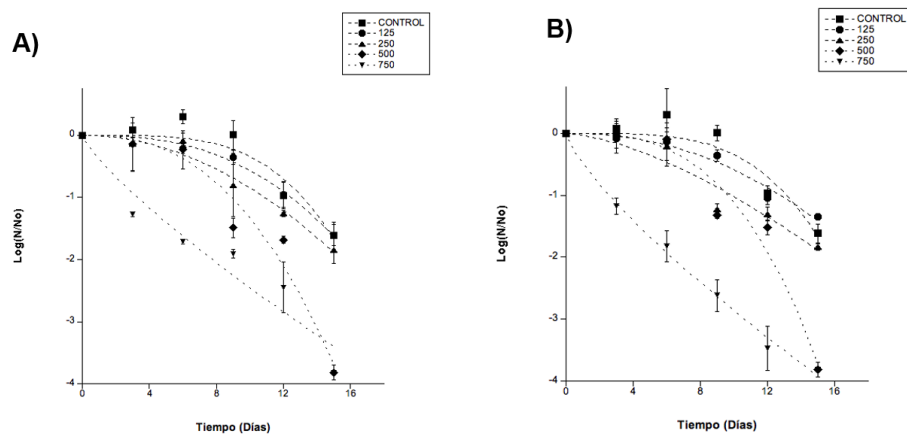


Figura 5 Inhibición de *Aspergillus flavus* inoculado en maíz criollo (*Zea mays*) por 15 días a 25° C con diferentes concentraciones de aceites esenciales (μ l/litro de aire) de A) clavo (*Syzygium aromaticum*) y B) árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) por contacto en fase de vapor.

A partir de la Tabla 3, se puede comparar de forma numeral la velocidad de muerte de *A. flavus* que va en aumento junto con el mismo de la concentración de aceite esencial utilizado, siendo las últimas dos concentraciones (500 y 750 μ l) las que marcan una diferencia en cuanto al tiempo requerido para la inhibición del hongo. En ambos casos, los valores de “b” se ven reducidos conforme aumenta la concentración, esto quiere decir que es menor el tiempo en el que el hongo perece; todos los valores de “n” son mayores a uno lo que indica el comportamiento

cóncavo de todas las curvas con excepción de la generada en la concentración de 750 μl para ambos aceites, las cuáles son convexas puesto que en ambas n es menor a uno; los valores de " r " son altos, esto significa que los datos experimentales se adaptan a la curva de ajuste por lo que se sugiere que los resultados obtenidos son confiables y que las concentraciones de aceite utilizadas en el experimento tuvieron un efecto significativo en la inhibición del crecimiento de *A. flavus*.

Tabla 3 Resultados del análisis de datos experimentales obtenidos para aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) y aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*)

Aceite	Clavo			Árbol de té		
	b	n	r	b	n	r
Concentración (µl)						
Control	0.0000	3.9408	0.9541	0.0000	3.9408	0.9541
125	0.0014	2.6072	0.9943	0.0039	2.1774	0.9846
250	0.0087	1.9854	0.9875	0.0304	1.5258	0.9631
500	0.0043	2.4980	0.9770	0.0013	2.9469	0.9792
750	0.0382	0.8067	0.9637	0.4812	0.7741	0.9974

En su investigación titulada "Análisis in vitro de la actividad biológica del aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*) frente a *A. flavus*, Uguña D. (2019) expuso el hongo a una variante en la técnica de fase de vapor utilizando cajas invertidas y cuantificó su crecimiento mediante el método de cultivo dual. Los resultados obtenidos fueron significativos en cuanto al efecto del aceite de clavo (*S. aromaticum*) en el crecimiento de las diversas cepas de *A. flavus* utilizadas en el experimento. Esto se corroboró al comparar el crecimiento de las cepas expuestas a los aceites esenciales con el crecimiento de las cepas de control que no fueron sometidas a ningún aceite esencial que pudiera afectar su desarrollo. Se observó un crecimiento considerable en estas últimas, mientras que las cepas expuestas al aceite de clavo mostraron un porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo que osciló entre el 61% y el 76%.

Estos porcentajes de inhibición del crecimiento fueron utilizados para evaluar la eficacia de los dos aceites esenciales utilizados en el experimento. El aceite de clavo (*S. aromaticum*) recibió una valoración de nivel III, lo que indica que presenta un control biológico satisfactorio sobre *A. flavus*.

8.3 Etapa experimental 2. Identificación cualitativa de aflatoxinas en maíz criollo

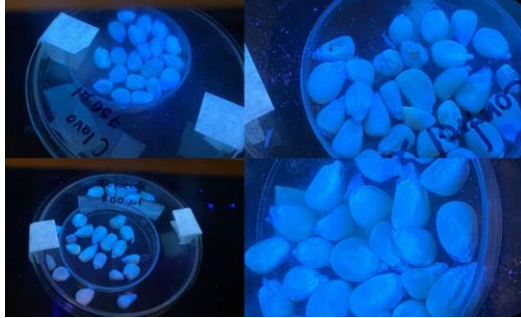


Figura 6 Identificación cualitativa de aflatoxinas en maíz criollo (*Zea mays*) contaminado con *Aspergillus flavus* por el método de exposición a luz UV.

Como se observa en la Figura 6, ninguna caja expuesta presentó fluorescencia, esto puede ser debido a que el hongo se encuentra sometido a condiciones de estrés. Según la bibliografía consultada anteriormente, la inoculación de *A. flavus* en maíz no siempre conduce a la producción de micotoxinas, esta producción depende de varios factores, como la cantidad de esporas inoculadas, las condiciones ambientales y las características del maíz. Si las condiciones no son adecuadas para la producción de micotoxinas, la inoculación de *A. flavus* puede no dar lugar a la producción de micotoxinas.

En un estudio reciente llevado a cabo por Martínez (2014), se evaluaron cuatro métodos como técnicas rápidas para la detección de aflatoxinas en muestras de maíz y sus derivados en una empresa dedicada a la fabricación de productos a base de cereales y leguminosas para consumo humano y animal. El objetivo era seleccionar el procedimiento más apropiado para el análisis en diferentes etapas del procesamiento, incluyendo el método Fluorométrico (Lámpara Negra), Reveal, RidaQuick y Veratox/ELISA.

Las muestras analizadas se obtuvieron de diversas áreas, como la de materia prima (maíz amarillo y maíz blanco), área de proceso (subproducto de maíz y harina de proceso), área de almacenamiento y área de producto terminado (harina precocida). Los resultados revelaron que el método Fluorométrico arrojó 39 muestras positivas (27,08%), el método Reveal mostró 42 muestras positivas (29,16%), RidaQuick

detectó 26 muestras positivas (18,05%) y el método Veratox/ELISA identificó 18 muestras positivas (12,5%). Estas muestras positivas fueron verificadas posteriormente mediante HPLC, que reveló un total de 3 muestras positivas (2,08%).

Con base a estos resultados, se concluyó que ninguno de los métodos rápidos utilizados pudo indicar de manera confiable la presencia del hongo, siendo el HPLC el método de análisis más eficaz para identificar este contaminante.

Sin embargo, se observó que las técnicas más avanzadas presentaban ciertos inconvenientes, como la variabilidad de la muestra durante el proceso de muestreo, así como la falta de precisión y exactitud. Por lo tanto, se plantea la necesidad de incorporar un método confirmatorio que pueda evaluar de manera precisa la presencia o ausencia de aflatoxinas. Se sugiere adoptar un enfoque integrado que combine métodos de detección rápida con métodos analíticos y confirmatorios, a fin de lograr una detección confiable de este contaminante en alimentos.

En un estudio realizado por Reátegui (2012), se llevaron a cabo experimentos para identificar la fluorescencia emitida por las Castañas de Brasil. Para este fin, se utilizó un Espectrómetro EstelarNet Black-Comet C (190-850 nm), una fuente de luz ultravioleta SL1-LED de 390 nm, lámparas portátiles de luz ultravioleta de 365 nm y 254 nm, una fibra óptica F1000-UVVis-SR-1, y el software SpectraWiz para la detección del espectro y el entorno gráfico basado en Labview 2012.

Los ensayos para el control del Sistema de Detección de la contaminación en las castañas se llevaron a cabo después de ensamblar el sistema de detección óptica del espectrómetro SpectraWiz y el software LabView proporcionado por el fabricante. En este proceso, se empleó un sistema óptico compuesto por el espectrómetro, la fibra óptica como sensor y el software de adquisición de información.

El sistema implementado permitió diferenciar entre castañas afectadas por aflatoxinas y castañas sanas al seleccionar las castañas peladas. De esta manera, se pudo comprobar la relación existente entre la emisión fluorescente producida por

los fitoquímicos alterados debido a la presencia de aflatoxinas y la emisión de las nueces cuyos componentes no han experimentado ningún cambio.

En resumen, existen varias posibles explicaciones por las cuales el maíz inoculado con *A. flavus* no emitió fluorescencia al ser expuesto a la luz UV. A continuación, se detallan y amplían estas explicaciones:

- **Tiempo de incubación:** Las aflatoxinas se producen después de un período de incubación en el cual el hongo *A. flavus* tiene la oportunidad de crecer y generar las toxinas. Es posible que el tiempo de incubación utilizado en el experimento no haya sido suficiente para que las aflatoxinas se produzcan en cantidades detectables mediante la luz UV. La producción de aflatoxinas está influenciada por factores como la temperatura, la humedad y la disponibilidad de nutrientes en el sustrato. Si las condiciones no fueron óptimas para el crecimiento y la producción de aflatoxinas, es posible que la emisión de fluorescencia no se haya manifestado.
- **Concentración de aflatoxinas:** La cantidad de aflatoxinas producidas por el hongo puede variar según las condiciones de crecimiento. Si la concentración de aflatoxinas generada fue demasiado baja, es posible que no haya sido suficiente para ser detectada mediante la luz UV. Las condiciones ambientales, la presencia de otros compuestos en el sustrato y la competencia con otros microorganismos pueden influir en la producción de aflatoxinas. En algunos casos, puede ser necesario emplear técnicas de detección más sensibles o realizar análisis cuantitativos para detectar concentraciones bajas de aflatoxinas.
- **Método de detección:** La selección y aplicación correcta del método de detección es fundamental para la detección de aflatoxinas mediante la luz UV. Existen diferentes técnicas y protocolos disponibles, como el uso de lámparas de luz UV de diferentes longitudes de onda, la preparación adecuada de las muestras y la interpretación de los resultados. Si el método de detección utilizado no fue apropiado o no se siguieron las instrucciones correctamente, es posible que las aflatoxinas no se hayan detectado. Es

importante asegurarse de utilizar un método validado y seguir los pasos y condiciones adecuados para garantizar la precisión y fiabilidad de los resultados.

9. Conclusiones

- Se cuantificó el comportamiento de supervivencia de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) a temperatura ambiente por 15 días bajo condiciones deficientes de humedad.
- Se concluye que ambos aceites esenciales tienen efectos inhibidores contra *A. flavus*, lo que indica que podrían ser potencialmente útiles como agentes antifúngicos.
- Se determinó la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) para la inhibición de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) por fase de vapor, siendo 750 µl la concentración con mayor efecto antifúngico.
- Se comprobó que el método cualitativo de luz UV para detectar la presencia de aflatoxinas de *A. flavus* en maíz criollo (*Zea mays*) contaminado, es una técnica rápida y no destructiva, aunque no tan confiable puesto que no hubo obtención de resultados significativos.

10. Recomendaciones

Se recomienda para estudios posteriores:

- Ampliar la duración de las cinéticas: Se sugiere extender el tiempo de estudio para obtener cinéticas más completas y comprender mejor los efectos de los factores de estrés en diferentes etapas del proceso. Esto permitirá analizar la evolución de los microorganismos a lo largo del tiempo y obtener resultados más representativos.
- Investigar otros microorganismos y factores de estrés: Es recomendable ampliar la investigación para incluir otros microorganismos relevantes y evaluar cómo diferentes factores de estrés, como el pH, la actividad de agua, la temperatura y los agentes antimicrobianos, afectan su crecimiento y supervivencia. Esto proporcionará una visión más completa de los efectos de los factores ambientales en la seguridad de los alimentos.
- Simular condiciones reales de contaminación: Es importante replicar las condiciones reales en las que los alimentos están expuestos a la contaminación. Esto implica crear ambientes de prueba que imiten las etapas del procesamiento y almacenamiento de los alimentos. Al hacerlo, se obtendrán resultados más relevantes y aplicables a la vida real.
- Estudiar la combinación de aceites esenciales en alimentos específicos: Es recomendable investigar el efecto de la combinación de diferentes aceites esenciales en alimentos de interés, como frutas cortadas, carnes sazonadas, panes saborizados, entre otros. Esto permitirá identificar sinergias y potenciales efectos antimicrobianos más robustos en estos alimentos.
- Utilizar técnicas confirmatorias y controles positivos: Para mejorar la validez y la comparabilidad de los resultados, se sugiere utilizar técnicas confirmatorias adicionales para la detección de aflatoxinas. Estas técnicas pueden incluir métodos analíticos más sensibles y específicos, como cromatografía de alta resolución, espectrometría de masas u otras técnicas validadas. Además, el uso

de controles positivos permitirá establecer puntos de referencia y comparar los resultados obtenidos.

Implementar estas recomendaciones en futuras investigaciones contribuirá a obtener resultados más sólidos y relevantes en el estudio de los microorganismos, los factores de estrés y la detección de contaminantes en los alimentos.

11. Bibliografía

- Aguilar, Ana & López, Aurelio (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. Recuperado el 27 de octubre del 2022, de <https://ellegadodenewton.files.wordpress.com/2019/10/art2013-extractos-y-aceite-de-clavo-de-olor-como-antibacterial-en-alimentos-pend.pdf>
- Ávila, S. R., Aguilar, A. P., Cigarroa Z. J., Gastélum, R. G., Vera, L. O. & Navarro, C. A., (2013). Weibull's distribution application on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* survival evaluation. Recuperado el 10 de abril del 2023, de <https://revistaciencia.uat.edu.mx/index.php/CienciaUAT/article/view/18/21>
- Bogantes, P., Bogantes, D. & Bogantes, S. (2004). Aflatoxinas revisión. Recuperado el 27 de octubre del 2022, de <https://www.redalyc.org/pdf/434/43446404.pdf>
- Bolet Astoviza, Miriam, & Socarrás Suárez, Matilde. (2005). Micotoxinas y cáncer. Recuperado en 02 de julio de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002005000100007&lng=es&tlng=es.
- Božik, M., Císarová, M., Tančinová, D., Kouřimská, L., Hleba, L., & Klouček, P. (2017). Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. Recuperado el 28 de octubre del 2022, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092666901630807X>
- Brophy, J. J., Davies, N. W., Southwell, I. A., Stiff, I. A., & Williams, L. R.. (1989). Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen4-ol* type (Australian tea tree). Recuperado el 7 de febrero del 2023, de https://www.researchgate.net/publication/231547080_Gas_chromatographic_quality_control_for_oil_of_Melaleuca_Terpinen_4ol_Type_Australian_Tea_Tree

Comentado [VLO3]: Las referencias no tienen el mismo formato, algunas están por nombres, otras tienen paréntesis en los años, otras no aparecen, algunas tienen errores en los nombres, revisar todo esto.

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Recuperado el 23 de noviembre del 2022, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504001680>
- Cabello, L., Guerra, J. L., Fernández, L. & López, C., (2016). Administración accidental de aceite puro esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) en lactantes. Recuperado el 19 de abril del 2023, de https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322016000300016
- Carrillo, L., (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Recuperado el 26 de octubre del 2022, de <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/0cubierta.pdf>
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Recuperado el 23 de octubre del 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360273/>
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B de alimentos, en el cancerígeno humano aducto AFB1-ADN. Recuperado en 2 de Diciembre del 2022, de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200004#:~:text=La%20activaci%C3%B3n%20metab%C3%B3lica%20de%20AFB,del%20organismo%20que%20las%20ingiri%C3%B3
- Císarová, M., Tancinová, D., Medo, J., Kacániová, M. (2016). The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of *Aspergillus* species. Recuperado el 13 de febrero del 2023, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27322876/>
- Comisión del Codex Alimentarius. (2003). Código de prácticas para la prevención y reducción de la contaminación por aflatoxinas en el maíz (CAC/RCP51-2003). Recuperado el 23 de octubre del 2022, de <http://www.fao.org/3/y1390s/y1390s00.htm>
- Cotty, J.P. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Recuperado el 10 de octubre del 2022,

de <https://www.semanticscholar.org/paper/Virulence-and-cultural-characteristics-of-two-on-Cotty/2e276dde15fd3f04519ef8b4e43c57410e1d9c7d>

- COVENIN (2017). Maíz para uso industrial. norma general (2da. revisión). FODENORCA. p.15. Recuperado el 17 de marzo del 2023, de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1935-2017.pdf>
- Davidson, P.M. (2007). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers. Recuperado el 12 de Marzo del 2023, de https://www.researchgate.net/publication/306152479_Chemical_preservatives_and_natural_antimicrobial_compounds_in_food_microbiology_Fundamentals_and_frontiers
- DICONSA (2008). Instructivo para el muestreo y análisis de maíz, frijol y arroz. Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL). Recuperado el 27 de marzo del 2023, de http://www.diconsa.gob.mx/normateca/images/pdfs/documentos_apoyo/muestreo_y_analisis.pdf
- Dowell, F. E. (2016). Detección de la aflatoxina en productos agrícolas. Recuperado el 10 de octubre del 2022, de <https://www.echocommunity.org/es/resources/4d79f169-f2ca-4c24-91a2-95d12247d130>
- Espinosa, A., Contreras, L. M., Muñoz, R. F., Millan, J. R., González, R., & Torres, I. (2011). Methods for Detection and Quantification of Aflatoxins. Recuperado el 08 de abril del 2023, de https://www.researchgate.net/publication/221918446_Methods_for_Detection_and_Quantification_of_Aflatoxins
- Frazier, W. C. & Westhoff, D. C. (1993). Microbiología de los Alimentos. 4ta edición. Recuperado el 18 de octubre del 2022, de <https://iselavictoria06wordpress.files.wordpress.com/2019/04/l33.pdf>
- Goryacheva, I.Y., De Saeger, S., Eremin, S.A. & Van Peteghem, C., (2007). Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from

single to multiple analyte screening: a review. Recuperado el 24 de abril del 2023, de doi: 10.1080/02652030701557179.

- Guzmán de Peña, D. (2007). La exposición a la aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. Recuperado el 10 de diciembre del 2022, de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342007000300008
- Guzmán de Peña, D., Aguirre, J., Ruiz, J. (1998). Regulation of mycotoxins biosynthesis during sporulation of *Aspergelli*. Recuperado el 10 de diciembre del 2022, de <https://www.scielo.sa.cr/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0001-6002200400040000400003&pid=S0001-60022004000400004&Ing=es>
- Inouye, S., Takisawa, T. & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Recuperado el 15 de Marzo del 2023, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328766/>
- Japanese Pharmacopoeia (2001). The Japanese Pharmacopoeia. Recuperado el 10 de Octubre del 2022, de http://jpdn.nihs.go.jp/jp14e/14data/Part-II/Clove_Oil.pdf.
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Recuperado el 17 de abril del 2023, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12678685/>
- Klich, M.A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. Recuperado el 18 de octubre del 2022, de <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-of-common-Aspergillus-species-Klich/2f7c4d8d5f5ee8beeb4c829c912ab7f4dab7b56a>
- Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I. & Pavela, R. (2011). Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. Recuperado el 12 de febrero del 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996911002791>

- Kuete, V. (2017). Medicinal spices and vegetables from Africa. Recuperado el 17 de febrero del 2023, de <https://www.sciencedirect.com/book/9780128092866/medicinal-spices-and-vegetables-from-africa>
- López, P., Sánchez, C., Batle, R. & Nerín, C. (2005). Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Recuperado el 05 de abril del 2023, de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf050709v>
- Martínez, H.Y., Hernández, S., Reyes, C.A & Vázquez, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. Recuperado el 15 de Diciembre del 2022, de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200005
- Martínez, L., Barat, J., Ruiz, M. (2019). Inmovilización de antimicrobianos de origen natural y su aplicación en la industria alimentaria. Tesis de fin de grado nivel maestría. Escuela técnica superior de ingeniería agronómica y del medio natural
- Martínez, M.M., Vargas, L.M. & Gómez, V.M. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. Recuperado el 14 de octubre del 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1657-95502013000200008&lng=es&nrm=iso
- Medina, D. O., (2010). Aislamiento e identificación de *Aspergillus* spp en heces de palomas (*Columba livia*), en la UAAAN UL. Tesis de fin de grado nivel licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Mendoza, J., (2021). Efectividad in vitro de aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Syzygium aromaticum* frente a *Botrytis cinerea* Pers. Tesis de fin de grado nivel licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Nonsee, K., Supitchaya, C. y Thawien, W. (2011). Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films

incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. Recuperado el 18 de abril del 2023, de <https://www.proquest.com/openview/ebccb7abd738a40f294349e8f7182f4a/1?pq-origsite=gscholar&cbl=816390>

- NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Recuperado el 18 de abril del 2023, de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009
- Nychas, G.J.E., (1995). Natural Antimicrobials from plants. Recuperado el 10 de Febrero del 2023, de https://www.researchgate.net/publication/289987588_Natural_antimicrobials_from_plants
- Patriarca, A., (2004). Factores que influyen en la coproducción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico en maní por *Aspergillus sección flavi*. Tesis de fin de grado doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Phillips, C.A., Laird, K. & Allen, S.C., (2011). The use of Citri antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternate* in vitro and on food. Recuperado el 17 de abril del 2023, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996911004832>
- PlusVet Animal Health., (2021). *Aceites esenciales: Mecanismo de acción sobre bacterias patógenas*. Recuperado el 20 de octubre del 2022, de <https://plus.vet/2018/01/18/aceites-esenciales-mecanismo-de-accion-sobre-bacterias-patogenas/>
- Puškárová, A., Bučková, M., & Kraková, L., (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. Recuperado el 15 de abril del 2023, de <https://www.nature.com/articles/s41598-017-08673-9>

- Rahnama, M., Najimi, M. & Ali, S. (2012). Antibacterial effects of *Myristica fragrans*, *Zataria multiflora* Boiss, *Syzygium aromaticum*, and *Zingiber officinale* Rosci essential oils, alone and in combination with nisin on *Listeria monocytogenes*. Recuperado el 20 de abril del 2023, de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-011-1287-3>
- Reátegui, S., Guzmán A., Santisteban, R., Pizarro, C., Bonilla, V. & Galarza, A., (2012). Aplicación de la emisión fluorescente para la detección de toxinas carcinogénicas en castañas peladas para exportación. Recuperado el 17 de abril del 2023, de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4778/3854>
- Requena, F., Saume, E. & León, A. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. Recuperado el 14 de Octubre del 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692005000400005
- Reyes, F., (2004). Estudio de la inhibición de *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum* por fase de vapor del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer). Tesina para obtención de grado académico nivel maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Reyes, F., Palou, E. & López A., (2012) Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. Recuperado el 18 de febrero del 2023, de <https://tsia.udlap.mx/vapores-de-aceites-esenciales-alternativa-de-antimicrobianos-naturales/>
- Robin, Y., Chiou, Y., Wu, P.Y. & Yen, Y.H., (1995). Color sorting of lightly roasted and deskinning peanut kernels to diminish aflatoxin and retain the processing potency. Vol. 37. Leyte, Philippines.
- Rodríguez, A. V. (2018). Comportamiento de híbridos de maíz ante una cepa de *Aspergillus flavus* en la provincia de Córdoba. Tesis para obtener grado nivel maestría. Universidad Nacional de La Plata.

- Rodríguez, E. N., (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Recuperado el 18 de abril del 2023, de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>
- SAGRPA (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 Maíz grano blanco y amarillo mexicano. Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos. Recuperado el 19 de abril del 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf
- Sanabria, N., Martínez, Y., & López, A. (2017). Métodos para la determinación de aflatoxinas en alimentos. Recuperado el 21 de abril del 2023, de <http://www.postgradovipi.50webs.com/archivos/agrollania/2017/agro8.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios noviembre 2022. Maíz blanco. Recuperado el 19 de abril del 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/784860/Maiz_blanco_Noviembre.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios noviembre 2022. Maíz amarillo. Recuperado el 19 de abril del 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/784860/Maiz_blanco_Noviembre.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios mayo 2022. Maíz amarillo. Recuperado el 19 de abril del 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/784860/Maiz_blanco_Noviembre.pdf
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), (2022). Escenario mensual de productos agroalimentarios agosto 2022. Maíz amarillo. Recuperado el 19 de abril del 2023, de

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/784860/Maiz_blanco_Noviembre.pdf

- Singh, J., Baghotia, A. & Goel, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. Recuperado el 14 de marzo del 2023, de https://www.researchgate.net/publication/310799727_Eugenia_caryophyllata_Thunberg_Family_Myrtaceae_A_Review
- Sinha, K. K., (1999). Testing Methods for Aflatoxins in Foods. Recuperado el 20 de abril del 2023, de <https://doi.org/10.1177/156482659902000411>
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. & Arsenakis, M., (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential Oils. Recuperado el 18 de abril del 2023, de <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf950540t>
- Smith A., Stewart, J. & Fyfe, L., (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Recuperado el 18 de abril del 2023, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9569693/>
- Suhr, K. & Nielsen, P., (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. Recuperado el 18 de Abril del 2023, de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12631202/>
- Uguña, M. D., (2019). Análisis in vitro de la actividad biológica del aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*) frente a *Aspergillus flavus*. Tesis para la obtención de grado académico nivel licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca.
- Victores, M. A. (2013). Estudio de una formulación fitoterapéutica para aplicación tópica con aceite esencial del Árbol del Té (*Melaleuca alternifolia*). Tesis de licenciatura. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.
- Wacoo, P., Wendi, D., Vuzi, P., & Hawumba, J. (2014). Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. Recuperado el 19 de febrero del 2023, de

https://www.researchgate.net/publication/268210502_Methods_for_Detection_of_Aflatoxins_in_Agricultural_Food_Crops