

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Evaluación de Propiedades Antifúngicas de Microcápsulas  
de Quitosano con Aceites Esenciales en Hongos  
Micotoxigénicos Contaminantes del Maíz**

**TESIS PROFESIONAL**

**TODOS LO ILUMINAN**

Que para obtener el Título de

**QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

**Rocío Elizabeth Villegas Rascón**

**1942**

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2016



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Rocío Elizabeth Villegas Rascón**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de **Químico Biólogo Clínico**

---

Dr. Mario Onofre Cortez Rocha

Director de Tesis

---

M.C. Griselda Macrina Moreno Ibarra

Secretario

---

M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña

Vocal

---

M.C. Reyna Isabel Sánchez Mariñez

Suplente

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por prestarme vida para que todo esto fuera posible.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A la Universidad de Sonora, por darme la oportunidad de desempeñarme como alumna en esta  
carrera.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, por permitirme hacer uso de sus  
instalaciones, equipos y materiales.

A todos los docentes y alumnos que trabajan en el Laboratorio de Micotoxinas, por ayudarme  
cuando lo necesitaba e invitarme a los convivios.

A los proyectos que financiaron e hicieron posible este trabajo:

- Microencapsulación de aceites esenciales en quitosano: Evaluación de propiedades antifúngicas y antimicotoxigénicas. Clave USO313000956. Financiado por la División de Ciencias Biológicas y la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad de Sonora.
- Mecanismos de señalización celular y blancos moleculares de bio-nanocompositos de quitosano sobre la respuesta de estrés y regulación oxidativa de hongos toxigénicos: efecto de nanopartículas de quitosano y nanotubos funcionalizados con quitosano. Proyecto No. 219786 financiado por CONACyT bajo la responsabilidad de la Dra. Maribel Plascencia Jatomea.

Al Dr. Mario Cortéz, por creer en mí en todo momento y darme la oportunidad de desarrollar  
este proyecto.

A la maestra Macrina, por recomendarme para este trabajo y siempre confiar en mí.

A mis sinodales: Maestra Lucía y Maestra Reyna, por todos sus consejos y enseñanzas.

A Ana Karenth y Tavo, por ayudarme y compartir su tiempo y conocimientos conmigo.

## DEDICATORIA

A mis padres, por criarme, educarme y convertirme en lo que soy. Por ser mi soporte y creer en mí hasta el final.

Al Dr. Mario Cortéz, por ser mi faro, por el conocimiento compartido, por confiar en mí y apoyarme en todo.

A mis hermanos: Valentín, Magda y Dulce. Por quererme como soy y apoyarme en todo momento.

A mis sobrinos: Bruno y Gerardo, por sacarme “canas verdes” y al mismo tiempo alegrar mis días.

A mi tía “Toñita”, por motivarme siempre a ser aún mejor.

A los hermanos que elegí: a Nadia, Samara, Brisa, Iván, Manuel, Sergio, Michel, por compartir tantos momentos tan agradables conmigo, por su locura, sus buenas vibras, por las risas y los recuerdos. Por siempre estar ahí, en las buenas y en las malas.

A los amigos que hice a lo largo de este tiempo, los viejos y los nuevos: a Iliana, Alma, Maritza, Martha, Edgar, “Badoel”, Paúl, Ale, Iván, Ana Gaby, Encinas, Claudia, Laura, por compartir buenos momentos.

A Ana Karenth, por guiarme desde el principio, por los consejos y todo lo enseñado.

A la maestra Macrina, por darme la oportunidad de estar en el cepario, por creer en mí desde entonces.

Al maestro Tequida, por todos los consejos y enseñanzas en Microbiología.

A mis ex-jefes, Elizabeth y Samuel, por su apoyo incondicional.

## CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA.....	4
CONTENIDO.....	5
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
OBJETIVOS.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos.....	14
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
Hongos.....	15
Hongos Micotoxigénicos.....	16
<i>Aspergillus</i> .....	17
<i>Aspergillus parasiticus</i> .....	18
Aflatoxinas.....	21
<i>Aspergillus niger</i> .....	23
<i>Fusarium</i> .....	25
<i>Fusarium verticillioides</i> .....	26
Fumonisinias.....	28
Métodos de Control de Hongos.....	29
Métodos Alternativos.....	30
Aceites esenciales.....	30
Clavo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ).....	31
Canela ( <i>Cinnamomun zeylanicum</i> ).....	32
Tomillo ( <i>Thymus capitatus</i> ).....	34
Conservación de aceites esenciales.....	36
Microencapsulación.....	36
Quitosano como agente encapsulante.....	38
HIPÓTESIS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42

Obtención de Materia Prima.....	42
Preparación de las Microcápsulas.....	42
Caracterización de las Matrices de QT-TPP con Incorporación de AE.....	42
Cultivos Fúngicos.....	43
Elaboración de Medio Czapek con AE.....	43
Elaboración de Medio Czapek con Microcápsulas.....	44
Evaluación de la Actividad Antifúngica.....	44
Crecimiento Radial.....	44
Técnica de inoculación por “siembra en pozo”.....	44
Determinación de Dosis Medias Inhibitorias (DI <sub>50</sub> ).....	45
Germinación de Esporas.....	45
Evaluación de las Microcápsulas en la Producción de Micotoxinas.....	46
Fumonisinás Totales (FB's).....	46
Producción de fumonisinás.....	46
Extracción de fumonisinás.....	46
Cuantificación de fumonisinás.....	47
Aflatoxinás Totales (AF's).....	47
Producción de aflatoxinás.....	47
Extracción de aflatoxinás.....	47
Cuantificación de aflatoxinás.....	48
Análisis Estadístico.....	48
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
Caracterización de las Matrices de QT-TPP con la Incorporación de los AE.....	49
Efecto de los Aceites Esenciales en el Crecimiento Radial.....	49
Efecto de los Aceites Esenciales en la Germinación de Esporas.....	56
Efecto de las Microcápsulas en el Crecimiento Radial.....	60
Determinación de las Dosis Medias Inhibitorias (DI <sub>50</sub> ).....	66
Efecto de las Microcápsulas en la Germinación de Esporas.....	66
Efecto de las Microcápsulas en la Producción de Micotoxinas.....	69
CONCLUSIÓN.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Potencial zeta (Pz) y tamaño de las microcápsulas de quitosano y tripolifosfato con cada uno de los aceites esenciales incorporados.....	49
2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> a diferentes horas de incubación en presencia de aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.....	50
3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> a diferentes horas de incubación en presencia de aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.....	51
4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>A. niger</i> a diferentes horas de incubación en presencia de aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.....	52
5. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de <i>A. parasiticus</i> a diferentes horas de incubación con aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.....	57
6. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de <i>F. verticillioides</i> a diferentes horas de incubación con aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.....	58
7. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de <i>A. niger</i> a diferentes horas de incubación con aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.....	59
8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>A. parasiticus</i> a diferentes horas de incubación con las microcápsulas (MC) en cuatro concentraciones.....	62
9. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> a diferentes horas de incubación con las microcápsulas (MC) en cuatro concentraciones.....	63
10. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>A. niger</i> a diferentes horas de incubación con las microcápsulas (MC) en cuatro concentraciones.....	65



11. Dosis (ppm) medias inhibitorias de los diferentes aceites esenciales para cada uno de los hongos.....	66
12. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de <i>A. parasiticus</i> en presencia de microcápsulas de quitosano con la $DI_{50}$ de cada aceite esencial.....	67
13. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de <i>F. verticillioides</i> en presencia de microcápsulas de quitosano con la $DI_{50}$ de cada aceite esencial.....	67
14. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de <i>A. niger</i> en presencia de microcápsulas de quitosano con la $DI_{50}$ de cada aceite esencial.....	68
15. Efecto de las microcápsulas sobre la producción de aflatoxinas y fumonisinas totales.....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cabeza conidial de <i>Aspergillus</i> .....	18
2. Crecimiento de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> en agar Czapek, aislados de muestras de nueces.....	20
3. <i>Aspergillus parasiticus</i> . Colonias de una semana, (a) en agar Czapek, (b) en agar extracto de malta (MEA); (c) y (e) cabezas conidiales x1400; (d) conidias x 1400.....	21
4. Estructura molecular de las principales aflatoxinas.....	23
5. Desarrollo de <i>A. niger</i> monitoreado por microscopía electrónica de barrido.....	25
6. Características morfológicas microscópicas del género <i>Fusarium</i> .....	26
7. <i>Fusarium verticillioides</i> , (a) Monofiálides con cadenas de conidios; (b-d) conidióforos y microconidios; (e-g) microconidios.....	27
8. Estructura de fumonisinas serie B.....	28
9. <i>Syzygium aromaticum</i> o <i>Eugenia caryophyllata</i> : brotes y hojas de la planta (A); brotes secos (clavo de olor) (B).....	32
10. <i>Cinnamomum zeylanicum</i> : brotes y hojas de la planta (A); corteza seca y hojas de la planta (B).....	34
11. Tallos, hojas y flor de <i>Thymus capitatus</i> .....	35
12. Diagrama esquemático del mecanismo de liberación controlada del aceite.....	37
13. Esquema de los diferentes métodos de microencapsulación.....	38
14. Estructura química de la quitina y el quitosano.....	39
15. Crecimiento radial de: (A) <i>A. parasiticus</i> y (B) <i>F. verticillioides</i> a las 144 h con aceite esencial de tomillo en las cuatro concentraciones; (a) 100, (b) 500, (c) 750 y (d) 1,000 ppm.....	54
16. Crecimiento radial de (A): <i>A. parasiticus</i> y (B) <i>F. verticillioides</i> en los controles (a) Tween, (b) Czapek y (c) Terravax.....	55

## RESUMEN

El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto de aceites esenciales (AE) aplicados de forma directa y mediante microcápsulas de quitosano en el crecimiento radial y la germinación de esporas en hongos fitopatógenos. Se elaboraron microcápsulas de quitosano con aceites esenciales de tomillo, clavo y canela entrecruzadas con tripolifosfato de sodio mediante el método de gelificación ionotrópica. A su vez, las microcápsulas fueron caracterizadas para determinar su potencial zeta y tamaño de partícula. Los aceites esenciales solos y las microcápsulas fueron evaluados en el crecimiento radial y la germinación de *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger* en grano de maíz. Asimismo, se evaluó el efecto de las microcápsulas en la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales. Se encontró que los AE solos presentaron mejor efecto inhibitorio del crecimiento radial y la germinación de esporas en las tres especies de hongos, siendo el aceite esencial de canela a partir de las 500 ppm, el de mayor efecto. En las microcápsulas con los aceites encapsulados se observó que cada especie de hongo se desarrollaba diferente en cada uno de ellos. Asimismo, se encontró que las microcápsulas de los AE disminuyen la producción de aflatoxinas y fumonisinas totales en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que tanto los AE como sus microcápsulas en quitosano, poseen un efecto fungistático en las tres especies de hongos estudiados.

## INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas en el metabolismo secundario de los hongos y aparecen como contaminantes naturales en los alimentos cuando las condiciones climáticas son propicias. La contaminación por micotoxinas en cereales y alimentos balanceados ha provocado gran preocupación a nivel mundial, debido al potencial riesgo para la salud de seres humanos y animales. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*, son los géneros que más frecuentemente contaminan productos alimenticios y alimentos balanceados. Asimismo, producen la mayor parte de las micotoxinas que amenazan a la salud, y causan graves pérdidas en los cultivos. Es por eso que la protección de cultivos juega un papel clave para garantizar la seguridad alimentaria y, a su vez, está directamente relacionado con la conservación de alimentos, un paso clave para aumentar la oferta de alimentos y la seguridad alimentaria (Degola y col., 2015; Stark, 2009).

Actualmente, se han identificado más de 300 micotoxinas en el mundo, las más comunes son las aflatoxinas, ocratoxina A, tricotecenos, zearalenona y fumonisinas. Estos contaminantes tienen efectos cancerígenos, teratogénicos, nefrotóxicos y hepatotóxicos en humanos y animales. Además, se ha demostrado que la ingesta combinada de múltiples micotoxinas produce efectos tóxicos aditivos y sinérgicos (Huwig y col., 2001; Martínez y col., 2013; Zhao y col., 2015).

Las actuales estrategias para la desintoxicación de alimentos y forrajes contaminados con micotoxinas incluyen métodos químicos, biológicos y físicos. Los agentes biológicos, sales minerales y productos vegetales han ganado interés en la industria, pues representan una importante fuente de agentes químicos que podrían retrasar o inhibir el crecimiento de patógenos y/o la producción de toxinas. En los últimos años, ha habido un interés creciente en los aceites esenciales como posibles sustitutos de los plaguicidas sintéticos convencionales. Esto ha sido debido a la preocupación por la contaminación del ecosistema y la resistencia en plagas y patógenos a los plaguicidas (Banihashemi y Abivardi, 2011; Pietro y col., 2013; Zhao y col., 2015).

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas ricas en terpenos con diferentes grados de lipofilia e hidrofilia relativa. Tales compuestos pueden alterar la permeabilidad celular por su inserción entre las cadenas de ácidos grasos que componen las bicapas lipídicas de las membranas, interrumpiendo así el embalaje de lípidos, provocando alteraciones en las propiedades y funciones de la membrana celular mediante el aumento de su fluidez y permeabilidad. Los aceites esenciales y sus fitoconstituyentes han demostrado actividad

antifúngica prometedora *in vitro* e *in vivo*, la cual se ha estudiado extensamente frente a *Candida* spp., *Trichophyton* spp. y *Aspergillus* spp. Se ha presentado actividad antimicrobiana en aceites como el de ajo, canela, tomillo, orégano, clavo, albahaca, cilantro, piel de cítricos, eucalipto, jengibre, romero y menta entre otros. Se han realizado diversos estudios sobre la evaluación de AE *in vitro* en la fase líquida. Sin embargo, la actividad biológica de los AE se pierde por volatilización de los componentes activos o su degradación por acción de las altas temperaturas, la oxidación y la luz UV. Estos cambios tienen un efecto negativo sobre la estabilidad en almacenamiento, las propiedades sensoriales y la aceptabilidad general de los productos desarrollados (Banihashemi y Abivardi, 2011; Bakry y col., 2016; de Lira-Mota y col., 2012; Soliman y col., 2013).

La microencapsulación de sustancias tiene como principio la preparación de una emulsión, que consiste en el compuesto a encapsular (un sólido, líquido o producto gaseoso) a fin de proteger y conservar su potencial. El proceso de encapsulación también implica fusión, absorción o dispersión de las combinaciones de materiales bioactivos encapsulados sólidos, líquidos o gaseosos. El objetivo principal es la protección contra la degradación promovida por el ambiente externo y la liberación controlada de sustancias específicas. Lo anterior se basa en la difusión del elemento activo encapsulado a través de la membrana o su degradación. Con respecto a los materiales utilizados en la producción de microcápsulas, polisacáridos como alginato, almidón y celulosa; y proteínas como el colágeno y la gelatina se usan ampliamente por su capacidad para unirse a compuestos de sabor, además de su biodegradabilidad y bajo costo (Souza y col., 2014).

Recientemente se está explorando el uso del quitosano como un agente de encapsulación, el cual ha demostrado ser un material con excelentes propiedades, entre las que destacan su abundancia, baja toxicidad, hidrofobicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad y actividad antimicrobiana, además de otorgar a las micropartículas mayor estabilidad, una forma más definida y un tamaño homogéneo (Flores-Belmont y Jiménez-Munguía, 2013; Souza y col., 2014).

Varios estudios han evaluado con anterioridad las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales como el de clavo, tomillo y canela, así como del quitosano. En la industria esta técnica ha obtenido un importante valor debido a la protección que adquieren las sustancias encapsuladas, resguardándolas de las condiciones ambientales (calor y humedad). Factores que anteriormente describimos como causantes de una baja efectividad de los aceites esenciales. Por ello que surge la inquietud de evaluar el efecto de microcápsulas de quitosano

con estos aceites esenciales como un prometedor método alternativo para el control de plagas fúngicas, así como su potencial inhibición en el desarrollo de micotoxinas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el efecto de aceites esenciales aplicados de forma directa y mediante microcápsulas de quitosano sobre el crecimiento radial y la germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. Asimismo, probar el efecto de las microcápsulas en la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales.

### Objetivos Particulares

- Analizar el efecto los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y tomillo (*Thymus capitatus*) en el crecimiento radial y en la germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*.
- Determinar las dosis inhibitorias medias ( $DI_{50}$ ) de cada uno de los tratamientos.
- Elaborar microcápsulas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio (TPP) con las  $DI_{50}$  obtenidas con los aceites esenciales de canela, clavo y tomillo mediante el método de gelificación ionotrópica y caracterizarlas.
- Examinar el efecto de la microcápsulas en el crecimiento radial y en la germinación de esporas de *F. verticillioides*, *A. parasiticus* y *A. niger*.
- Establecer el efecto de las microcápsulas en la producción de aflatoxinas y fumonisinas totales por *A. parasiticus* y *F. verticillioides*, respectivamente, en maíz sano.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El maíz (*Zea mays* L.), que es junto con los granos de trigo y arroz, uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales. Asimismo, es materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. Es una planta nativa de México y su consumo per cápita es de aproximadamente 160 g por día en forma de tortillas, principalmente (FAO, 1992; Martínez-Padrón y col., 2013).

En México, en el 2014 se produjeron más de 23 millones de toneladas de maíz. Sin embargo, los volúmenes y la calidad de la producción de este cereal en nuestro país son limitados debido principalmente a la incidencia de plagas y enfermedades. Al introducir los granos al almacén, estos llevan consigo una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos; la estructura de la población depende de las condiciones climáticas de campo y los procesos de recolección. La actividad fúngica puede causar efectos no deseados en el grano incluyendo decoloración, contribución al calentamiento, pérdidas en el valor nutricional, producción de malos olores, disminución en la germinación, deterioro en la calidad de la hornada y molienda, y puede resultar en la contaminación con micotoxinas (Magan y col., 2003; Martínez-Padrón y col., 2013; SIAP, 2014).

### Hongos

Los hongos son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza. Tienen una gran diversidad de formas y tamaños, pueden vivir en diversos sustratos y condiciones ambientales; aprovechan elementos nutritivos muy simples y forman parte elemental de la vida del hombre y de otros organismos. Son células eucariotas con un nivel biológico de complejidad más elevado que las bacterias. Pueden ser unicelulares o sufrir diferenciación y ser multicelulares mediante el desarrollo de filamentos ramificados. Son acidófilos, aerobios, anaerobios facultativos, con temperaturas de crecimiento en intervalos que comprenden entre los 0°C y 55°C. La mayoría son inmóviles pero pueden tener células reproductoras móviles, no poseen clorofila por lo que no realizan fotosíntesis, siendo entonces quimiorganotróficos y requiriendo para ello de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, y su reproducción puede ser por medios sexuales y asexuales (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013; Kenneth y col., 2010; López-Martínez y col., 2006).

Los hongos pueden producir una variedad de propágulos, incluyendo fragmentos de hifas, estructuras resistentes tales como esclerocios y rizomorfos, y esporas tanto sexuales



como asexuales. Todas estas estructuras facilitan la supervivencia y la distribución espacial de los hongos, sin embargo, la esporulación asexual es claramente el mecanismo de reproducción más exitoso e impresionante debido al gran número de mitosporas (conidios) que pueden ser producidos por una sola colonia (Glenn y col., 2004).

Algunos géneros de hongos son capaces de producir metabolitos secundarios que provocan riesgos fitopatológicos y micotoxigénicos en las etapas de pre y poscosecha, así como en productos alimenticios procesados. Debido a la presencia de estos patógenos y su potencial micotoxígeno, ocurren año tras año, importantes pérdidas, directas e indirectas, de productos alimentarios, a nivel de campo, poscosecha y anaquel, con las consecuentes restricciones en exportación, destrucción de productos contaminados, muerte de animales y en casos extremos de seres humanos (Arrua-Alvarenga y col., 2012; López-Meneses, 2014).

### **Hongos Micotoxigénicos**

Los hongos patógenos asociados a diversas enfermedades de los cultivos, pueden conducir no sólo a importantes pérdidas de producción, sino que también pueden dar lugar a la producción y acumulación de metabolitos secundarios (micotoxinas) peligrosos para la salud humana y animal. En los granos de cereales, los principales hongos productores de micotoxinas pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Degola y col., 2015).

Las micotoxinas son moléculas producidas por hongos miceliales durante su crecimiento como contaminantes, principalmente en productos agrícolas destinados a la alimentación (cereales, vino, café, etc.), generando su deterioro. Estos compuestos presentan una estructura química diversa y una masa molecular relativamente baja, que al ser consumidas por animales y el hombre, originan padecimientos denominados micotoxicosis, las cuales pueden tener efectos tóxicos, teratógenos, inmunosupresores y carcinogénicos, de ahí su gran importancia en el campo de los alimentos y la salud (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013).

Existen varios factores que determinan la producción de micotoxinas, tales como el potencial genético del hongo, actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura, y nutrientes. Sin embargo, la presencia de una especie fúngica micotoxigénica no indica necesariamente la presencia de micotoxinas, ya que no todas las cepas de estas especies son toxigénicas; aún en las condiciones óptimas, la producción de toxinas puede ser nula. A su vez, las micotoxinas pueden persistir por un largo tiempo después de que el crecimiento vegetativo del hongo haya cesado, e incluso si el hongo ha muerto (Velluti, 2002).

Los hongos que producen toxinas en los alimentos se clasifican en hongos de campo y hongos de almacenamiento, en función de sus requerimientos ecológicos para el crecimiento. Los hongos que atacan a los granos de cereales en la planta requieren un 20-25% de contenido de humedad o una humedad relativa de 70-90%, como por ejemplo los géneros *Alternaria*, *Fusarium* y *Cladosporium* que se denominan hongos de campo. Por otro lado, los géneros de hongos que requieren entre 13-18% de contenido de humedad como lo son *Aspergillus* y *Penicillium*, principalmente, son denominados hongos de almacenamiento (Nogaim, 2012; Tequida-Meneses y col., 2002).

En un estudio realizado por la corporación Alltech en el 2013, se encontró que el 99% de las muestras de granos analizados contenían micotoxinas. En el maíz, las micotoxinas contaminantes primarias fueron las aflatoxinas y las fumonisinas. Esto es similar a lo que se informó en otro estudio realizado por Biomin en 2012, donde el 78% de las muestras analizadas de Norteamérica contenían fumonisinas y el 30% aflatoxinas (Torres y col., 2014).

### ***Aspergillus***

El género *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose aislar de una extensa gama de sustratos; ha sido estudiado desde hace siglos debido a sus propiedades industriales, de deterioro, biotecnológicas y efectos negativos en la salud humana y animal (Arrua-Alvarenga y col., 2012).

Los hongos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (Carrillo, 2003).

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de las especies de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Figura 1), y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el sustrato.

En los *Aspergillus*, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o

células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (Carrillo, 2003).

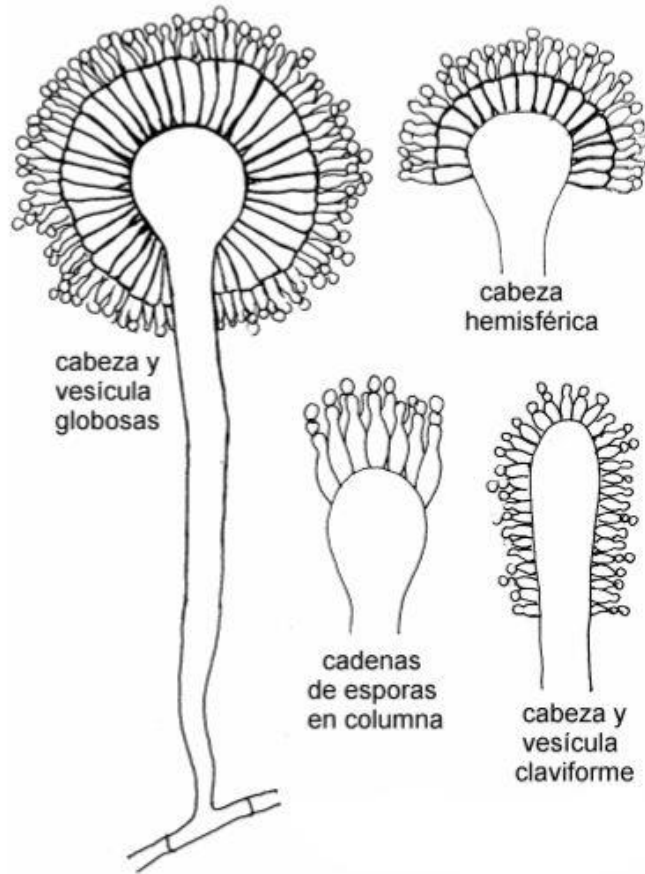


Figura 1. Cabeza conidial de *Aspergillus*. (Fuente. Carrillo, 2003).

***Aspergillus parasiticus*.** En 1912, el patólogo A. T. Speare, miembro de la asociación “Hawaiian Sugar Planters”, describió por primera vez al hongo *Aspergillus parasiticus*, en las plantaciones de caña de azúcar en las islas de Kauai y Oahu (ambas en Hawái). Él observó la esporulación del hongo sobre *Pseudococcus sacchari* (cochinillas de caña de azúcar), que habían muerto mientras éstas se alimentaban de las hojas de la caña. La relación de *A. parasiticus*, junto con *A. flavus*, ganó la atención de todo el mundo con el descubrimiento de las aflatoxinas producidas por estos hongos en los cultivos (Horn y col., 2009).

*Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, se encuentran en el suelo y crecen rápidamente sobre materia orgánica corrupta. Sus colonias son generalmente amarillas, verde amarillo, amarillo-marrones, o verdes; granuladas, aterciopeladas, o algodonosas; y tienen una saliente periférica blanca y un margen distintivo (Figura 2) (López-Barahona y Chávez-Escamilla, 2012).

*A. parasiticus* se caracteriza por presentar cabezas conidiales principalmente uniseriadas radiales y notables conidios de paredes rugosas. Las colonias en agar Czapek a 25°C alcanzan un diámetro de 2.5 a 3.5 cm dentro de 7 días. Las vesículas subglobosas, de entre 20-35 micras de diámetro, fiálides normalmente sufragadas directamente en la vesícula, de 7-9 x 3-4 micras, hialinas a verde pálido (Figura 3) (Mycobank, 2015).



Figura 2. Crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* en agar Czapek, aislados de muestras de nueces. (Fuente. Al-Hmoud y col., 2012).

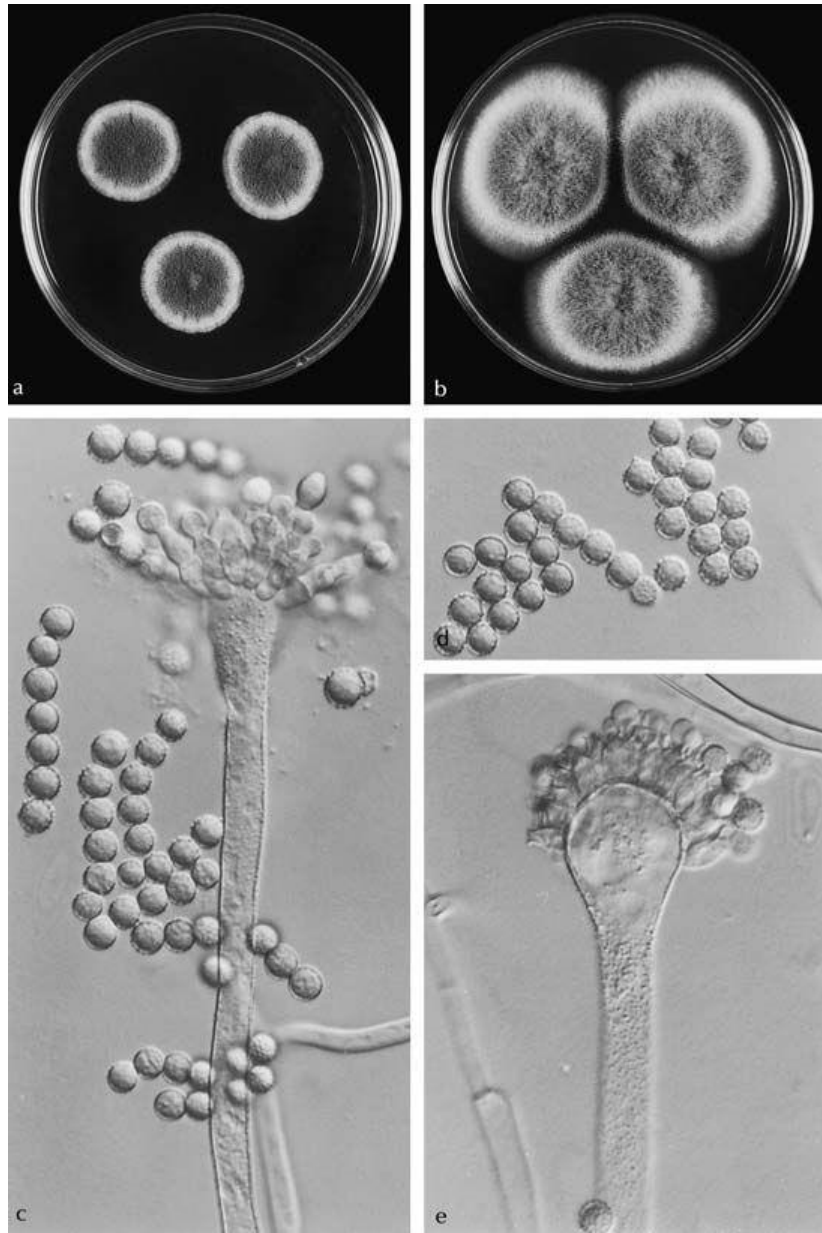


Figura 3. *Aspergillus parasiticus*. Colonias de una semana, (a) en agar Czapek, (b) en agar extracto de malta (MEA); (c) y (e) cabezas conidiales x1400; (d) conidias x 1400. (Fuente. Mycobank, 2015).

**Aflatoxinas.** Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por especies de hongos *Aspergillus*, tales como *A. flavus* y *A. parasiticus*. Mientras *A. flavus* se adapta bien en las partes aéreas de las plantas, *A. parasiticus* se puede encontrar en los suelos. Han sido identificadas unas 20 aflatoxinas que pertenecen a

un grupo llamado las difuranocumarinas altamente sustituidas. Sólo cuatro de ellas, las aflatoxinas B1 (AFB1), G1 (AFG1), y sus dihidroderivados B2 (AFB2) y G2 (AFG2) - naturalmente contaminan los alimentos. Otros miembros importantes de la familia de las aflatoxinas son la M1 y M2, ambas son formas oxidativas de aflatoxina B1 modificada en el tracto digestivo de algunos animales y aislada de la leche, la orina y las heces (Dohnal y col., 2014; Yu y col., 2002).

La aflatoxicosis es el envenenamiento que resulta de la ingestión de aflatoxinas. Se han identificado dos formas de aflatoxicosis: la primera es la intoxicación aguda grave, lo que resulta en daño hepático directo y la enfermedad posterior o la muerte, y la segunda es la exposición subsintomática crónica. Los síntomas de la aflatoxicosis grave incluyen necrosis hemorrágica del hígado, la proliferación de las vías biliares, edema, y letargo. La AFB1 es la forma más prevalente y también la más potente de estas toxinas (Parsai y col., 2014).

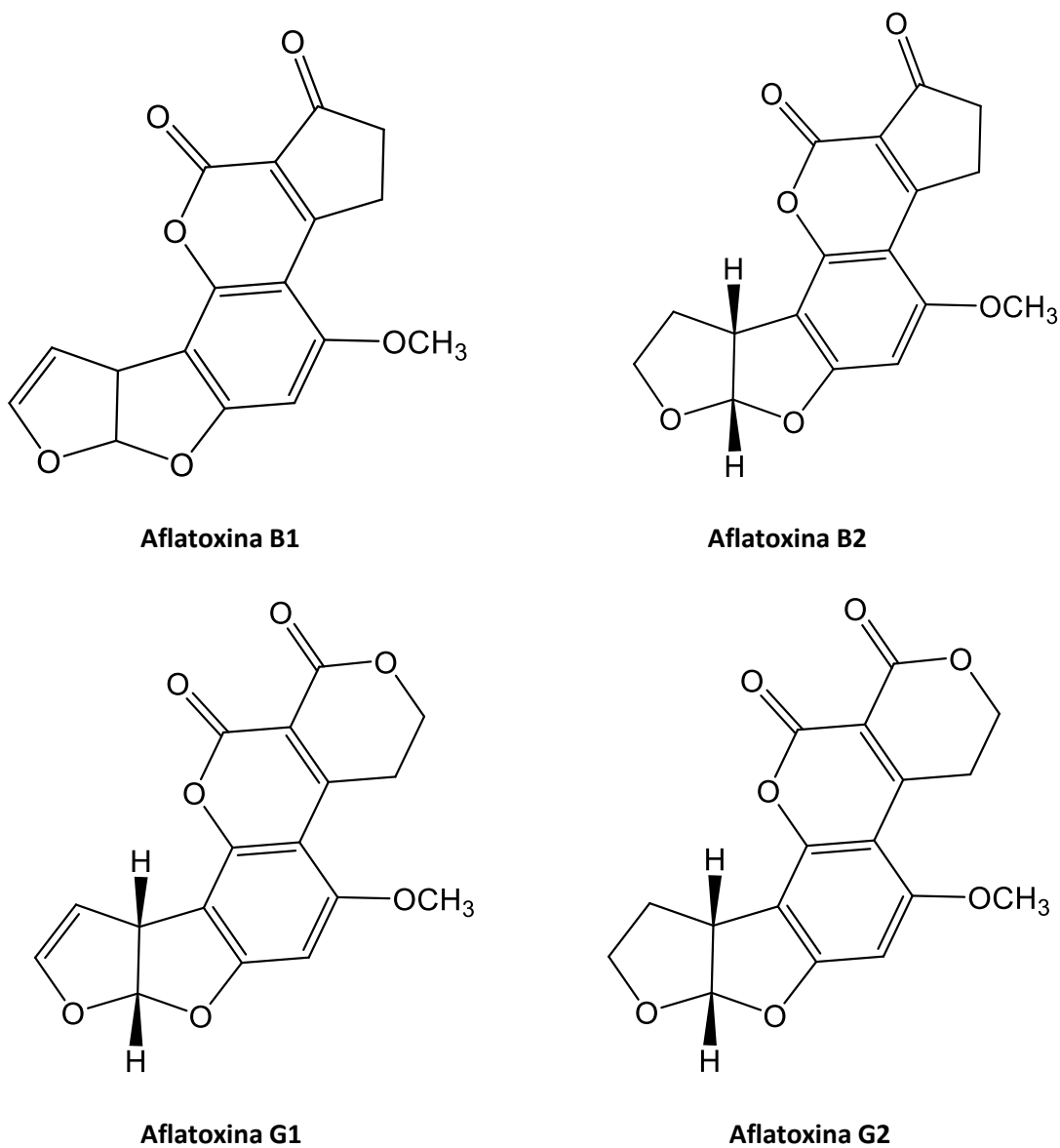


Figura 4. Estructura molecular de las principales aflatoxinas. (Fuente. Cortez-Rocha y col., 2012).

***Aspergillus niger*.** *Aspergillus niger*, el miembro más importante de los *Aspergillus* subgénero *Circumdati* sección *Nigri*, es ante todo un hongo saprófito fitopatógeno, capaz de crecer en una amplia gama de sustratos orgánicos, y a menudo provoca el deterioro de los alimentos almacenados. Es una de las especies de hongos filamentosos más importantes a nivel industrial, siendo utilizado en el área de la biotecnología para la producción de ácidos orgánicos y de enzimas extracelulares. Otras aplicaciones incluyen la biotransformación de xenobióticos,



biorremediación y pre-tratamiento de residuos, producción de proteínas celulares; además, se puede utilizar como huésped de transformación de proteínas heterólogas y metabolitos secundarios debido a su alta tasa de crecimiento, tolerancia a pH bajos y alta tasa de producción de policétido. *A. niger* es también un organismo modelo importante para varias áreas de investigación, incluyendo el estudio de la secreción de proteínas eucariotas en general, los efectos de diversos factores ambientales en la supresión o activación de la exportación de varias enzimas degradadoras de biomasa, mecanismos moleculares críticos para el desarrollo del proceso de fermentación, y los mecanismos implicados en el control de la morfología fúngica. Por otro lado, esta especie se encuentra muy comúnmente como causante de aspergilomas y es el agente más frecuentemente encontrado de otomicosis en humanos. También es un contaminante común de laboratorio (Baker, 2006; Mycology Online, 2016; Rasooli y col., 2006; Tolouee y col., 2010; Vélez-Haro, 2013).

*Aspergillus niger* es una de las especies más comunes y fácilmente identificables del género *Aspergillus*. Presenta cabezas conidiales (Figura 5) de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas. Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estriaciones longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café (Vega y col., 2012).

Algunas cepas de este hongo tienen la capacidad de producir la ocratoxina A, y esto es de gran preocupación para la industria alimentaria. Incidentes de gran deterioro se producen debido a la capacidad del organismo contaminante para superar la tecnología de conservación de hoy en día, tales como pH bajo y altas concentraciones de conservantes químicos. La ocratoxina A es una micotoxina nefrotóxica y potencialmente cancerígena que se encuentra en una variedad de productos alimenticios tales como cereales, granos de café, granos de cacao, uvas, frutas secas y especias (Massi y col., 2016; Plumridge y col., 2004).

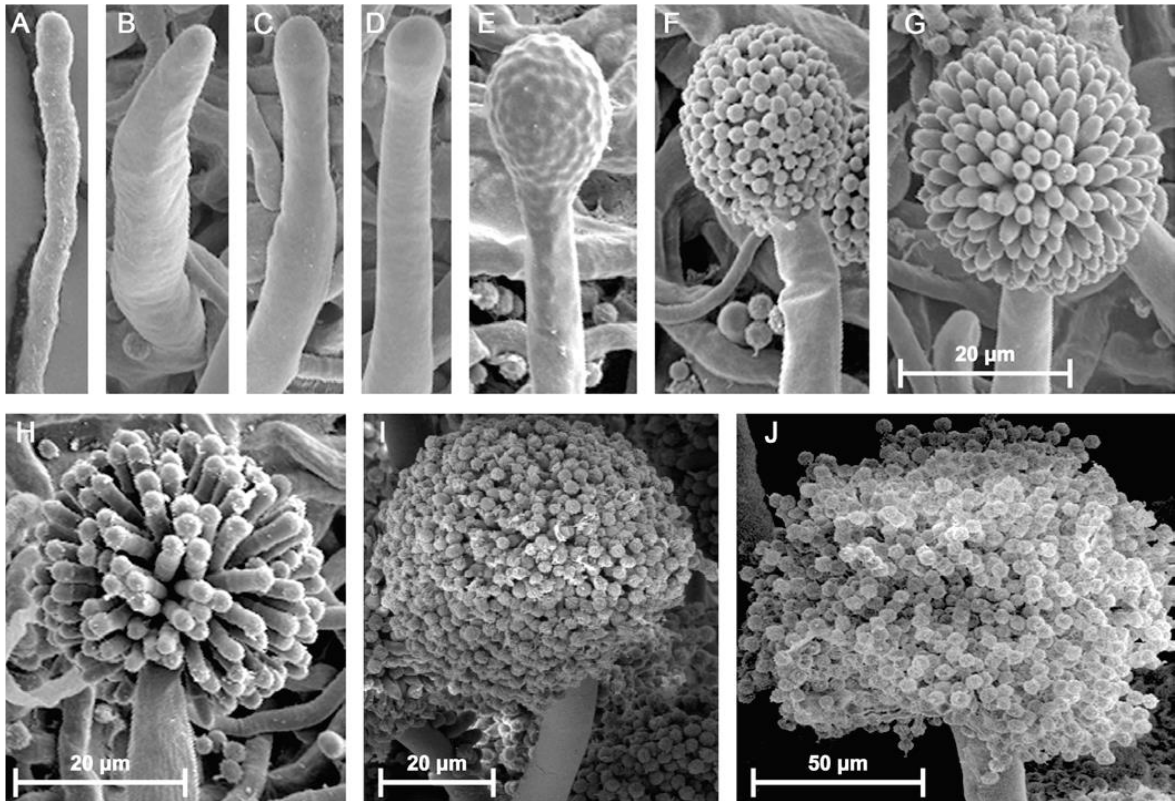


Figura 5. Desarrollo de *A. niger* monitoreado por microscopía electrónica de barrido. El micelio vegetativo forma dos tipos de hifas aéreas. Un tipo es similar a las hifas vegetativas (A), mientras que el otro tipo es 2-3 veces más gruesas (B). Las puntas de estas últimas hifas aéreas pueden hincharse para formar una vesícula (C, D). Los brotes se forman en la vesícula (E) que se convierten en métulas (F, G). Las fiálides se forman en la parte superior de las métulas (H), que dan lugar a cadenas de conidios (I, J). La barra en G también es válida para A-F. (Fuente. Krijgsheld y col., 2013).

### ***Fusarium***

El género *Fusarium* es el estado anamorfo de varios géneros de Ascomycetes que pertenecen al orden *Hypocreales* y a la familia *Nectriaceae*. Se caracteriza por poseer macroconidios y microconidios como estructuras de propagación. Algunas especies forman clamidosporas como estructuras de resistencia y propagación. Estas pueden presentarse solitarias, en cadenas, o en grupos y también formarse en los conidios. De todas las estructuras mencionadas, la morfología de los conidios es la principal característica utilizada para identificación de especies de *Fusarium* (Figura 6) (Velluti, 2002).

A pesar de haberse descrito como mohos de campo, *Fusarium* spp. puede desarrollarse en almacén cuando la humedad es alta y la temperatura baja. Son importantes patógenos de cereales, causando lesiones en tallo y raíces, así como infecciones en las espigas. Las diferentes especies están ampliamente distribuidas en el suelo y son capaces de producir diversos tipos de tricotecenos, zearalenona, moniliformina y fumonisinas (Velluti, 2002).

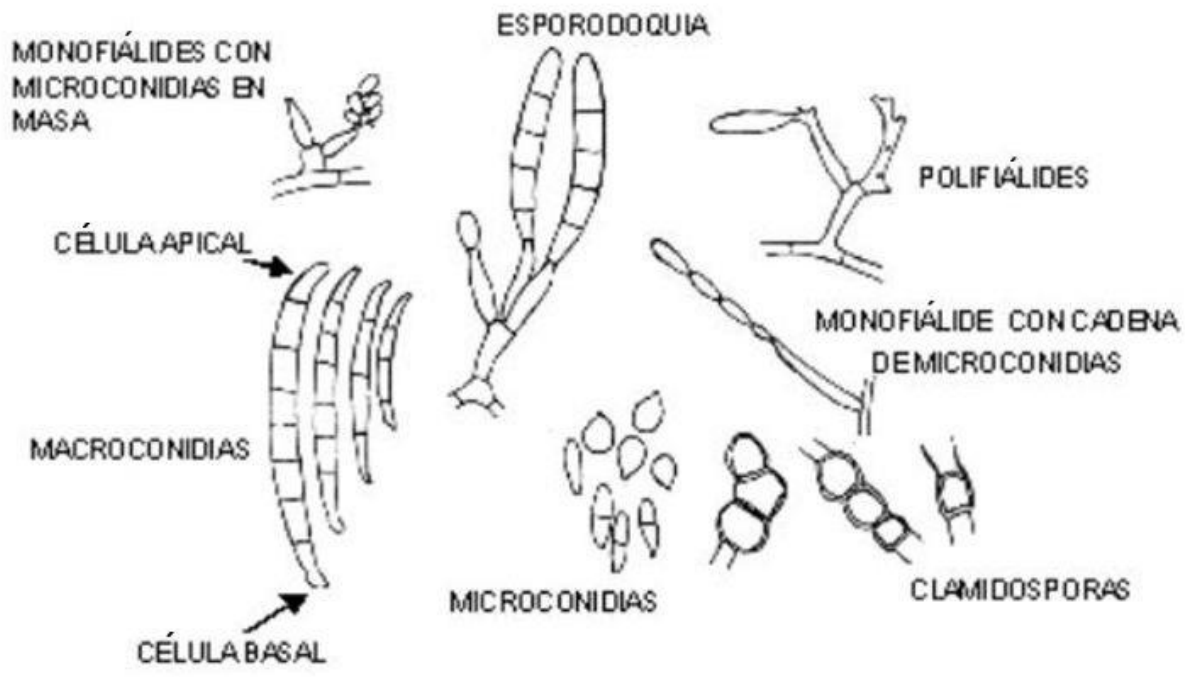


Figura 6. Características morfológicas microscópicas del género *Fusarium*. (Fuente. Monzón y Rodríguez, 2001).

***Fusarium verticillioides*.** *Fusarium verticillioides* Sacc. Nirenberg (= *F. moniliforme*) es el hongo prevalente transmitido en semillas de maíz en una amplia distribución geográfica (Figura 7), pero se ha reportado un predominio en regiones tropicales y subtropicales húmedas. Las fumonisinas, los principales metabolitos tóxicos producidos por este hongo, se han relacionado en intoxicaciones de origen animal y su posible papel como agente promotor del cáncer, las incluye en el grupo de micotoxinas extensivamente investigadas (Ono y col., 2010).

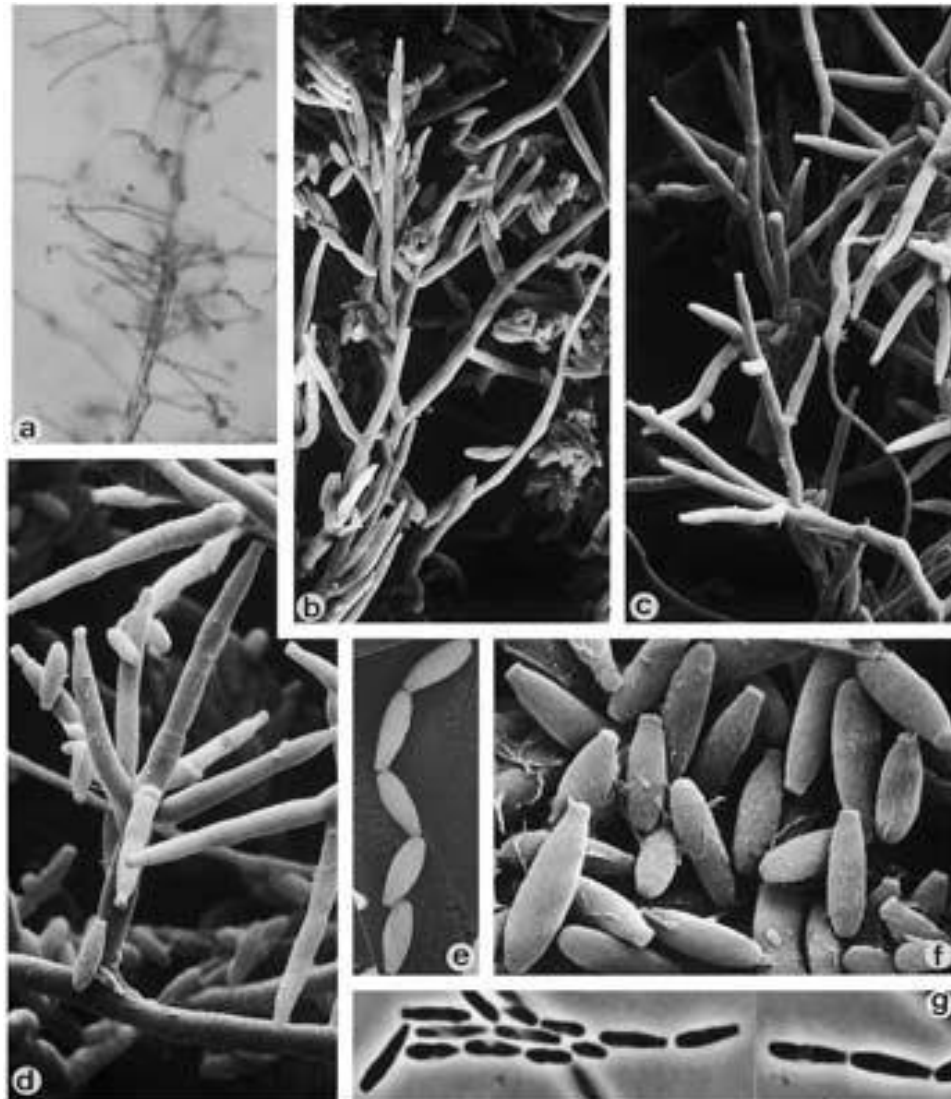
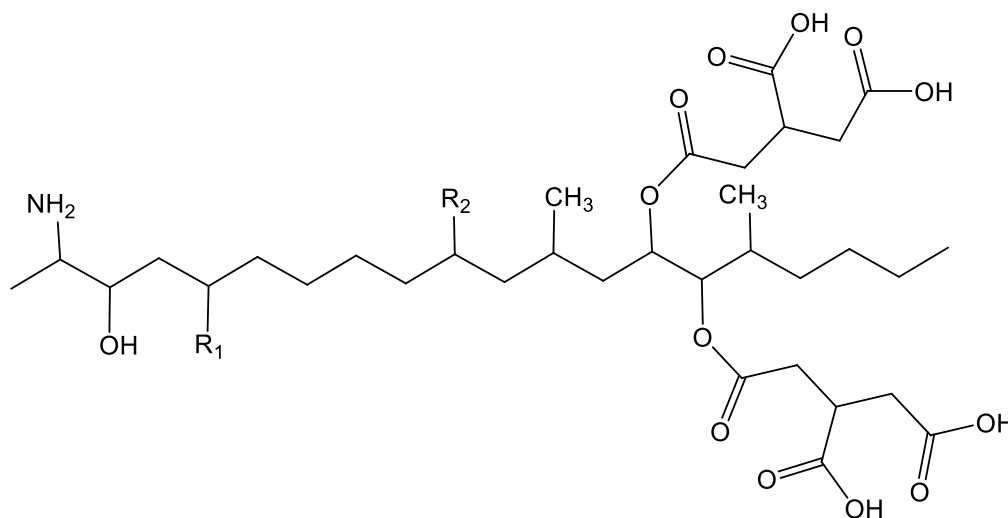


Figura 7. *Fusarium verticillioides*, (a) Monofiálides con cadenas de conidios; (b-d) conidióforos y microconidios; (e-g) microconidios. (Fuente. Mycobank, 2015).

A diferencia de otros hongos que son estrictamente biótrofos, *F. verticillioides* no genera estructuras especializadas que faciliten la entrada al tejido y a las células. Sin embargo, es capaz de producir cantidades importantes de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso infeccioso. Entre las micotoxinas que sintetiza esta especie se encuentran ácido fusárico, fusarina C, naftoquinonas, moniliformina y las fumonisinas. Estas últimas son las más abundantes (de la Torre-Hernández y col., 2014).

**Fumonisininas.** Las fumonisininas (FBs) son micotoxinas producidas por algunas especies del complejo de especies *Gibberella fujikuroi*, de las cuales *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son las más estudiadas (*Gibberella* es una forma teleomórfica del género *Fusarium*). Se ha demostrado que la fumonisinina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) (Figura 8) es la responsable de la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino. Asimismo, se ha citado su capacidad hepatotóxica y hepatocarcinogénica en ratas. Estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición humana a la FB<sub>1</sub> provoca cáncer de esófago y defecto en el tubo neural en los recién nacidos (Abarca y col., 2000; Khaldi y Wolfe, 2011; Xing y col., 2014). El inicio y la progresión de enfermedades asociadas a fumonisininas están estrechamente correlacionadas con la interrupción del metabolismo de los esfingolípidos. La FB<sub>1</sub> inhibe la ceramida sintasa (esfinganina N-aciltransferasa), enzima responsable de la acilación de esfinganina en la vía biosintética de novo de los esfingolípidos. En las células expuestas a FB<sub>1</sub>, la esfinganina se acumula rápidamente y las ceramidas disminuyen, concomitante con el aumento de la fragmentación del ADN, disminución de la viabilidad, pérdida de regulación de la diferenciación, y la morfología apoptótica (Shim y Woloshuk, 2001).



	<u>R1</u>	<u>R2</u>
Fumonisinina B1	OH	OH
Fumonisinina B2	OH	H
Fumonisinina B3	H	OH
Fumonisinina B4	H	H

Figura 8. Estructura de fumonisininas serie B. (Fuente. Cortez-Rocha y col., 2012).

## Métodos de Control de Hongos

Los hongos fitopatógenos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y su enorme capacidad de reproducción, lo que con frecuencia dificulta su control. Los métodos utilizados para el combate, control y prevención de enfermedades de diferentes cepas de hongos en muchos cultivos, por lo general, se dividen en tres grupos de acuerdo con el origen de la sustancia o acción con la cual se controla: métodos químicos, físicos y biológicos. Actualmente, es común el uso integral de todo tipo de métodos de control, práctica que se conoce como manejo integrado de plagas. Todos los métodos tienen ventajas y desventajas, pero la elección de uno específico para un cultivo en particular depende del estado de la enfermedad (Juárez-Becerra y col., 2010; Pietro y col., 2013).

Los métodos químicos se basan en la utilización de compuestos químicos sintéticos, eficaces y de bajo costo. Su mecanismo de acción radica principalmente en la inhibición de la producción de ergosterol. Sin embargo, presentan un problema: alta toxicidad y acumulación de la sustancia activa en los alimentos. Los productos químicos antimicrobianos tales como benzimidazoles, hidrocarburos aromáticos e inhibidores de la biosíntesis de esterol (por ejemplo, imazalil, un inhibidor de la desmetilación del esterol) se han utilizado durante décadas en el control de enfermedades de las plantas en la agricultura. Recientemente, dos fungicidas, cada uno con diferente modo de acción, se han vuelto importantes en el mercado: el pirimetanil (anilino) y el fludioxonil (fenilpirrol). El uso indiscriminado y excesivo de fungicidas en cultivos ha sido una causa importante de la evolución de las poblaciones de patógenos resistentes, lo que resulta en el uso de concentraciones más altas de estos antifúngicos y el consiguiente aumento de residuos tóxicos en los productos alimenticios. Algunos de estos compuestos no son biodegradables, por lo que pueden acumularse en el suelo, las plantas y el agua, y por lo tanto afectan a los humanos a través de la cadena alimentaria, por lo cual se ha reducido su aceptación (da Cruz Cabral y col., 2013; López-Meneses, 2014).

Otros métodos utilizados son los biológicos, los cuales hacen uso de organismos antagonistas, como hongos y bacterias, que compiten por el sustrato contra los hongos patógenos, esto sin causar daño al cultivo (simbiosis) como es el caso de *Trichoderma* spp. Por otro lado, se encuentran los métodos físicos; como la rotación de cultivos, la plantación de distintos sustratos y la solarización. Sin embargo, estos métodos son utilizados sólo como prevención y no son tan efectivos por sí mismos, por lo que deben ir en conjunto con otros métodos de control. Por lo anterior está claro que los métodos químicos siguen siendo los más eficaces para combatir las enfermedades de los cultivos, sin embargo, los problemas de

toxicidad generados a corto, mediano o largo plazo siguen siendo un inconveniente para la salud pública. Aunque el manejo integrado de plagas ha dado buenos resultados, es importante el estudio de métodos alternativos que reduzcan el uso de agentes químicos con efectos tóxicos (Pietro y col., 2013)

## **Métodos Alternativos**

Hoy en día, existe una preocupación mundial por el uso generalizado de plaguicidas, los cuales tienen desventajas significativas que incluyen el aumento de los costos, manejo de riesgos, la preocupación por los residuos de éstos en los alimentos, y la amenaza hacia la salud humana y el medio ambiente. La conciencia pública de estos riesgos ha aumentado el interés en la búsqueda de plaguicidas más

seguros o protectores de alimentos alternativos para sustituir los plaguicidas sintéticos. Por lo tanto, ha aumentado el interés por los productos naturales con actividad antimicrobiana para preservar la calidad y cantidad de los alimentos, ya que tienden a tener baja toxicidad en los mamíferos, menos efectos ambientales y son de amplia aceptación pública. Se necesita con urgencia la explotación de sustancias naturales como los aceites esenciales, que son más seguros para los consumidores y el medio ambiente, para el control de enfermedades poscosecha y su uso eficaz contra cepas tanto de tipo silvestre como de las resistentes a los plaguicidas. Además, la demanda para la reducción en el uso de plaguicidas en la agricultura aumenta el interés de la aplicación de aceites esenciales para controlar patógenos de las plantas (Daferera y col., 2003; Soliman y col., 2013).

**Aceites esenciales.** El término aceite esencial (AE) es utilizado para referirse a sustancias líquidas, volátiles, de carácter lipofílico y con fuertes propiedades aromáticas. Estas sustancias son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios y pueden ser extraídas de ellas mediante métodos físicos como la destilación a vapor o hidrodestilación. Dado que se encuentran en prácticamente todos los vegetales son muy numerosos, y están ampliamente distribuidos en distintas partes de mismo vegetal; en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Son mezclas de componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas (Hernández-Sánchez, 2011; Juárez-Becerra y col., 2010).

Muchas hierbas, especias y sus extractos poseen actividad antimicrobiana, lo que minimiza las dudas con respecto al uso seguro de los aceites esenciales en productos alimenticios. La composición y estructura, así como los grupos funcionales de los aceites,

juegan un papel importante en la determinación de su actividad antimicrobiana. Por lo general, los compuestos con grupos fenólicos son más eficaces. Entre estos, los aceites de clavo, tomillo, canela, romero, salvia y la vainillina se han encontrado ser más consistentemente eficaces contra los microorganismos (Hosseini y col., 2009).

La presencia de hongos toxigénicos y micotoxinas en los alimentos y granos almacenados representan un peligro potencial para la salud humana y animal. Diversos investigadores han utilizado aceites esenciales como el de canela, menta, albahaca y tomillo para proteger al grano de maíz contra la infección por *A. flavus*, y se ha reportado que estos no afectan la germinación ni el crecimiento del maíz. Otros autores reportan que los aceites esenciales de canela y clavo, presentan un efecto inhibitorio relevante sobre el crecimiento de *Aspergillus* y la producción de aflatoxinas cuando se aplicó en nueces que se almacenaron por varios días. Se concluyó que se pueden aplicar con seguridad en alimentos como en grano y semillas, como conservadores y como sustitutos de fungicidas químicos. También determinaron efecto inhibitorio de extractos acuosos de estos mismos aceites a concentraciones de 5% y 10%, sobre el 100% del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*, hasta 72 horas de incubación (Castaño-Sepúlveda, 2012; Soliman y Badeaa, 2002).

**Clavo (*Syzygium aromaticum*)**. El clavo de olor (*Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*) es una especia perteneciente a la familia *Myrtaceae*, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales. Crece en suelos ricos en humus arcillosos, así como en suelos lateríticos (proprios de las regiones cálidas, pobres en sílice y altos en hierro y alúmina), profundos y sueltos. Se obtiene de un árbol perenne que florece dos veces al año. Los tallos, las hojas y los botones sin abrir (Figura 9) son las partes de esta especia que se utiliza principalmente para la extracción de aceite esencial. Es una especia de consumo habitual que se utiliza en la preparación de varios platos en muchos hogares, por lo tanto, hace que sea una especia valiosa en el mundo. Los brotes de clavo son de color marrón oscuro y poseen olor intenso y ligeramente astringente. Se consumen como especias, enteras o molidas en polvo, y se mezclan en las dietas que contienen cereales, legumbres, frutos secos, frutas, verduras, leche y productos lácteos. Aparte de su uso con fines culinarios, también se ha utilizado durante varios siglos en el folklore como tratamiento de inflamación, daño hepático, cáncer, diabetes, y otras enfermedades inducidas por el estrés oxidativo, probablemente debido a la abundancia de compuestos bioactivos tales como constituyentes volátiles (por ejemplo, eugenol) y no volátiles



(por ejemplo, polifenoles, taninos, terpenos y triterpenos y esteroides) (Adefegha y col., 2015; Aguilar-González y López-Malo, 2013).



Figura 9. *Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllata*: brotes y hojas de la planta (A); brotes secos (clavo de olor) (B). (Fuente. Top Tropicals, 2016).

El aceite esencial de clavo está formado por una gran variedad de compuestos. Su composición varía dependiendo de su procedencia. Entre sus componentes destaca eugenol (49-98%) como compuesto mayoritario,  $\beta$ -cariofileno (4-21%) y eugenil acetato (0,5-21%). Además, también se pueden encontrar pequeñas cantidades de  $\alpha$ -humuleno y trazas (<1%) de otros 25 a 35 constituyentes. Ha sido descrito que el aceite esencial del clavo y su principal componente, el eugenol, poseen efecto insecticida, herbicida, antifúngico, antibacteriano, antioxidante, antiinflamatorio, anestésico, antimutagénico y anticancerígeno. El eugenol ha mostrado actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*, y se ha demostrado que la mezcla de la oleorresina del clavo con solución de glucosa produce un fuerte efecto fungicida reduciendo el tamaño del inóculo. Se ha reportado daño morfológico significativo con deformidad celular en *Saccharomyces cerevisiae* por el aceite de clavo. Se ha informado también sobre la actividad fungicida del aceite esencial *E. caryophyllata* en varias especies de hongos transmitidos por los alimentos y se observó en un estudio reciente que el aceite esencial de clavo de olor, incluso inhibió el crecimiento de *Aspergillus niger* (Chaieb y col., 2007; Hernández-Sánchez, 2011; Xie y col., 2015).

**Canela (*Cinnamomum zeylanicum*)**. El género *Cinnamomum*, pertenece a la familia *Lauraceae*, nativa de Sri Lanka. Son árboles de hojas perennes que comprenden varias especies, y la mayoría son aromáticas, contiene más de 300 árboles de hoja perenne y

arbustos aromáticos. Cuatro especies tienen gran importancia económica por sus múltiples usos culinarios como especias comunes en todo el mundo: *Cinnamomun zeylanicum* Blume (sinónimo de *Cinnamomun verum* J. Presl, conocido como canela de Sri Lanka), *Cinnamomun loureiroi* Nees (conocida como canela vietnamita), *Cinnamomun burmanni* (Nees y T. Nees) Blume (conocida como la canela de Indonesia) y *Cinnamomun aromaticum* Nees (sinónimo de *Cinnamomun cassia* (L.). J. Presl, conocida como canela china) (Nabavi y col., 2015; Narváez-Guerrero, 2006).

El término canela se refiere comúnmente a la corteza seca de *C. zeylanicum* y *C. aromaticum*, se utiliza para la preparación de diferentes tipos de chocolate, bebidas, caramelos picantes y licores. Por otra parte, la canela se utiliza en diversos platos salados, encurtidos, sopas y dulces persas. La corteza de canela, hojas, flores y frutas se utilizan para preparar los aceites esenciales, los cuales están destinados para uso en cosméticos o productos alimenticios. Asimismo, según la medicina china tradicional (que data aproximadamente 4000 años), la canela se ha utilizado como un agente neuroprotector y en el tratamiento de la diabetes. La canela también se ha utilizado como un agente de promoción de la salud para el tratamiento de enfermedades tales como inflamación, trastornos gastrointestinales e infecciones urinarias. Otro uso médico potencial de canela sería con respecto a sus propiedades antimicrobianas, especialmente actividad antibacteriana. Según la FAO, el aceite de hoja de canela (Figura 10) contiene 75-85% de eugenol con una alta actividad antibacteriana, y contiene 5% de cinamaldehído, el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas. En 1995, se identificaron 53 componentes en el aceite de hoja de canela, el mayor componente fue eugenol (81-84.5%). Otros componentes químicos del aceite esencial son principalmente carbonilos, aldehído cinámico, o-metoxialdehído cinámico, hidrocarbonatos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cimeno,  $\alpha$ -felandreno), aldehídos (benzílico, cumínico, nonílico, furfural), cetonas (metil amil cetona) y también trazos de alcohol (linalool) entre otros (Nabavi y col., 2015; Narváez-Guerrero, 2006).



Figura 10. *Cinnamomum zeylanicum*: brotes y hojas de la planta (A); corteza seca y hojas de la planta (B). (Fuente. Top Tropicals, 2016).

Por otro lado, varios autores han reportado acción antifúngica por parte del aceite esencial de canela. Velluti y col. (2003) mencionan que el aceite de canela es capaz de inhibir el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus*. Asimismo, Xing y col. (2014), reportaron que este aceite fue capaz de degradar la fumonisina B1 hasta en un 66.65%, en comparación con otros aceites.

La acción antifúngica del aceite de hoja de canela involucra granulación del citoplasma, ruptura de la membrana citoplasmática o inactivación y/o inhibición de enzimas celulares. Estos eventos biológicos podrían tomar lugar separadamente o concomitantemente culminando con la inhibición de la germinación micelial (Narváez-Guerrero, 2006).

**Tomillo (*Thymus capitatus*)**. El tomillo pertenece a la familia *Lamiaceae*. Es una planta aromática, vivaz, leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40 cm de altura, con numerosas ramas leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blanco-aterciopeladas. Las hojas de 3 a 8 mm son lineares, oblongas, sentadas o brevemente pediceladas, opuestas, tomentosas, sin cilios, con el pecíolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas en su envés. Las flores (Figura 11) son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, formando una especie de capitulo terminal, a veces, con inflorescencia interrumpida. Es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su aceite, en la que ya se han detectado siete quimotipos. El aceite esencial contiene carvacrol y timol en porcentaje del 20 al 70%, según las

razas; también contiene p-cimeno, terpinenos, linalool, borneol y sus esteres acéticos, cíñelo, geraniol, cariofileno (Lizcano-González, 2007).



Figura 11. Tallos, hojas y flor de *Thymus capitatus*. (Fuente. Top Tropicals, 2016).

Muchos autores han reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y radical-eliminadoras de aceites esenciales. Se ha reportado que los aceites esenciales de tomillo tienen actividad antimicrobiana, la mayoría de los cuales están mediadas por el timol y el carvacrol, que son los componentes fenólicos del aceite. Estos compuestos han sido probados en diversos microorganismos de importancia en alimentos como: *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Rhizobium leguminosarum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio vulnificus* y *Bacillus cereus*, entre otros (Bounatirou y col., 2007; García-García y Palou-García, 2008).

También se ha informado de actividades espasmolíticas, así como antioxidantes para el extracto fenólico del aceite de la planta. Existe alguna evidencia de que los componentes menores juegan parte crítica en actividades biológicas, posiblemente mediante la producción de un efecto sinérgico entre otros componentes. Varios estudios se han centrado en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de tomillo con el fin de identificar los compuestos responsables. Los fenoles parecen jugar un papel destacado. Estos fenoles de terpeno se unen a los grupos amina e hidroxilamina de las proteínas de la membrana bacteriana que alteran su permeabilidad y que resulta en la muerte de las bacterias (Bounatirou y col., 2007).

### **Conservación de Aceites Esenciales**

Aunque los aceites esenciales han demostrado ser buenos agentes antimicrobianos, su uso para el mantenimiento de la calidad de los granos y frutos, y reducción de la descomposición por hongos es a menudo limitado debido a su naturaleza. Los aceites esenciales son conocidos por ser materiales sensibles, altamente volátiles a temperatura ambiente, y también pueden fácilmente sufrir degradación en presencia de luz y oxígeno ambiental, así como bajo la acción de temperaturas moderadas. Por lo tanto, la liberación controlada es crucial para obtener los máximos beneficios de la utilización de los AE como agentes antimicrobianos (Beiky y col., 2014; Mohammadi y col., 2015).

### **Microencapsulación**

La microencapsulación es una técnica que se ha aplicado para preservar y/o proteger numerosos ingredientes. Puede considerarse una forma especial de empacar materiales sólidos, líquidos y gaseosos en miniatura. El material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente, de la reacción con otros compuestos o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Permite proteger del ambiente a sustancias sólidas o líquidas, divididas en pequeñas partículas o gotas (fase interna), recubriéndolas con una película de carbohidratos u otro material polimérico (pared). El material del núcleo o fase interna se difunde gradualmente a través de las paredes de la cápsula, lo que ofrece propiedades de liberación controlada bajo las condiciones deseadas. Por lo tanto, la tecnología de microencapsulación (Figura 12) se puede utilizar para liberar componentes bioactivos, mejorando la manipulación de sus propiedades (Bakry y col., 2016; López-Hernández, 2010).

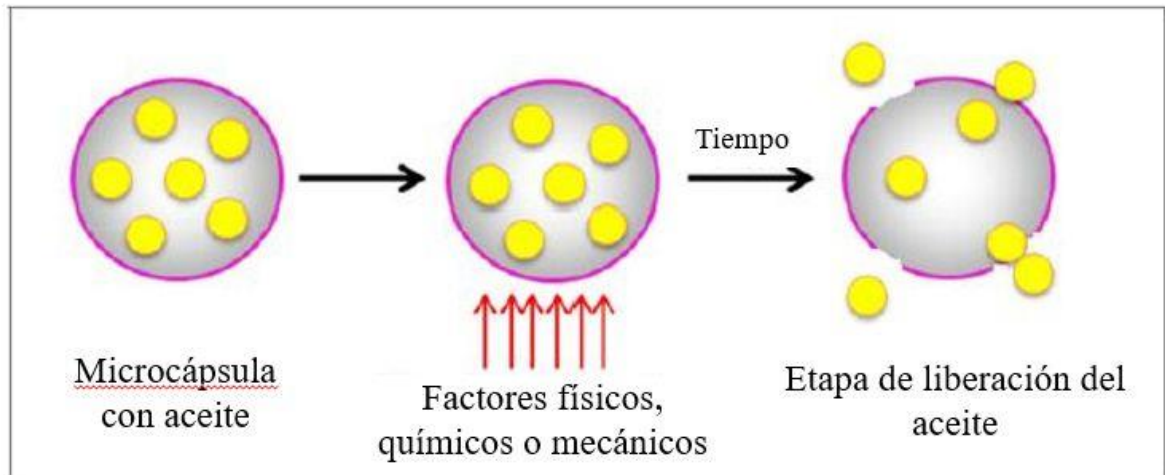


Figura 12. Diagrama esquemático del mecanismo de liberación controlada del aceite. (Fuente. Bakry y col., 2016).

La selección de la técnica de microencapsulación adecuada se rige por las propiedades físicas y químicas del núcleo y el material encapsulante, así como por la aplicación que se le dará a las microcápsulas obtenidas (Figura 13). Los materiales encapsulantes normalmente son materiales capaces de formar películas y se pueden seleccionar de una amplia variedad de polímeros naturales o sintéticos, dependiendo del compuesto a encapsular. El quitosano tiene una ventaja importante sobre otros agentes de encapsulación, que es la posibilidad de establecer enlaces covalentes o iónicos con los agentes de reticulación, la construcción de una red de clase, en la que se retiene la sustancia activa. En consecuencia, estos enlaces químicos llevan ventajas en términos de liberación controlada (Flores-Belmont y Jiménez-Munguía, 2013; Souza y col., 2014).

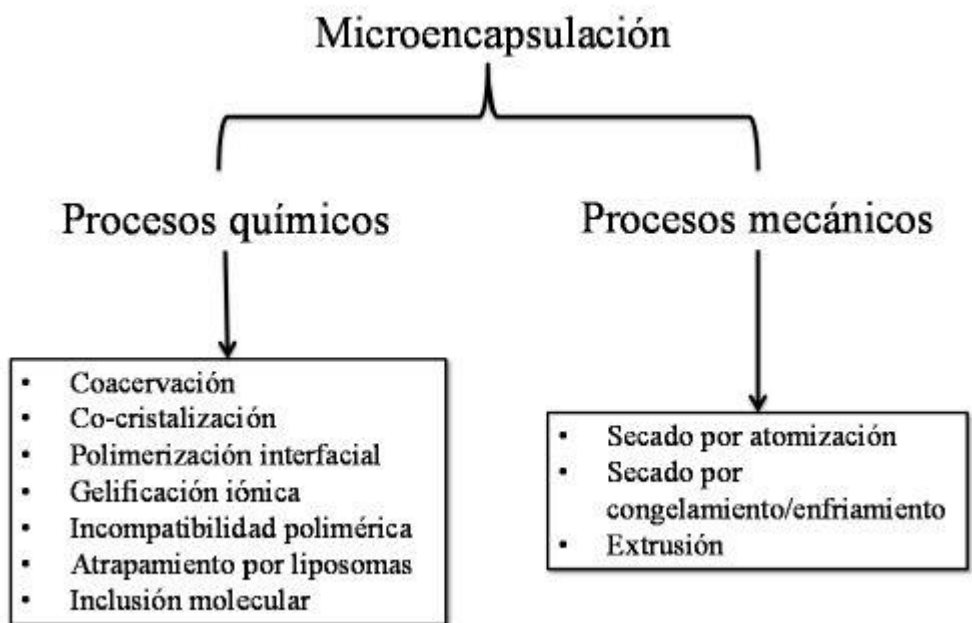


Figura 13. Esquema de los diferentes métodos de microencapsulación. (Fuente. Flores-Belmont y Jiménez-Munguía, 2013).

**Quitosano como agente encapsulante.** En 1859, Rouget descubrió el quitosano al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio obteniendo un compuesto soluble en ácidos orgánicos, al cual llamó “quitina modificada”, y en 1894, Hoppe-Seyler le otorgó el nombre de quitosano (Flores-Belmont y Jiménez-Munguía, 2013).

El quitosano es un polímero constituido por unidades de  $\beta$ -(1,4)-2 acetamido-2-desoxi-D-glucosa (N-acetilglucosamina) y  $\beta$ -(1,4)-amino-2-desoxi-D-glucosa (glucosamina), que tiene propiedades policationicas y potencial para controlar pudriciones poscosecha. Es producido por la N desacetilación alcalina parcial de la quitina, que se extrae comercialmente de la cáscara de camarón y cangrejo (Figura 14). El quitosano también se encuentra en la naturaleza, como en la pared celular de los hongos de la clase de los Zygomycetes y en la cutícula de insectos. Desde el punto de vista fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble que puede formar películas, hidrogeles, andamios porosos, fibras, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. Además, el carácter policationico le confiere al quitosano alta afinidad para asociar macromoléculas terapéuticas (p. ej. insulina, pADN, siARN, heparina, etc.) y antigénicas, a las cuales protege de la degradación enzimática e hidrolítica (Alvarado-Hernández y col., 2011; Goycoolea y col., 2009; Raafat y col., 2008).

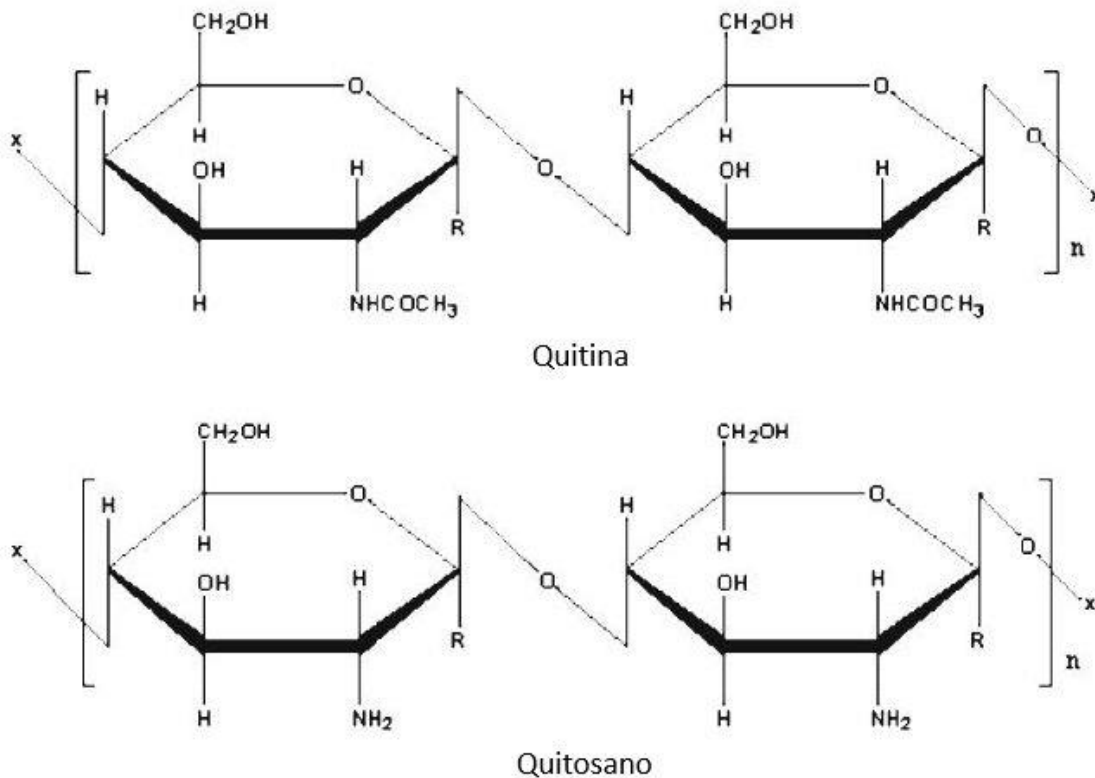


Figura 14. Estructura química de la quitina y el quitosano. (Fuente. Xing y col., 2015)

Una de las características más atractivas del quitosano es su actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica. Recientemente, ha aumentado la utilización de quitosano como conservador de alimentos o adyuvante en la agricultura para proteger o estimular la defensa de diferentes cultivos. Su carácter antimicrobiano es debido principalmente a la presencia de grupos amino, cargados positivamente, que interactúan con la membrana celular de la bacteria, cargada negativamente, provocando el deterioro de las proteínas y de otros componentes de la membrana de los microorganismos (de Oliveira y col., 2013; León y Santiago, 2007).

La actividad antimicrobiana del quitosano dependerá en gran manera de aquellos factores que ayuden a acentuar las cargas positivas en la cadena del biopolímero. Entre estos factores cabe destacar el grado de desacetilación, la distribución de los grupos desacetilados a lo largo de la cadena, la longitud de la cadena, la distribución de los pesos moleculares, el pH, la fuerza iónica del medio, el contraión asociado en su forma sal y la temperatura. En ese sentido, la dependencia de la carga con respecto al grado de desacetilación es lineal debido a



que los quitosanos más desacetilados (de una misma longitud de cadena) tendrán mayor número de grupos aminos libres para ionizar, lo cual dependerá obviamente del pH del medio; asimismo, un peso molecular mayor implicará una molécula con más grupos cargados (para un mismo grado de desacetilación y al mismo pH) y una mayor interacción electrostática con grupos cargados negativamente. De igual modo, la actividad fungicida del quitosano se ha asociado desde hace mucho a su carácter catiónico. La interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los hongos, cambian la permeabilidad de la membrana plasmática, con la consecuente alteración de sus principales funciones (Velásquez, 2008).

## HIPÓTESIS

Las microcápsulas de quitosano con aceites esenciales de plantas con propiedades antifúngicas como el tomillo, clavo y canela, inhiben el crecimiento radial y la germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. Asimismo, previenen la producción de aflatoxinas y fumonisinas totales por *A. parasiticus* y *F. verticillioides*, respectivamente.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de Materia Prima**

La materia prima utilizada consistió de aceites esenciales (AE) comerciales marca Sigma Aldrich®: clavo (*Syzygium aromaticum*, clove leaf oil Indonesia w-23250-5), canela (*Cinnamomum zeylanicum*, cinammon leaf oil w-22921-0) y tomillo (*Thymus capitatus*, organum oil w-28281-2). Asimismo, se utilizó quitosano (QT) comercial de baja viscosidad elaborado de cabeza de camarón, de bajo peso molecular y con grado de desacetilación > 75.0 % [Sigma Aldrich® (448869)].

### **Preparación de las Microcápsulas**

Para la elaboración de las microcápsulas (MC) se siguió la técnica de gelificación ionotrópica descrita por Cota-Arriola y col. (2013) y para ello se preparó una solución de quitosano de bajo peso molecular al 0.5 % (p/v) en ácido acético al (0.1 M).

Se tomaron 2 mL de cada aceite puro y se mezclaron individualmente con 8 mL de solución Tween 80 (0.1%, v/v). Posteriormente cada una de ellas fue mezclada con 80 mL de la solución de quitosano preparada y fue homogenizada con un Braun (Hamilton Beach, 59770). Cada mezcla se roció con un atomizador sobre un vaso de precipitado de 3.5 L conteniendo 240 mL de tripolifosfato de sodio (TPP, 0.02%, p/v), el cual fue utilizado como agente entrecruzante, y se agitaron magnéticamente por 15 min, obteniéndose las microcápsulas.

### **Caracterización de las Matrices de QT-TPP con Incorporación de AE**

El potencial zeta (Pz) es definido como la potencia electrostática que hay entre la separación de las capas que rodean a la partícula, pero también como una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Es considerado un análisis fundamental en la caracterización de partículas, ya que determina su carga superficial, estabilidad y funcionalidad (Du y col., 2009).

El potencial zeta y tamaño de las microcápsulas de QT-TPP con AE fue determinado, de acuerdo al método utilizado por Liu y Gao (2009), utilizando un equipo Zetasizer Nano-25 (Malvern Instruments) a 25 °C. Para ello las microcápsulas fueron suspendidas y lavadas con buffer de acetato 0.03 M a pH 5.6 mediante diálisis, utilizando una membrana de 12 KDa

(Sigma-Aldrich). La solución presente dentro de la membrana que contenía las microcápsulas se diluyó 1:100 (v/v) con agua deionizada para evitar agregación de las mismas. La solución se depositó en una celda capilar electromagnética y se determinó el potencial zeta. Para este análisis se usó como control la matriz de QT-TPP sin AE. Se hicieron tres repeticiones de cada una de ellas y se reportó el promedio y su desviación estándar.

### **Cultivos Fúngicos**

Se empleó una cepa de *Aspergillus parasiticus* (ATCC 16992) y una de *Aspergillus niger* NRRL-3, ambas de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología y Micotoxinas del Departamento de Investigación de Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora. Las cepas se inocularon en matraces con agar papa dextrosa (PDA) [DIFCO, U.S.A], e incubaron en oscuridad a  $27 \pm 2$  °C (incubadora Felisa) durante 7 días hasta su esporulación.

También se utilizó una cepa de *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme* ATCC 52539), la cual fue cultivada de la misma forma, pero a temperatura de  $25 \pm 2$  °C (Incubadora Thermo Scientific PRECISION) con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Una vez desarrolladas todas las cepas, las esporas fueron resuspendidas en solución Tween 20 (0.1 %, v/v) mediante agitación magnética por 5 min. La concentración de esporas en cada suspensión se determinó mediante conteo en una cámara de Neubauer, ajustándose a una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL, y estas se mantuvieron en refrigeración a 4°C (López-Meneses, 2014).

### **Elaboración de Medio Czapek con Aceites Esenciales**

Se esterilizaron cuatro tubos Falcon de 50 mL y se le agregó a cada uno 25 mL de solución Tween 80 (1%), en la cual se disolvió la cantidad de aceite esencial previamente calculada para obtener concentraciones finales de 100, 500, 750 y 1,000 ppm. Posteriormente en esta mezcla se adicionaron 25 mL de medio de cultivo Czapek y se mezcló todo en vortex hasta homogeneización. Seguidamente se vació cada una de estas en placas de Petri de 5 cm de diámetro con capacidad de 12.5 mL. Este proceso se realizó para cada uno de los aceites esenciales en cada una de las concentraciones previamente mencionadas.

Del mismo modo se prepararon las placas para los controles. Se utilizó como control positivo al fungicida comercial Terravax® (Captan 20% + Carboxin 20 %) 2.5 g/L]. Para ello se agregaron 25 mL del medio de cultivo y 25 mL de la solución fungicida en un tubo Falcon y se

agitó en vortex. Otro control empleado fue con Tween 80 y para ello se repitió el proceso descrito anteriormente, pero cambiando la solución Terravax por Tween 80. Por último, se utilizó control Czapek el cual consistió en medio de cultivo Czapek puro. Todos los controles se vaciaron en placas de Petri de igual dimensión.

### **Elaboración de Medio Czapek con Microcápsulas**

En tubos Falcon de 50 mL estériles se agregó medio de cultivo Czapek previamente esterilizado, y una cantidad de microcápsulas previamente calculada para obtener concentraciones de 100, 500, 750 y 1000 ppm en ellos. Se mezclaron en vortex y se vació el contenido en placas de Petri con capacidad de 12.5 mL. Se realizó este proceso por triplicado para la preparación del medio con las microcápsulas de cada uno de los aceites en sus respectivas concentraciones.

Se prepararon además placas control; control Czapek (medio Czapek puro), control TPP (medio Czapek + tripolifosfato de sodio al 0.02% en relación 7:3) y control QT (medio Czapek + quitosano al 0.5%, relación 7:3). Del mismo modo, se mezcló el medio de cultivo con la cantidad de cada control en un tubo Falcon y se homogenizó utilizando el vortex.

### **Evaluación de la Actividad Antifúngica**

#### **Crecimiento Radial**

**Técnica de inoculación por “siembra en pozo”.** Se utilizó la técnica descrita por Quintana-Obregón y col. (2011), para ello se empleó una suspensión de esporas de cultivos de las cepas en estudio de siete días de incubación. Las esporas fueron suspendidas en solución Tween 20 al 0.1 % (v/v).

En cada una de las placas de Petri preparadas previamente se hizo un pozo de 6 mm de diámetro en el centro y se inoculó en él una suspensión de  $1 \times 10^5$  de esporas/mL de cada uno de los hongos en cajas individuales. Las cepas de *A. parasiticus* y *A. niger* se incubaron a temperatura de  $27 \pm 2$  °C, mientras que la de *F. verticillioides* a  $25 \pm 2$  °C. Cada 24 horas se midió manualmente el radio de la colonia hasta que en los controles se cubrió el 80-90% de la superficie de la placa. Esta técnica se aplicó tanto en la evaluación de los aceites esenciales puros, como en la evaluación con las microcápsulas.

Para la evaluación de los AE, los controles utilizados fueron: control Czapek (medio de cultivo sin el tratamiento), control Tween 80 (medio Czapek con solución detergente Tween 80 al 1 %) y control Terravax [medio Czapek y solución fungicida Terravax.

En la evaluación de las microcápsulas los controles utilizados fueron: control Czapek, control TPP (medio de cultivo con TPP al 0.02%), control QT (medio de cultivo y solución de quitosano al 0.5%) y control Terravax. El experimento se llevó a cabo por triplicado para cada uno de los tratamientos para cada especie de hongo.

El porcentaje de inhibición fue calculado con respecto al control Tween 80 utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición radial} = [1 - (R_i / R_c)] \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Donde  $R_c$  es el radio promedio de la colonia en el medio control, y  $R_i$  es el radio de la colonia en medio con aceite esencial (Martínez-Camacho y col., 2010).

### **Determinación de Dosis Medias Inhibitorias ( $DI_{50}$ )**

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición de crecimiento radial en cada uno de los tratamientos, se utilizó la función Probit del programa estadístico NCSS para determinar las dosis medias inhibitorias ( $DI_{50}$ ) de los aceites para cada uno de los hongos.

### **Germinación de Esporas**

Se evaluó el efecto de los AE en la germinación de esporas utilizando las concentraciones de 100, 500, 750 y 1000 ppm. Se utilizó medio líquido Czapek, el cual fue aforado en un tubo Eppendorf de 2 mL con la cantidad de AE previamente calculada, utilizando Tween 80 (1%) como disolvente para tener un volumen final de 1.0 mL. Todo esto se mezcló en vortex hasta su homogenización. Se realizó este procedimiento para cada uno de los tratamientos por cuadruplicado. Los controles utilizados fueron los mismos que se reportan para crecimiento radial.

Todos los tubos fueron inoculados con una suspensión de  $1 \times 10^5$  de esporas/mL de cada uno de los hongos. *A. parasiticus* y *A. niger* se incubaron a  $27 \pm 2$  °C, y *F. verticillioides* a  $25 \pm 2$  °C. Posteriormente se tomó una alícuota de 10  $\mu$ L de cada uno de los tubos, la cual se depositó en un portaobjetos colocando sobre ella un cubreobjetos y fue llevada a un microscopio óptico donde se contaron 100 esporas al azar, determinando así el número de

esporas germinadas y no germinadas. El conteo se realizó por triplicado a las 0, 3, 9, y 15 horas para cada tratamiento en todas las concentraciones.

Este bioensayo se realizó nuevamente, pero utilizando las microcápsulas en lugar de los aceites esenciales, empleando las  $DI_{50}$  obtenidas anteriormente para cada tratamiento. Se utilizaron tres controles: Control Czapek puro, Control TPP (Medio Czapek + TPP al 0.02% en relación 7:3) y Control quitosano (QT) [Medio Czapek + QT al 0.5%, en relación 7:3]. Se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación con respecto al control Tween mediante la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición de germinación} = [(\%Sc - \%St) / \%Sc] \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

En donde %Sc es el porcentaje de esporas germinadas en el control (Tween en la evaluación de los aceites esenciales y Czapek en evaluación de las microcápsulas) y, %St el porcentaje de esporas germinadas para cada tratamiento (López-Meneses, 2014).

## Evaluación de Microcápsulas en la Producción de Micotoxinas

### Fumonisinias Totales (FB's)

La determinación de fumonisinias totales se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por López-Meneses (2014).

**Producción de fumonisinias.** Se utilizó maíz sano como sustrato. Se colocaron 50g de maíz quebrado en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se le ajustó la humedad a 40% por adición de agua y se esterilizó por 15 min a 121°C en dos días consecutivos. Posteriormente, el maíz se trató con 10 mL de buffer acetato de sodio (0.03 M) con el tratamiento en la  $DI_{50}$  estimada de cada uno. Se prepararon cuatro controles: control sin inóculo (maíz con 10 mL de agua), control quitosano (QT) (maíz con 10 mL de solución buffer con microcápsulas de quitosano e inóculo), control agua (maíz con 10 mL de agua e inóculo) y control TPP [maíz con 10 mL de solución de TPP (0.02%) e inóculo]. Cada matraz fue inoculado con una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *F. verticillioides* e incubado en fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad durante 16 días. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

**Extracción de fumonisinias.** Se colocaron muestras de 50 g del maíz inoculado anteriormente en un vaso de licuadora de 500 mL (marca Oster) con 5 g de NaCl. Se adicionaron 100 mL de una solución de extracción [metanol/agua destilada (80:20 v/v)] y se

mezclaron a alta velocidad por un min. Se filtró en papel (Whatman No. 4) y se colectaron 25 mL de extracto. En un vaso de precipitado se colocaron 5 mL del extracto, se mezclaron con 20 mL de buffer (25 g de NaCl + 5 g de bicarbonato + 0.1 mL de Tween en 1 L de agua), y se filtraron a través de microfibra. Se colectó el filtrado limpio el cual se depositó en una columna Fumonitest® (Vicam) (Gallardo-Reyes y col., 2006; VICAM, 2007).

**Cuantificación de fumonisinas.** La columna de Fumonitest® con el filtrado limpio se lavó dos veces con 10 mL de una solución amortiguadora de lavado, haciendo pasar de 1-2 gotas por segundo, y después con 10 mL de una solución de fosfatos (PBS – Aldrich®), respectivamente. Las fumonisinas se eluyeron de la columna haciendo pasar 1.0 mL de metanol puro grado HPLC y se colectaron en un tubo de ensaye al cual se le agregó 1.0 mL del agente derivatizante de VICAM (previamente preparado). Posteriormente, el tubo de ensaye se depositó dentro de un fluorómetro (VICAM series IV) para realizar directamente la lectura de la concentración ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de fumonisina presente en la muestra.

### **Aflatoxinas Totales (AF's)**

La determinación de aflatoxinas totales se llevó a cabo mediante el método descrito en la Norma Oficial Mexicana 188 (NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias).

**Producción de aflatoxinas.** Se utilizó maíz sano como sustrato. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 50 g de maíz (quebrado) y se le ajustó la humedad al 40 % adicionando agua. Se esterilizó por 15 min a 121 °C en dos días consecutivos. Posteriormente, el maíz fue tratado con 10 mL de solución buffer de acetato de sodio al 0.03 M con las microcápsulas en la  $DI_{50}$  estimada de cada tratamiento. Asimismo, cuatro controles fueron preparados: control sin inóculo (maíz con 10 mL de agua), control QT (maíz con 10 mL de solución buffer con las microcápsulas de quitosano e inóculo), control agua (maíz con 10 mL de agua e inóculo) y control TPP (maíz con 10 mL de solución de TPP al 0.02% e inóculo). Cada matraz fue inoculado con una suspensión de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de *A. parasiticus* e incubado en oscuridad durante 16 días a  $27 \pm 2$  °C. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento.

**Extracción de aflatoxinas.** En un vaso de licuadora se colocaron 50 g del grano incubado y se molió a alta velocidad durante un minuto con 100 mL de metanol 80 % y 5 g de



NaCl. El extracto obtenido fue filtrado a través de papel filtro. Una alícuota de 10 mL se diluyó 1:4 con agua destilada y se pasó por un filtro Whatman # 4 a través de una columna de afinidad AflaTest® pre-acondicionada (VICAM).

**Cuantificación de aflatoxinas.** La columna se lavó dos veces con 5 mL de agua destilada pasando de 1 a 2 gotas por segundo. Posteriormente se eluyó a las AF con 1.0 mL de metanol puro grado HPLC, se colectó el eluato en un tubo de ensaye y se le adicionó 1.0 mL del agente derivatizante. El tubo de ensaye se colocó dentro del fluorómetro para la lectura de la concentración (ng/g) de aflatoxinas (López-Meneses, 2014; VICAM series IV, 2007).

### Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño experimental con 3 fuentes de variación para determinar el efecto de los aceites esenciales sobre las cepas de *F. verticillioides*, *A. parasiticus* y *A. niger*, cada una con diferentes niveles:

- Primera fuente de variación: Tipo de aceite esencial con 3 niveles: (Tomillo, clavo y canela).
- Segunda fuente de variación: concentración del aceite con 4 niveles: (100, 500, 750 y 1,000 ppm).
- Tercera fuente de variación: Tipo de microorganismo con 3 niveles: (*F. verticillioides*, *A. parasiticus* y *A. niger*).
- Variables respuesta: Porcentaje de inhibición de crecimiento radial, porcentaje de esporas germinadas, porcentaje de proliferación, concentración de aflatoxinas y fumonisinas.

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante análisis de varianza ANOVA a un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . La comparación de grupos homogéneos se llevó a cabo mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, a un intervalo de confianza de 95 %. Los programas estadísticos utilizados fueron: Microsoft Excel (2013), JMP versión 12 y NCSS.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Caracterización de las Matrices de QT-TPP con la Incorporación de los AE

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos del potencial zeta y tamaño de las microcápsulas. Los valores de potencial zeta indican que las partículas presentan estabilidad física aceptable, ya que se requiere un potencial de  $\pm 30$  mV como mínimo para ello. En el caso de las microcápsulas de QT-AE de canela, estas presentaron una carga superficial negativa mayor que las de los otros dos aceites, pudiéndose deber a la formación de una estructura con carga superficial negativa por los grupos fosfatos del TPP expuestos hacia el exterior de la microcápsula. El potencial zeta que se reporta en diversos estudios de partículas de QT entrecruzadas con tripolifosfato es diverso. Los factores más importantes que intervienen son la concentración de TPP, QT, del compuesto activo y el pH del medio (Du y col., 2008; Du y col., 2009; Harris y col., 2011; Hu y col, 2008; l'ina y col., 2008; Keawchaoon y Yoksan, 2011; Liu y Gao, 2009).

Tabla 1. Potencial zeta (Pz) y tamaño de las microcápsulas de quitosano y tripolifosfato con cada uno de los aceites esenciales incorporados.

Tipo de microcápsulas	Potencial zeta (mV)	Tamaño (nm)
Tomillo	38.5 $\pm$ 0.9	775.2 $\pm$ 291.6
Clavo	38.5 $\pm$ 2.1	788.0 $\pm$ 96.8
Canela	29.6 $\pm$ 0.2	735.8 $\pm$ 118.8

Datos obtenidos mediante el software del equipo Zetasizer Nano-25 (Malvern Instruments).

### Efecto de los Aceites Esenciales en el Crecimiento Radial

En la tabla 2 se presentan los resultados de la inhibición del crecimiento micelial de *A. parasiticus* por los AE puros en cuatro concentraciones. Se midió el crecimiento radial del micelio de este hongo hasta las 144 h de incubación, tiempo en el cual en el control Tween ( $C_{TW}$ ) el crecimiento de las colonias cubrió entre el 90-100% de las placas. Se encontró una inhibición del 100% a partir de las 24 h en las placas con mayor concentración de los aceites (500, 750 y 1,000 ppm), con respecto a los controles. No obstante, en las placas con 500 y 750

ppm se observó un decrecimiento de la inhibición, siendo éste más pronunciado en aquellas placas con concentración de 500 ppm, dónde se redujo a un 58.3% con el aceite de tomillo y 71.2% con el aceite de clavo. Por su parte, el aceite de canela continuó retrasando más el crecimiento del hongo hasta las 144 h causando un 88.6% de inhibición. No se encontró diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los tres aceites, solamente entre las concentraciones utilizadas. Sin embargo, se observó que, entre los tres aceites esenciales utilizados en todas las concentraciones, a todas las horas, el mejor tratamiento fue el del aceite esencial de tomillo en 1,000 ppm. A las 144 h, se obtuvo una inhibición del 97.7 % a dicha concentración, en comparación con los aceites de canela y clavo, en los cuales se obtuvo una inhibición del 90.9 y 88.6% de inhibición, respectivamente. Por otro lado, el tratamiento que presentó menor porcentaje inhibitorio del crecimiento fue precisamente el aceite esencial de tomillo a las 100 ppm. Lo anterior indica que la eficacia del aceite para inhibir un determinado hongo radica no sólo en la composición de dicho aceite, sino en la concentración a la cual se expone al microorganismo.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *A. parasiticus* a diferentes horas de incubación en presencia de aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
<b>C<sub>TW</sub></b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>G</sup>
<b>Tomillo</b>						
100	0.0±0.0 <sup>B</sup>	24.8±2.5 <sup>D</sup>	34.5±12.2 <sup>D</sup>	0 <sup>F</sup>	37.3±8.8 <sup>C</sup>	26.5±6.9 <sup>E</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	90.2±1.4 <sup>AB</sup>	71.2±2.9 <sup>C</sup>	60.1±3.6 <sup>D</sup>	67.2±2.2 <sup>B</sup>	58.3±3.5 <sup>D</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.1±0.3 <sup>AB</sup>	97.7±0.0 <sup>A</sup>	96.2±1.3 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	97.0±0.0 <sup>A</sup>	97.7±0.0 <sup>A</sup>
<b>Clavo</b>						
100	0.0±0.0 <sup>B</sup>	42.6±10.8 <sup>C</sup>	30.7±4.9 <sup>D</sup>	15.4±1.2 <sup>E</sup>	26.7±3.2 <sup>D</sup>	17.4±4.7 <sup>F</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	88.1±4.1 <sup>B</sup>	76.9±0.6 <sup>C</sup>	72.7±2.7 <sup>C</sup>	73.3±1.0 <sup>B</sup>	71.2±1.3 <sup>C</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.5±2.6 <sup>AB</sup>	92.4±4.3 <sup>AB</sup>	92.4±2.6 <sup>A</sup>	87.9±1.3 <sup>B</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.3±0.6 <sup>AB</sup>	93.1±2.4 <sup>A</sup>	88.6±0.0 <sup>B</sup>
<b>Canela</b>						
100	0.0±0.0 <sup>B</sup>	51.3±6.5 <sup>C</sup>	38.8±2.3 <sup>D</sup>	11.1±9.1 <sup>EF</sup>	30.5±1.7 <sup>CD</sup>	18.9±1.3 <sup>F</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	88.0±2.9 <sup>B</sup>	87.2±1.4 <sup>B</sup>	90.1±1.3 <sup>A</sup>	88.6±0.0 <sup>B</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	97.3±2.3 <sup>A</sup>	93.9±4.7 <sup>A</sup>	88.6±0.0 <sup>B</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	97.3±2.3 <sup>A</sup>	93.9±1.3 <sup>A</sup>	90.9±0.0 <sup>AB</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Tween (C<sub>TW</sub>) en la misma columna.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos para *F. verticillioides*, donde se encontró un mejor efecto inhibitorio con cada uno de los aceites esenciales en todas las concentraciones, en comparación con las otras especies de hongos. Se observó que a partir de las 48 h se logró una inhibición total en las placas con concentración de 500 ppm y superiores (750 y 1,000 ppm) con respecto a los controles, con excepción del aceite de tomillo, en el cuál no fue sino hasta 750 ppm donde se alcanzó el 100% de inhibición. En las placas con 750 y 1000 ppm de aceite de canela, la inhibición fue constante hasta las 144 h. En las placas con aceite esencial de clavo, dicha constancia se presentó sólo en las placas con concentración de 1,000 ppm, y con el aceite de tomillo se observó una disminución en la inhibición desde las 96 h en las placas con 750 ppm y a las 120 h en las placas con 1,000 ppm. Cabe destacar que no se encontró diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los aceites esenciales en concentraciones de 750 y 1,000 ppm. El análisis mostró que el mejor tratamiento para este hongo, fue el aceite esencial de canela a las 750 y 1,000 ppm, mientras que el menos efectivo fue el tratamiento con aceite de clavo en 100 ppm.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *F. verticillioides* a diferentes horas de incubación en presencia de aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
<b>C<sub>Tw</sub></b>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>D</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>F</sup>
<b>Tomillo</b>						
100	0 <sup>A</sup>	58.9±8.4 <sup>C</sup>	56.8±3.3 <sup>D</sup>	44.5±18.9 <sup>C</sup>	56.1±3.1 <sup>D</sup>	57.1±2.2 <sup>D</sup>
500	0 <sup>A</sup>	84.1±1.4 <sup>B</sup>	79.0±0.8 <sup>C</sup>	79.6±3.3 <sup>B</sup>	80.8±1.3 <sup>C</sup>	83.1±2.0 <sup>C</sup>
750	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	95.6±0.1 <sup>AB</sup>	96.9±0.1 <sup>A</sup>	96.8±1.4 <sup>A</sup>
1,000	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.9±0.1 <sup>A</sup>	97.6±0.1 <sup>A</sup>
<b>Clavo</b>						
100	0 <sup>A</sup>	15.9±1.4 <sup>D</sup>	11.3±3.6 <sup>E</sup>	8.5±7.4 <sup>D</sup>	12.1±2.8 <sup>E</sup>	13.3±1.5 <sup>E</sup>
500	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	93.2±0.3 <sup>B</sup>	88.5±2.7 <sup>AB</sup>	88.7±2.1 <sup>B</sup>	89.0±1.5 <sup>B</sup>
750	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.5±1.3 <sup>A</sup>
1,000	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>						
100	0 <sup>A</sup>	10.3±9.0 <sup>D</sup>	11.3±3.6 <sup>E</sup>	9.9±8.8 <sup>D</sup>	13.2±4.2 <sup>E</sup>	14.7±4.4 <sup>E</sup>
500	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.6±2.5 <sup>A</sup>	98.0±1.8 <sup>A</sup>	97.7±0.1 <sup>A</sup>
750	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
1,000	0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Tween (C<sub>Tw</sub>) en la misma columna.

El análisis de los aceites en *A. niger* (tabla 4) se realizó hasta las 120 horas de incubación, tiempo en el que las colonias en el control Tween, cubrieron totalmente la superficie de las placas. En la tabla se muestra cómo desde las 24 h de incubación, cada uno de los aceites esenciales inhiben completamente el crecimiento del hongo a 1,000 ppm, dicha inhibición se mantiene constante hasta las 72 h en los AEs de canela y clavo, y hasta las 96 h en el AE de tomillo, posteriormente ésta comienza a decrecer en cada tratamiento.

Se observa que, tanto el aceite esencial de canela a las 750 ppm como el de clavo a las 1,000 ppm, fueron los tratamientos que presentaron mayor efecto inhibitorio a las 120 h de incubación, inhibiendo cada uno en un 98.5% el crecimiento radial de este hongo con respecto al control. De nueva cuenta no se encontró diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los aceites, pero sí entre las concentraciones en cada uno de los tiempos medidos.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *A. niger* a diferentes horas de incubación en presencia de aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)				
	24	48	72	96	120
<b>C<sub>TW</sub></b>	0 <sup>C</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>I</sup>
<b>Tomillo</b>					
100	0 <sup>C</sup>	49.8±3.6 <sup>C</sup>	53.2±4.9 <sup>D</sup>	45.1±5.6 <sup>D</sup>	25.0±2.3 <sup>F</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	84.5±4.4 <sup>B</sup>	81.4±4.9 <sup>C</sup>	79.1±2.3 <sup>C</sup>	72.0±2.6 <sup>D</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.5±0.3 <sup>AB</sup>	94.6±2.7 <sup>AB</sup>	93.9±1.3 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	97.7±0.0 <sup>A</sup>
<b>Clavo</b>					
100	0 <sup>C</sup>	52.4±11.1 <sup>C</sup>	34.4±3.9 <sup>E</sup>	30.0±4.4 <sup>E</sup>	6.1±1.3 <sup>H</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	83.9±2.5 <sup>B</sup>	82.2±1.4 <sup>C</sup>	76.9±2.0 <sup>C</sup>	66.7±1.3 <sup>E</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.7±0.1 <sup>AB</sup>	95.2±0.2 <sup>AB</sup>	88.6±0.0 <sup>B</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.3±2.9 <sup>A</sup>	98.5±2.6 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>					
100	66.7±28.9 <sup>B</sup>	30.1±8.8 <sup>D</sup>	38.8±4.4 <sup>E</sup>	31.8±1.3 <sup>E</sup>	11.4±0.0 <sup>G</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	91.9±1.4 <sup>B</sup>	88.4±0.0 <sup>B</sup>	83.3±2.6 <sup>C</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.5±2.6 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.4±1.3 <sup>A</sup>	97.0±2.6 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Tween (C<sub>TW</sub>) en la misma columna.

Por otra parte, se observaron cambios morfológicos en las colonias de los tres hongos en las placas con concentraciones de 500, 750 y 1,000 ppm de cada uno de los AE. Las

colonias mostraron forma irregular durante su crecimiento. Asimismo, su aspecto, textura, opacidad y coloración también presentaron diferencias visibles con respecto a los controles. En la figura 15 se presentan las colonias de *A. parasiticus* y *F. verticillioides* con el aceite esencial de tomillo para indicar estas observaciones, así como los controles (figura 16). El crecimiento de los hongos puede verse afectado al ser expuestos a diferentes condiciones de estrés, ya sea nutricional o ambiental, generando fenómenos de crecimiento como el dimorfismo bifásico y pleomorfismo, y es el micelio de éstos la única manera en la que se puede medir el aumento del crecimiento en periodos largos de incubación (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares, 2013; Moore y col., 2005).

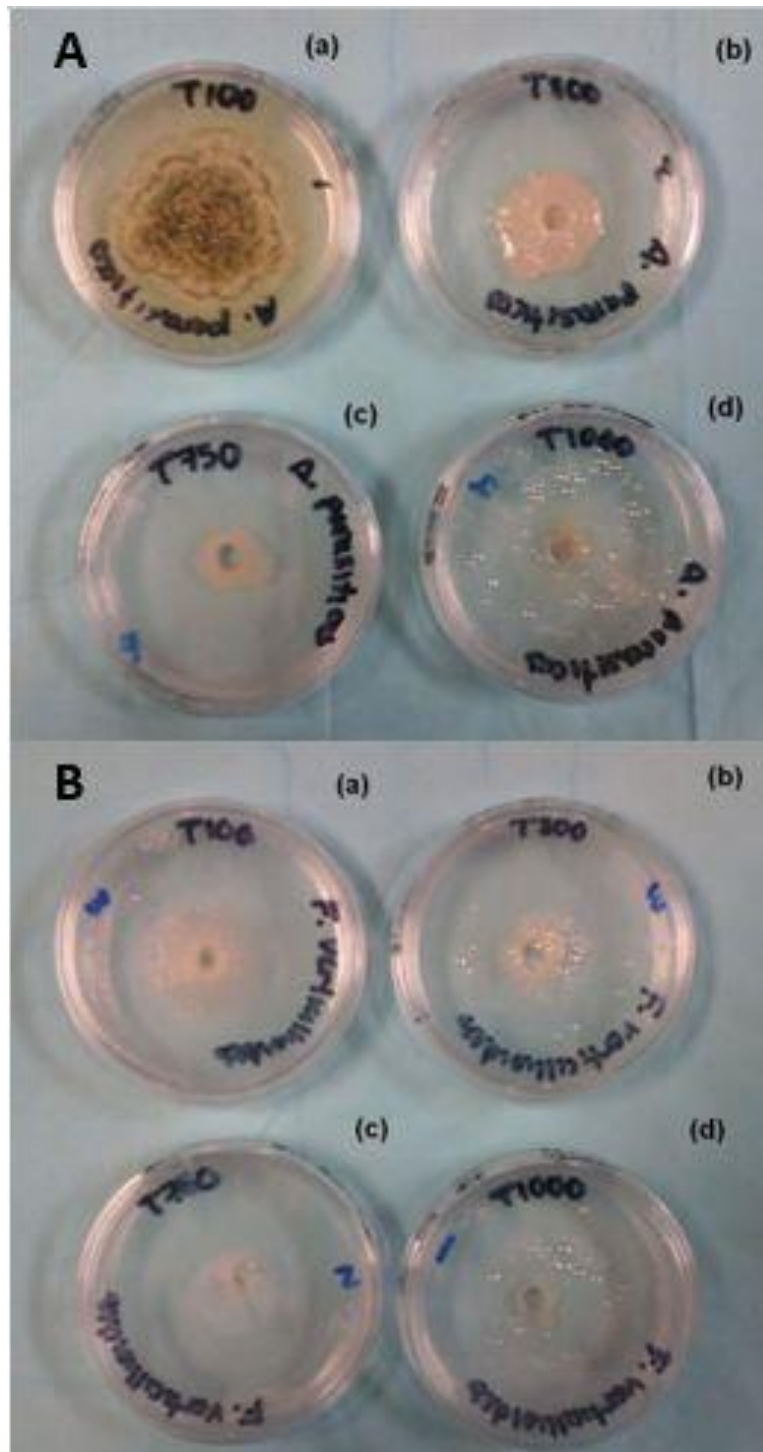


Figura 15. Crecimiento radial de: (A) *A. parasiticus* y (B) *F. verticillioides* a las 144 h con aceite esencial de tomillo en las cuatro concentraciones; (a) 100, (b) 500, (c) 750 y (d) 1,000 ppm.

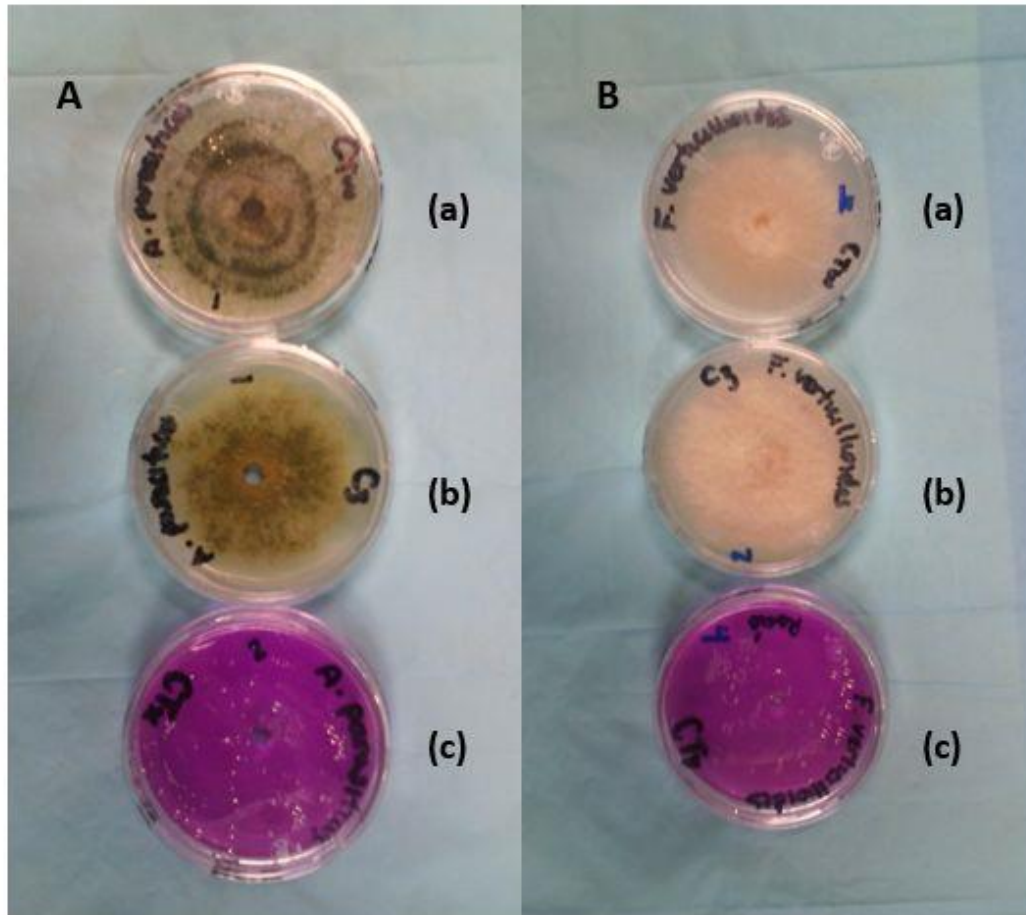


Figura 16. Crecimiento radial de (A): *A. parasiticus* y (B) *F. verticillioides* en los controles (a) Tween, (b) Czapek y (c) Terravax.

Este comportamiento de los hongos puede deberse a lo que menciona Vélez-Haro (2013) en su estudio, en el cual indica que la morfología fúngica se ve afectada por la agitación, la composición del medio, pH y la fuerza iónica, así como también por la concentración del inóculo. Asimismo, el crecimiento normal y la morfología de las hifas del hongo se pueden alterar al afectarse los microtúbulos citoplasmáticos, los cuales se encargan del transporte de vesículas de Golgi hasta el ápice hifal, y la direccionalidad y/o estabilidad.

Por otro lado, y concordando con los resultados de este trabajo, numerosos estudios han reportado la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de diversas plantas, así como la importancia de su uso como fungicidas en el campo y la industria de los alimentos (Bakkali y col., 2008; Banihashemi y Avibardi, 2011; Calo y col., 2015; de Lira-Mota y col., 2012; Fandohan



y col., 2004; Kocevski y col., 2013 Kordali y col., 2008; Soliman y Badeaa, 2002; Velluti y col., 2003).

Soliman y Badeaa (2002) estudiaron el efecto de los aceites esenciales de tomillo y canela entre otros, sobre *A. parasiticus*, *F. verticillioides* y otros hongos toxigénicos. Encontraron que el aceite de tomillo presentó un drástico efecto tóxico en *F. verticillioides* a una concentración de 250 ppm y en *A. parasiticus* a 500 ppm. Estos autores reportaron que el aceite esencial de canela presentó inhibición completa de estos hongos a la concentración de 1,000 ppm. Esto concuerda con el presente trabajo, ya que *F. verticillioides* y *A. parasiticus* se inhibieron significativamente con la concentración de 500 ppm con los aceites de canela y de tomillo y a la concentración de 1,000 ppm se presentó inhibición total de *F. verticillioides* con el aceite de canela.

### **Efecto de los Aceites Esenciales en la Germinación de Esporas**

Los aceites esenciales puros fueron evaluados utilizando las mismas concentraciones que se emplearon para el crecimiento radial (100, 500, 750 y 1,000 ppm).

Los resultados del bioensayo de *A. parasiticus* en presencia de los tres aceites esenciales puros se presentan en la tabla 5. Se observó que, a las tres horas de incubación, el porcentaje de inhibición con los aceites de canela y clavo en concentraciones de 500, 750 y 1,000 ppm fue del 100%, con respecto a los controles. A partir de las nueve horas de incubación, el efecto inhibitorio fue disminuyendo en el aceite de clavo en las concentraciones previamente mencionadas. No obstante, a concentración de 100 ppm la inhibición fue aumentando con el tiempo. Este mismo comportamiento fue observado con el aceite esencial de canela en dicha concentración, ya que el efecto inhibitorio incrementó hasta el 96.4% a las 15 horas. Asimismo, se encontró que a este tiempo, el AE de canela presentó inhibición total del proceso germinatorio de este hongo desde las 500 ppm. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los AE. Cabe destacar que, a dicho tiempo de incubación, tanto el AE de tomillo como el de clavo, afectaron significativamente la germinación de esporas de *A. parasiticus* en todas las concentraciones utilizadas.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *A. parasiticus* a diferentes horas de incubación con aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)		
	3	9	15
<b>C<sub>Tw</sub></b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>D</sup>	0 <sup>B</sup>
<b>Tomillo</b>			
100	0 <sup>B</sup>	41.6±21.0 <sup>C</sup>	59.4±13.3 <sup>A</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	94.5±5.9 <sup>A</sup>	89.3±15.2 <sup>A</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.9±4.4 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Clavo</b>			
100	0 <sup>B</sup>	54.0±22.6 <sup>BC</sup>	88.3±6.5 <sup>A</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	82.9±4.0 <sup>AB</sup>	73.0±32.5 <sup>A</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	97.6±3.4 <sup>A</sup>	96.9±4.4 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>			
100	0 <sup>B</sup>	51.4±12.1 <sup>BC</sup>	96.4±5.1 <sup>A</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	97.6±3.4 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Tween (C<sub>Tw</sub>) en la misma columna.

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de la germinación de esporas de *F. verticillioides* en presencia de los tres aceites esenciales puros con respecto al control Tween. No se encontró diferencia significativa entre los AE ( $p \geq 0.05$ ), pero sí entre las concentraciones a las nueve y 15 h de incubación. Sin embargo, el AE con mayor porcentaje de inhibición en todos los tiempos fue el de clavo en concentraciones de 750 y 1,000 ppm. El comportamiento del hongo varió entre cada aceite. En la tabla se muestra cómo con el AE de canela en concentraciones de 500, 750 y 1,000 ppm, el porcentaje de inhibición aumentó con respecto al tiempo, siendo dicha inhibición total a las 15 h de incubación. Por otro lado, a las 100 ppm, el más alto porcentaje inhibitorio se presentó a las nueve horas, pero a las 15 horas se observa un decrecimiento de éste.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *F. verticillioides* a diferentes horas de incubación con aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)		
	3	9	15
<b>C<sub>TW</sub></b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>E</sup>	0 <sup>C</sup>
<b>Tomillo</b>			
100	100.0±0.0 <sup>A</sup>	36.0±2.1 <sup>D</sup>	59.1±20.6 <sup>B</sup>
500	75.0±35.4 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	94.0±6.4 <sup>A</sup>
750	50.0±0.0 <sup>AB</sup>	98.3±2.4 <sup>A</sup>	97.7±3.3 <sup>A</sup>
1,000	75.0±0.0 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Clavo</b>			
100	50.0±0.0 <sup>AB</sup>	85.1±3.4 <sup>B</sup>	82.7±20.2 <sup>AB</sup>
500	75.0±35.4 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	12.9±7.8 <sup>C</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	96.2±0.5 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>			
100	0 <sup>A</sup>	68.6±10.3 <sup>C</sup>	20.0±2.1 <sup>C</sup>
500	0 <sup>A</sup>	96.7±0.2 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
750	75.0±35.4 <sup>AB</sup>	96.7±0.2 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
1,000	75.0±35.4 <sup>AB</sup>	96.7±0.2 <sup>AB</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Tween (C<sub>TW</sub>) en la misma columna.

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de la germinación de esporas de *A. niger* en presencia de los aceites esenciales puros. Se observa que con el aceite de tomillo se alcanzó una inhibición del 100% de la germinación de esporas desde las tres y hasta las 15 horas de incubación en las concentraciones de 500, 750 y 1,000 ppm, presentando una ligera disminución de la inhibición a las 750 ppm en este tiempo. Los aceites de clavo y canela presentaron mayor variación entre concentraciones en comparación con tomillo, especialmente a las nueve horas. A este tiempo se observó que en el tratamiento con AE de clavo, se obtuvo menor porcentaje de inhibición a las concentraciones de 100 y 500 ppm. Sin embargo, todos los aceites mostraron inhibición total de la germinación en todos los tiempos en concentración de 1,000 ppm. A las tres horas, no se encontró diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los aceites esenciales, así como tampoco entre las concentraciones.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la germinación de esporas de *A. niger* a diferentes horas de incubación con aceites esenciales (AE) en cuatro concentraciones.

AE (ppm)	Tiempo de incubación (h)		
	3	9	15
<b>C<sub>Tw</sub></b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>D</sup>	0 <sup>D</sup>
<b>Tomillo</b>			
100	100.0±0.0 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>	56.8±19.7 <sup>C</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	98.6±2.0 <sup>AB</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Clavo</b>			
100	100.0±0.0 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>	71.3±4.2 <sup>ABC</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	76.8±15.6 <sup>ABC</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>			
100	100.0±0.0 <sup>A</sup>	21.0±12.7 <sup>C</sup>	67.8±11.0 <sup>BC</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	86.5±2.1 <sup>B</sup>	94.3±8.1 <sup>AB</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	0 <sup>D</sup>	90.4±6.7 <sup>AB</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	100.0±0.0 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Tween (C<sub>Tw</sub>) en la misma columna.

Al evaluar el efecto de los AE puros en la germinación de esporas de los hongos, se encontró que efectivamente sí se presenta inhibición en ella. Esto concuerda con lo reportado por López-Meneses (2014), en cuyo trabajo evaluó aceites esenciales de tomillo, eucalipto y pirul en la germinación de *A. parasiticus* y *F. verticillioides*, encontrando una inhibición superior al 90% en *A. parasiticus* con los aceites de tomillo y eucalipto. Este estudio concuerda con los valores obtenidos en el presente trabajo con los aceites de tomillo, clavo y canela, ya que la inhibición encontrada fue entre el 59 y el 100% en todas las concentraciones de cada aceite a las 15 horas para *A. parasiticus*. Cabe destacar que de los aceites esenciales evaluados en este trabajo en la germinación de esporas, sólo el aceite de tomillo ha sido analizado con anterioridad (López-Meneses, 2014) en *A. parasiticus* y *F. verticillioides*. Aún no se han encontrado reportes sobre el efecto de los aceites de clavo y canela en los hongos estudiados en la presente investigación.

Dado que los estudios sobre el efecto de los AE en la germinación de esporas fúngicas es aún limitado, no se conoce bien el mecanismo de acción de estos compuestos en este proceso biológico del hongo. Algunos autores han analizado aceites esenciales en la germinación de esporas de determinados hongos encontrando un efecto inhibitorio en ellos. Probablemente esto se deba a que los aceites esenciales causan la desnaturalización de algunas enzimas involucradas en la germinación de esporas, así como la despolarización de la membrana mitocondrial por disminución del potencial de membrana, afectando canales iónicos de  $Ca^{++}$ , lo cual se ha reportado, juega un papel fundamental en la germinación de esporas (Bakkali y col., 2008; Kocevski y col., 2013; Plascencia-Jatomea, 2003).

### **Efecto de las Microcápsulas en el Crecimiento Radial**

En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos en el crecimiento radial *A. parasiticus* con las microcápsulas de quitosano y cada uno de los aceites esenciales incorporados. En esta tabla se observa cómo tanto las microcápsulas del AE de tomillo como las de clavo, presentaron el más alto porcentaje de inhibición a las 96 y 72 h de incubación, respectivamente, en concentraciones de 100 y 500 ppm. Mientras que en concentraciones de 750 y 1,000 ppm, en estos mismos aceites encapsulados, el mayor efecto inhibitorio se presentó a las 48 h de incubación, posteriormente disminuyó. Por otro lado, las microcápsulas con AE de canela mostraron mayor inhibición a las 72 h en prácticamente todas las concentraciones, presentando ligera variación de ésta en las placas con concentración de 100 ppm. Cabe destacar que para este bioensayo sí se presentó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), tanto en concentraciones como en AE encapsulados, siendo el de clavo a 1,000 ppm el que demostró mayor eficacia para inhibir el crecimiento radial del hongo. Las microcápsulas de clavo presentan una inhibición casi total a las 48 h, posteriormente ésta va disminuyendo. Sin embargo, a las 144 h sigue afectando considerablemente el crecimiento del hongo con una inhibición del 90.5%, a diferencia de 77.5 y 53.6% de las MC de tomillo y canela, respectivamente.

Se observa cómo en este hongo comenzó a presentarse un efecto inhibitorio en la mayoría de los tratamientos a partir de las 48 horas, a diferencia de *F. verticillioides* (tabla 9) y *A. niger* (tabla 10), en donde este efecto se observó desde las 24 horas. Se encontró una diferencia significativa entre los aceites esenciales encapsulados ( $p \leq 0.05$ ). Comparando estos datos con los resultados obtenidos para este hongo con los aceites puros, en donde el aceite de canela causó un mejor porcentaje inhibitorio, en este experimento, ya con los aceites encapsulados, fue en el tratamiento con aceite de clavo el que mostró mayor inhibición.

Para el caso de *F. verticillioides* (tabla 9), se observó que las MC de tomillo presentaron menor efecto inhibitorio en todas las dosis ante las MC de clavo y canela. A concentración de 100 ppm la inhibición del crecimiento radial de este hongo es nula en todas las horas. En este análisis se encontró que, de nueva cuenta, con las MC de clavo se obtuvo mejor inhibición del crecimiento de este hongo desde las 24 h de incubación. A las 144 h, este tratamiento presentó 78% de inhibición, siendo significativamente distinto ( $p \leq 0.05$ ) a los tratamientos de MC con aceite esencial de tomillo y canela a la misma concentración.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *A. parasiticus* a diferentes horas de incubación con las microcápsulas (MC) en cuatro concentraciones.

MC (ppm)	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
<b>Ccz</b>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>H</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>H</sup>	0 <sup>J</sup>
<b>Tomillo</b>						
100	0 <sup>A</sup>	19.3±7.5 <sup>E</sup>	26.6±1.8 <sup>F</sup>	26.8±5.8 <sup>E</sup>	20.5±3.5 <sup>G</sup>	17.7±1.2 <sup>I</sup>
500	0 <sup>A</sup>	45.8±8.5 <sup>D</sup>	48.3±1.5 <sup>E</sup>	52.8±2.0 <sup>C</sup>	40.2±1.2 <sup>F</sup>	36.3±1.0 <sup>EF</sup>
750	0 <sup>A</sup>	84.4±7.6 <sup>AB</sup>	81.2±1.3 <sup>C</sup>	71.2±6.5 <sup>B</sup>	48.6±8.2 <sup>DEF</sup>	29.5±1.7 <sup>G</sup>
1,000	0 <sup>A</sup>	94.8±1.3 <sup>AB</sup>	91.0±0.6 <sup>B</sup>	87.4±0.1 <sup>A</sup>	78.0±1.3 <sup>B</sup>	77.5±1.2 <sup>C</sup>
<b>Clavo</b>						
100	0 <sup>A</sup>	11.8±1.0 <sup>EF</sup>	30.4±3.7 <sup>F</sup>	28.0±4.1 <sup>E</sup>	24.3±0.7 <sup>G</sup>	24.2±1.9 <sup>H</sup>
500	0 <sup>A</sup>	76.8±1.1 <sup>BC</sup>	82.4±1.3 <sup>C</sup>	74.1±2.9 <sup>B</sup>	62.9±2.8 <sup>C</sup>	54.4±2.8 <sup>D</sup>
750	0 <sup>A</sup>	97.1±0.4 <sup>A</sup>	95.6±0.3 <sup>AB</sup>	91.7±0.2 <sup>A</sup>	86.7±1.4 <sup>AB</sup>	82.5±1.3 <sup>B</sup>
1,000	0 <sup>A</sup>	98.2±0.4 <sup>A</sup>	96.9±0.0 <sup>A</sup>	94.2±0.3 <sup>A</sup>	92.3±0.7 <sup>A</sup>	90.5±1.0 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>						
100	0 <sup>A</sup>	0 <sup>F</sup>	17.9±3.0 <sup>G</sup>	13.8±0.0 <sup>F</sup>	20.6±2.3 <sup>G</sup>	14.3±3.4 <sup>I</sup>
500	0 <sup>A</sup>	23.6±2.0 <sup>E</sup>	46.2±1.7 <sup>E</sup>	41.4±4.9 <sup>D</sup>	42.5±2.8 <sup>EF</sup>	32.1±1.7 <sup>FG</sup>
750	0 <sup>A</sup>	47.2±3.9 <sup>D</sup>	51.3±1.9 <sup>E</sup>	50.0±2.4 <sup>CD</sup>	50.7±1.0 <sup>DE</sup>	38.1±0.0 <sup>E</sup>
1,000	0 <sup>A</sup>	58.3±11.8 <sup>CD</sup>	64.1±1.3 <sup>D</sup>	53.4±2.4 <sup>C</sup>	54.8±2.8 <sup>CD</sup>	53.6±1.7 <sup>D</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Czapek (Ccz) en la misma columna.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *F. verticillioides* a diferentes horas de incubación con las microcápsulas (MC) en cuatro concentraciones.

MC (ppm)	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
<b>C<sub>Cz</sub></b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>H</sup>	0 <sup>H</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>G</sup>
<b>Tomillo</b>						
100	0 <sup>B</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>H</sup>	0 <sup>H</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>G</sup>
500	0 <sup>B</sup>	29.3±1.3 <sup>E</sup>	17.6±4.9 <sup>G</sup>	19.2±1.4 <sup>FG</sup>	11.9±0.6 <sup>F</sup>	0 <sup>G</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	31.9±5.7 <sup>DE</sup>	26.2±9.0 <sup>FG</sup>	21.2±3.5 <sup>F</sup>	14.3±2.1 <sup>F</sup>	0 <sup>G</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	65.9±2.9 <sup>C</sup>	53.4±3.1 <sup>D</sup>	52.9±1.4 <sup>D</sup>	44.5±3.3 <sup>D</sup>	32.6±5.7 <sup>E</sup>
<b>Clavo</b>						
100	0 <sup>B</sup>	19.4±3.5 <sup>E</sup>	30.0±2.8 <sup>FG</sup>	20.2±0.3 <sup>FG</sup>	13.5±0.9 <sup>F</sup>	0 <sup>G</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	46.3±3.6 <sup>D</sup>	50.0±2.8 <sup>DE</sup>	54.8±3.0 <sup>CD</sup>	49.9±2.4 <sup>CD</sup>	37.9±2.6 <sup>E</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	72.9±9.8 <sup>BC</sup>	68.0±0.0 <sup>BC</sup>	70.2±1.5 <sup>B</sup>	61.8±6.1 <sup>B</sup>	57.6±1.3 <sup>C</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	90.1±4.8 <sup>A</sup>	86.0±2.8 <sup>A</sup>	83.6±3.6 <sup>A</sup>	80.8±5.0 <sup>A</sup>	78.0±1.3 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>						
100	100.0±0.0 <sup>A</sup>	22.3±1.2 <sup>E</sup>	16.3±0.5 <sup>G</sup>	14.4±2.9 <sup>G</sup>	11.4±3.2 <sup>F</sup>	0 <sup>G</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	33.0±14.0 <sup>DE</sup>	36.8±1.1 <sup>EF</sup>	34.6±2.4 <sup>E</sup>	30.7±1.6 <sup>E</sup>	11.4±0.0 <sup>F</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	62.9±1.9 <sup>C</sup>	57.1±4.1 <sup>DE</sup>	60.6±3.0 <sup>C</sup>	56.8±0.0 <sup>BC</sup>	46.2±3.5 <sup>D</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	85.2±0.8 <sup>AB</sup>	79.6±0.6 <sup>AB</sup>	76.9±3.2 <sup>B</sup>	72.7±0.0 <sup>A</sup>	68.9±3.5 <sup>B</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Czapek (C<sub>Cz</sub>) en la misma columna.

En la tabla 9 se presentan los resultados de la evaluación de las microcápsulas en *A. niger*. Se observó el máximo porcentaje de inhibición en todos los tratamientos a las 24 h, posteriormente la inhibición disminuyó. Se encontró que, nuevamente, las microcápsulas con AE de clavo obtuvieron el mayor efecto inhibitorio a 1,000 ppm, siendo este tratamiento significativamente distinto ( $p \leq 0.05$ ) a los tratamientos con MC de AE de tomillo y canela, a la misma concentración. Asimismo, se presentó diferencia significativa entre las concentraciones a determinados tiempos.

En estudios de Cota-Arriola y col. (2011) y Vélez-Haro (2013) con *A. parasiticus* y *A. niger*, respectivamente, se menciona que el quitosano no tiene un efecto fungicida en estos hongos, sólo presenta efecto fungistático, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en



este estudio con *F. verticillioides*. El autor también menciona que los hongos han demostrado cierto grado de adaptación al quitosano, probablemente debido a la adaptación fisiológica al estrés, al aumento de la producción de enzimas quitinasas y quitosanasas que degradan al biopolímero, permitiendo así al organismo utilizarlo como una fuente de energía.

Se observó que se presentaron cambios morfológicos en las colonias de *F. verticillioides* y *A. parasiticus* que crecieron en las placas con mayor concentración de las microcápsulas. Lo anterior concuerda con lo reportado por Cota-Arriola y col. (2013) quienes en su estudio con micro y nanopartículas de quitosano con tripolifosfato de sodio en *A. parasiticus*, observaron que las colonias que crecieron en los medios tratados con las partículas, presentaron cambios en el color y en la formación del micelio, en comparación con los controles en donde el hongo creció normalmente. Estos autores mencionan que el potencial fungistático de las micro y nanopartículas que elaboraron depende del tamaño de las mismas; y que entre menor sea el tamaño de las partículas, mayor será el efecto inhibitorio sobre el hongo. Lo anterior puede atribuirse a que entre menor sea el tamaño de las partículas, mayor facilidad tendrán éstas para interactuar con los componentes de la membrana fúngica, sin descartar la posible penetración de las partículas en la célula.

Al realizar una comparación sobre los efectos producidos por los AE puros con los causados por las MC en las tres especies de hongos estudiados, se encontró que estas últimas en las cuatro concentraciones produjeron una menor inhibición del crecimiento radial. Esta reducción posiblemente fue causada por la baja concentración de TPP utilizada en nuestro estudio, ya que otros autores reportan mayores concentraciones de TPP en sus trabajos, así como altos valores de inhibición de microorganismos y sus metabolitos secundarios. Zhao y col. (2015) utilizaron TPP al 0.25% para la elaboración de polímeros adsorbentes de micotoxinas de QT-TPP, Du y col. (2009) emplearon TPP al 1% para la elaboración de nanopartículas, Chen y col. (2009); 2.5 mg/mL (0.25%), Cota-Arriola y col. (2013); 2.0, 6.0 y 10.0%, y Mohammadi y col. (2015) al 0.3%.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *A. niger* a diferentes horas de incubación con las microcápsulas (MC) en cuatro concentraciones.

MC (ppm)	Tiempo de incubación (h)					
	24	48	72	96	120	144
<b>Ccz</b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>I</sup>
<b>Tomillo</b>						
100	100.0±0.0 <sup>A</sup>	13.5±8.3 <sup>EF</sup>	11.9±2.5 <sup>FG</sup>	0 <sup>G</sup>	0 <sup>F</sup>	0 <sup>I</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	36.1±2.6 <sup>CD</sup>	38.8±6.8 <sup>BCD</sup>	24.5±7.0 <sup>CDE</sup>	0 <sup>F</sup>	2.3±0.0 <sup>HI</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	31.5±4.6 <sup>D</sup>	28.2±10.5 <sup>CDE</sup>	22.3±7.5 <sup>DE</sup>	7.1±6.2 <sup>EF</sup>	8.0±1.6 <sup>FG</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	46.7±9.2 <sup>BC</sup>	40.3±3.6 <sup>BCD</sup>	35.3±3.7 <sup>BCD</sup>	19.9±7.3 <sup>CD</sup>	21.6±1.6 <sup>E</sup>
<b>Clavo</b>						
100	0 <sup>B</sup>	16.6±2.1 <sup>E</sup>	14.9±4.2 <sup>EF</sup>	9.2±6.0 <sup>EF</sup>	6.1±1.3 <sup>DEF</sup>	0 <sup>I</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	37.1±1.2 <sup>CD</sup>	33.3±1.5 <sup>CD</sup>	29.8±8.5 <sup>BCD</sup>	26.8±5.7 <sup>BC</sup>	25.8±0.0 <sup>DE</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	54.3±0.4 <sup>B</sup>	52.2±3.8 <sup>AB</sup>	38.7±1.7 <sup>AB</sup>	33.7±4.5 <sup>AB</sup>	33.3±1.3 <sup>BC</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	70.7±3.5 <sup>A</sup>	55.3±3.4 <sup>A</sup>	51.5±2.8 <sup>A</sup>	44.8±3.8 <sup>A</sup>	46.2±1.3 <sup>A</sup>
<b>Canela</b>						
100	0 <sup>B</sup>	8.7±0.5 <sup>EFG</sup>	7.4±2.5 <sup>FG</sup>	4.2±3.6 <sup>FG</sup>	0 <sup>F</sup>	1.5±1.3 <sup>HI</sup>
500	100.0±0.0 <sup>A</sup>	39.0±3.7 <sup>CD</sup>	26.8±7.5 <sup>DE</sup>	24.6±5.8 <sup>CDE</sup>	18.6±2.7 <sup>CDE</sup>	12.9±1.3 <sup>F</sup>
750	100.0±0.0 <sup>A</sup>	56.4±2.7 <sup>B</sup>	41.8±4.8 <sup>ABC</sup>	36.5±1.7 <sup>BC</sup>	30.6±3.9 <sup>BC</sup>	30.3±1.3 <sup>CD</sup>
1,000	100.0±0.0 <sup>A</sup>	56.4±2.4 <sup>B</sup>	52.2±3.8 <sup>AB</sup>	42.9±4.5 <sup>AB</sup>	35.9±3.6 <sup>AB</sup>	35.6±1.3 <sup>B</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Czapek (Ccz) en la misma columna.

### Determinación de las Dosis Medias Inhibitorias (DI<sub>50</sub>)

La tabla 11 muestra las dosis medias inhibitorias (dosis a las cuales se causa el 50% de la inhibición máxima de los microorganismos) calculadas para cada uno de los aceites esenciales mediante análisis PROBIT, con el programa estadístico NCSS. A partir de estas dosis se realizó la prueba de germinación de esporas en los hongos, con el fin de evaluar las microcápsulas y comparar resultados con los aceites esenciales puros.

Tabla 11. Dosis (ppm) medias inhibitorias de los diferentes aceites esenciales para cada uno de los hongos

<b>Aceite Esencial (ppm)</b>	<b><i>A. parasiticus</i></b>	<b><i>F. verticillioides</i></b>	<b><i>A. niger</i></b>
Tomillo	117.9	67.7	154.5
Canela	111.8	154.6	128.0
Clavo	156.1	156.1	133.9

Datos obtenidos mediante análisis de PROBIT con el programa estadístico NCSS.

### Efecto de las Microcápsulas en la Germinación de Esporas

En la tabla 12 se presentan los resultados de inhibición de la germinación de esporas de *A. parasiticus*, en presencia de las microcápsulas de quitosano con la dosis media inhibitoria calculada para cada uno de los aceites esenciales incorporados y presentadas en la tabla 11. En esta tabla se observa cómo el comportamiento del hongo varía dependiendo del tipo de microcápsula al cual fue expuesto. Con las microcápsulas de tomillo y canela, el mayor efecto inhibitorio fue obtenido a las 3 horas de incubación, y a las nueve horas éste presentó una disminución, la cual fue más pronunciada en el tratamiento con MC de canela. Posteriormente, a las 15 h aumentó de nuevo la inhibición en ambos casos. Por otro lado, con las MC de clavo, la inhibición fue más o menos constante entre las tres y nueve horas, siendo mayor en el primer tiempo. Sin embargo, a las 15 h, el tratamiento ya no inhibió la germinación de este hongo. Sólo las MC de canela fueron significativamente distintas ( $p \leq 0.05$ ) a los otros dos tratamientos a las nueve horas de incubación, y las MC de clavo a las 15 h con respecto a los otros dos tratamientos.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *A. parasiticus* en presencia de microcápsulas de quitosano con la  $DI_{50}$  de cada aceite esencial.

Tratamiento y su $DI_{50}$ (ppm)	Tiempo de incubación (h)		
	3	9	15
<b>C<sub>Cz</sub></b>	0 <sup>C</sup>	0 <sup>C</sup>	0 <sup>B</sup>
<b>Tomillo (117.9)</b>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	65.5±1.7 <sup>B</sup>	77.6±15.4 <sup>A</sup>
<b>Clavo (156.1)</b>	75.0±35.4 <sup>AB</sup>	73.2±2.5 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>
<b>Canela (111.8)</b>	77.6±15.6 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>	62.5±20.3 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Czapek (C<sub>Cz</sub>) en la misma columna.

Los datos obtenidos en la germinación de esporas de *F. verticillioides* con las microcápsulas se presentan en la tabla 13. En este bioensayo las MC de clavo fueron significativamente diferentes a las de tomillo y canela a las nueve horas de incubación, en donde éstas últimas, no presentaron inhibición. Sin embargo, a las 15 h, fueron las MC de canela las que mostraron diferencia significativa con respecto a las de tomillo y clavo. Se encontró que, para este hongo, ninguno de los tratamientos causó un daño significativo en el proceso germinatorio.

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *F. verticillioides* en presencia de microcápsulas de quitosano con la  $DI_{50}$  de cada aceite esencial.

Tratamiento y su $DI_{50}$ (ppm)	Tiempo de incubación (h)		
	3	9	15
<b>C<sub>Cz</sub></b>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>
<b>Tomillo (67.7)</b>	100.0±0.0 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>
<b>Clavo (156.1)</b>	83.3±23.6 <sup>A</sup>	76.0±1.4 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>
<b>Canela (154.6)</b>	83.0±23.6 <sup>A</sup>	0 <sup>B</sup>	31.9±9.8 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Czapek (C<sub>Cz</sub>) en la misma columna.

Los resultados obtenidos en la germinación de esporas de *A. niger* con las microcápsulas se presentan en la tabla 14. Se observó que para este hongo no se presentó inhibición germinatoria por parte de ninguno de los tratamientos a las tres y nueve horas de incubación, sólo a las 15 h. A este tiempo, las MC de canela causaron mayor inhibición (66.4%), con respecto a los otros dos tratamientos. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre las MC de canela y tomillo, sólo con las de clavo ( $p \leq 0.05$ ).

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de germinación de esporas de *A. niger* en presencia de microcápsulas de quitosano con la  $DI_{50}$  de cada aceite esencial.

Tratamiento y su $DI_{50}$ (ppm)	Tiempo de incubación (h)		
	3	9	15
<b>C<sub>Cz</sub></b>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>C</sup>
<b>Tomillo (154.5)</b>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	56.7±11.5 <sup>B</sup>
<b>Clavo (133.9)</b>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	28.1±16.8 <sup>BC</sup>
<b>Canela (128.0)</b>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	66.4±13.1 <sup>A</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y el control Czapek (C<sub>Cz</sub>) en la misma columna.

Vélez-Haro (2013) reportó en su estudio polarización de esporas (etapa que precede a la germinación) de *A. niger* en medio de cultivo Czapek, sólido y líquido, adicionado de quitosano de distinto peso molecular a diferentes concentraciones. Asimismo, reportó que el efecto del quitosano varió de manera directamente proporcional a la concentración en ambos medios de cultivo, encontrando una disminución del efecto antifúngico del quitosano al incrementarse el tiempo de incubación. Este autor sugiere que la bioactividad del biopolímero sobre *A. niger* es fungistática y no fungicida, lo cual también pudo ocurrir en *F. verticillioides* y *A. parasiticus*. Por otro lado, Plascencia-Jatomea y col. (2003) mencionan en su estudio sobre el efecto del quitosano en la germinación de esporas en *A. niger*, que el efecto inhibitorio que presenta este biopolímero no es significativo a altas temperaturas, sino que es mejor a temperaturas de entre 12-18°C. La disminución en la germinación de esporas por el quitosano puede atribuirse al potencial quelante del polímero sobre el calcio ( $Ca^{2+}$ ) que le confieren los grupos aminos libres e hidroxilos presentes, o a la interacción electrostática entre grupos aminos protonados ( $NH^{3+}$ )

con componentes de la membrana celular del hongo como son los fosfolípidos (Ali y col., 2010; Du y col., 2009; Cota-Arriola y col., 2011; Plascencia-Jatomea y col., 2003).

### Efecto de las Microcápsulas en la Producción de Micotoxinas

En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos para la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales en presencia de las microcápsulas con los diferentes tipos de aceites esenciales. En el control con agua ( $C_A$ ) se detectó la concentración de cada micotoxina y se tomó como el valor a comparar con los obtenidos en los tratamientos. Se observó que cada tipo de microcápsulas influyó en la producción total de las toxinas en el grano de maíz sano. Se encontró que, tanto en la producción de fumonisinas como de aflatoxinas totales, las microcápsulas con aceite esencial de clavo fueron las que redujeron más la concentración de las toxinas (hasta 3.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en FB's y 1466.6 ng/g en AF's) en comparación con las microcápsulas de los otros dos aceites. Sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre tratamientos ( $p \geq 0.05$ ).

Tabla 15. Efecto de las microcápsulas sobre la producción de aflatoxinas y fumonisinas totales.

Tratamiento	Aflatoxinas (ng/g)	Fumonisinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
$C_A$	1866.7 $\pm$ 305.5 <sup>A</sup>	5.8 $\pm$ 0.7 <sup>A</sup>
$C_{QT}$	950 $\pm$ 477 <sup>B</sup>	3.7 $\pm$ 0.0 <sup>B</sup>
$C_{TPP}$	2133.3 $\pm$ 57.7 <sup>A</sup>	3.3 $\pm$ 0.0 <sup>B</sup>
<b>Tomillo</b>	1700 $\pm$ 264.6 <sup>AB</sup>	3.5 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>
<b>Clavo</b>	1466.6 $\pm$ 321.5 <sup>AB</sup>	3.3 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>
<b>Canela</b>	1833.3 $\pm$ 57.7 <sup>A</sup>	3.8 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>

Las letras mayúsculas representan diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de cada tratamiento y los controles.  $C_A$  (Control agua),  $C_{QT}$  (Control quitosano) y  $C_{TPP}$  (Control tripolifosfato de sodio).

Velluti y col. (2003), mencionan en su trabajo sobre estudios previos que han realizado otros autores sobre la inhibición del crecimiento de *A. parasiticus* y la producción de aflatoxina por parte de los aceites de canela y clavo, así como también que el timol (extraído del aceite de tomillo) inhibe la producción de la toxina en *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus* y *A.*

*parasiticus*. Asimismo, Xing y col. (2014) analizaron el efecto del aceite esencial de canela en la producción de FB1, encontrando que este aceite degradó significativamente a la toxina. Por otra parte, se ha demostrado que el quitosano inhibe la producción de aflatoxinas en medios sólidos, principalmente debido a su capacidad de quelar compuestos necesarios para la síntesis de aflatoxinas. Cota-Arriola y col. (2011) mencionan que, en el grano de maíz, el quitosano no tiene el mismo efecto inhibitorio en la producción de aflatoxinas que en medios sólidos, lo cual podría deberse a que el polímero no es capaz de penetrar en el grano, lo que limita su capacidad quelante y que resulta en una menor inhibición en la producción de AFB1, y por ende un aumento en el total de aflatoxinas.

## CONCLUSIÓN

En este estudio se obtuvieron microcápsulas de aceites esenciales con quitosano y tripolifosfato de sodio físicamente estables mediante el método de gelificación ionotrópica.

Asimismo, se encontró que los aceites esenciales de tomillo, clavo y canela presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento radial y la germinación de esporas de *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*.

Por otro lado, los aceites esenciales encapsulados no presentan efecto fungicida en los hongos aquí estudiados, sólo fungistático, aunque no prolongado. Cabe mencionar que cada hongo responde de manera diferente a este tipo de tratamiento.

Es importante también destacar, que se ha demostrado que sí hay un efecto de los aceites esenciales encapsulados en el desarrollo de los hongos y una evidente reducción en la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales por *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus parasiticus*, respectivamente.



## RECOMENDACIONES

Es importante destacar la importancia de que continúe este tipo de estudios, ya que se ha demostrado que sí hay un efecto de los aceites esenciales encapsulados con quitosano y tripolifosfato de sodio en el desarrollo de los hongos y una evidente reducción en la producción de fumonisinas y aflatoxinas totales por *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus parasiticus*, respectivamente. Lo anterior es de gran importancia en el ámbito de la agricultura y de salud pública, ya que es necesario la erradicación o reducción de micotoxinas presentes en diversos tipos de alimentos, con el fin de evitar pérdidas económicas y el incremento de enfermedades generadas por la ingesta de estas sustancias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañes FJ. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev Iberoam Micol*, 17: 63-68.
- Adefegha SA, Oboh G, Oyeleke SI, Osunmo K. 2015. Alteration of starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. *Food Sci Nutr*, 4(2): 250–260.
- Aguilar-González AE, López-Malo A. 2013. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2): 35-41.
- Al-Hmoud N, Ibrahim MA, Al-Rousan H, Alseyah A. 2012. The prevalence of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* in Jordan. *Int J Microbiol*, 2012.
- Ali SW, Joshi M, Rajendran S. 2010. Modulation of size, shape and surface charge of chitosan nanoparticles with reference to antimicrobial activity. *Adv Sci Lett*, 3(4): 452-460.
- Alvarado-Hernández AM, Barrera-Necha LL, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez del Valle MG. 2011. Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Rev Colomb Biotecnol*, 13(2): 127-134.
- Arrúa-Alvarenga AA, Moreno-Martínez E, Viay Q, Yolanda M, Moreno-Lara J, Vázquez-Badillo ME, Flores-Olivas A. 2012. *Aspergillus* aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Rev Mex Cienc Agric*, 3(5): 1047-1052.
- Baker SE. 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology*, 44(1): 17-21.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol*, 46(2): 446-475.
- Bakry AM, Abbas S, Ali B, Majeed H, Abouelwafa MY, Mousa A, Liang L. 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15(1): 143-182.
- Banihashemi Z, Abivardi C. 2011. Evaluation of fungicidal and fungistatic activity of plant essential oils towards plant pathogenic and saprophytic fungi. *Phytopathol Mediterr*, 50(2): 245-256.
- Beyki M, Zhavah S, Khalili ST, Rahmani-Cherati T, Abollahi A, Bayat M, Tabatabaei M, Mohsenifar A. 2014. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan—

- cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Ind Crop Prod*, 54: 310-319.
- Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M., Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem*, 105(1): 146-155.
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54: 111-119.
- Carrillo L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta-Argentina. 130 p.
- Castaño-Sepúlveda MV. 2012. Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*): a short review. *Phytother Res*, 21(6): 501-506.
- Chen F, Shi Z, Neoh KG, Kang ET. 2009. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnol Bioeng*, 104(1): 30-39.
- Cortés-Sánchez ADJ, Mosqueda-Olivares T. 2013. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12(2): 64-90.
- Cortez-Rocha MO, Parra-Vergara NV, Sánchez-Mariñez RI. 2012. Hongos de importancia en granos y productos almacenados. Cap. 14. En: *Nuevas Tendencias en Ciencias y Tecnología en Alimentos. Tópicos Selectos*. 381-407 p.
- Cota-Arriola O, Cortez-Rocha MO, Rosas-Burgos EC, Burgos-Hernández A, López-Franco YL, Plascencia-Jatomea M. 2011. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polym Int*, 60(6): 937-944.
- Cota-Arriola O, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, Lizardi-Mendoza J, Burgos-Hernández A, Robles-Sánchez RM, Plascencia-Jatomea M. 2013. Ultrastructural, morphological, and antifungal properties of micro and nanoparticles of chitosan crosslinked with sodium tripolyphosphate. *J Polym Environ*, 21(4): 971-980.

- da Cruz Cabral L, Pinto VF, Patriarca A. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int J Food Microbiol*, 166(1): 1-14.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Prot*, 22(1): 39-44.
- de Lira-Mota KS, de Oliveira-Pereira F, de Oliveira WA., Lima IO, de Oliveira-Lima E. 2012. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules*, 17(12): 14418-14433.
- de la Torre-Hernández ME, Sánchez-Rangel D, Galeana-Sánchez E, Plasencia-de la Parra E. 2014. Fumonisin -Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1):77-91.
- de Oliveira PR, Takaki M, Gorayeb TCC, Del Bianchi VL, Thomeo JC, Tiera MJ, de Oliveira-Tiera, VA. 2013. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. *Microbiol Res*, 168(1): 50-55.
- Degola F, Morcia C, Bisceglie F, Mussi F, Tumino G, Ghizzoni R, Pelosi G, Terzi V, Buschini A, Restivo FM, Lodi T. 2015. *In vitro* evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. *Int J Food Microbiol*, 200: 104-111.
- Dohnal V, Wu Q, Kuča K. 2014. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Arch Toxicol*, 88(9): 1635-1644.
- Du WL, Xu YL, Xu ZR, Fan CL. 2008. Preparation, characterization and antibacterial properties against *E. coli* K88 of chitosan nanoparticle loaded copper ions. *Nanotechnology*, 19(8): 085707.
- Du WL, Niu SS, Xu YL, Xu ZR, Fan CL. 2009. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydr Polym*, 75: 385-389.
- FAO. 1992. Maize in human nutrition. FAO, Roma. FAO Food and Nutrition Series, No. 25. ISBN 92-5-103013-8.
- Fandohan P, Gbenou JD, Gnonlonfin B, Hell K, Marasas WF, Wingfield MJ. 2004. Effect of essential oils on the growth of *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in corn. *J Agric Food Chem*, 52(22): 6824-6829.
- Flores-Belmont IA, Jiménez-Munguía MT. 2013. Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1): 48-56.

- Gallardo-Reyes ED, Ibarra-Moreno GM, Sánchez-Mariñez RI, Cuamea-Cruz G, Molina-Gil D, Parra-Vergara NV, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Rev Mex Fitopatol*, 24(1): 27-34.
- García-García RM, Palou-García E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Selectivos de Ingeniería de Alimentos*, 2(2): 41-51.
- Glenn AE, Richardson EA, Bacon CW. 2004. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia*, 96(5): 968-980.
- Goycoolea FM, Remuñan C, Alonso MJ. 2009. Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas*. Real Academia Nacional de Farmacia, 103-131p.
- Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Mengíbar M, Heras A. 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohyd Polym*, 84(2): 803-806.
- Hernández-Sánchez P. 2011. Encapsulación de aceite esencial de clavo para su aplicación en la industria alimentaria. Tesis doctoral. Universidad Católica San Antonio. San Antonio, España. 35-72 p.
- Horn BW, Ramírez-Padro JH, Carbone I. 2009. The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia*, 101(2): 275-280.
- Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi MA. 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J Food Process Pres*, 33(6): 727-743.
- Hu B, Pan C, Sun Y, Hou Z, Ye H, Hu B, Zeng X. 2008. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *J Agr Food Chem*, 56(16): 7451-7458.
- Huwig A, Freimund S, Käppeli O, Dutler H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett*, 122(2): 179-188.
- Il'ina AV, Varlamov VP, Ermakov YA, Orlov VN, Skryabin KG. 2008. Chitosan is a natural polymer for constructing nanoparticles. *Dokl Chem*, 421: 165-167.
- Juárez-Becerra GP, Sosa-Morales ME, López-Malo A. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2): 14-23.

- Keawchaon L, Yoksan R. 2011. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 84(1): 163-171.
- Kenneth JR, Ray CG, Ahmand N, Drew WL, Plorde J. 2010. *Sherris Medical Microbiology*. 5<sup>a</sup> ed. Mc Graw-Hill Interamericana: México. 695 p.
- Khaldi N, Wolfe KH. 2011. Evolutionary origins of the fumonisin secondary metabolite gene cluster in *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus niger*. *Int J Evol Biol*, 2011.
- Kocevski D, Du M, Kan J, Jing C, Lačanin I, Pavlović H. 2013. Antifungal effect of *Allium tuberosum*, *Cinnamomum cassia*, and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against population of *Aspergillus* species. *J Food Sci*, 78(5): M731-M737.
- Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Biores Technol*, 99(18): 8788-8795.
- Krijgsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB. 2013. Development in *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 74(1): 1-29.
- León K, Santiago J. 2007. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Rev Soc Quím*, 73(3): 158-165.
- Liu H, Gao C. 2009. Preparation and properties of ionically cross-linked chitosan nanoparticles. *Polym Advan Technol*, 20: 613-619.
- Lizcano-González MC. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclereotorium*. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 15-17 p.
- López-Hernández OD. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Rev Cub Farm*, 44(3): 381-389.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares LR. 2006. *Micología Médica*. 2<sup>a</sup> ed. Trillas: México, D.F.
- López-Meneses AK. 2014. Evaluación de actividad antifúngica de aceites esenciales en hongos micotoxigénicos. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Magan N, Hope R, Cairns V, Aldred D. 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur J Plant Pathol*, 109(7): 723-730.
- Martínez V, García A, Cabrera Y. 2013. Nota sobre la contaminación microbiana e incidencia de micotoxinas en alimentos para cerdos en Cuba. *Rev Comput Producc Porc*, 20(3): 133-135.

- Martínez-Camacho AP, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, Graciano-Verdugo AZ, Rodríguez-Félix F, Castillo-Ortega MM, Yépez-Gómez MS, Plascencia-Jatomea M. 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydr Polym*, 82(1): 305-315.
- Martínez-Padrón HY, Hernández-Delgado S, Reyes-Méndez CA, Vázquez-Carrillo G. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: Problemática y perspectivas. *Rev Mex Fitopatol*, 31(2): 126-146.
- Massi FP, Sartori D, de Souza Ferranti L, Iamanaka BT, Taniwaki MH, Vieira MLC, Fungaro MHP. 2016. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. *Int J Food Microbiol*, 221: 19–28.
- Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini SM. 2015. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Food Sci Emerg*, 28: 73-80.
- Monzón A, Rodríguez TJL. 2001. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud, SEIMC. Majadahonda.
- Moore D, Mcnutly LJ, Meskauskas A. 2005. Branching in fungal hyphae and fungal tissues: growing mycelia in a desktop computer. En: Davies, J.A. (Ed.), In *Branching Morphogenesis*. USA: Springer Science+Business Media, Inc. 75-90 p.
- Mycobank. 2015. *Aspergillus parasiticus*. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>. (Fecha de acceso: 18 de julio de 2015).
- Mycobank. 2015. *Fusarium verticillioides*. Disponible en: <http://www.mycobank.org/>. (Fecha de acceso: 18 de julio de 2015)
- Mycology Online. 2016. *Aspergillus niger* van Tieghem. Disponible en: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Aspergillus/niger.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/niger.html). (Fecha de acceso: 04 de mayo de 2016).
- Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. 2015. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7(9): 7729-7748.
- Narváez-Guerrero SA. 2006. Evaluación del efecto antifúngico *in vitro* del aceite esencial de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) puro y microencapsulado. Proyecto Especial de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 28p.

- Nogaim QA. 2012. Natural incidence of fungi and mycotoxins on corn grains in Ibb (Yemen). *Pakistan J Life Soc Sci*, 10(2): 111-115.
- Ono EYS, Fungaro MHP, Sofia SH, Miguel TDA, Sugiura Y, Hirooka EY. 2010. *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumonisin production and RAPD fingerprinting. *Braz Arch Biol Technol*, 53(4): 953-960.
- Parsai A, Eidi M, Sadeghipour A. 2014. Hepatoprotective effect of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves hydro-methanolic extract against *Aspergillus parasiticus* aflatoxin-induced liver damage in male rats. *Bull Pharm Res*, 4(3): 129-132.
- Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, Shirai K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromol Biosci*, 3(10); 582-586.
- Plumridge A, Hesse SJ, Watson AJ, Lowe KC, Stratford M, Archer DB. 2004. The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl Environ Microbiol*, 70(6): 3506-3511.
- Pietro JA, Patiño OJ, Plazas EA, Pabón LC, Ávila MC, Guzmán JD, Delgado WA, Cuca LE. 2013. Natural products from plants as potential source agents for controlling *Fusarium*. Chapter 10. *Fungicides-Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. Croacia: Intech, 233-78.
- Quintana-Obregón EA, López-Cervantes J, Cira-Chávez LA, Sánchez-Machado D, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO. 2011. Actividad antifúngica del quitosano contra *Alternaria tenuissima in vitro* y en semilla de cártamo. *Rev Mex Fitopatol*, 29(2): 168-171.
- Raafat D, von Barga K, Haas A, Sahl H-G. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol*, 74(12): 3764–3773.
- Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17(5): 359-364.
- Secretaría de Salud. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1–2002, Productos y Servicios: Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación*, 11.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>. (Fecha de acceso: 27 de junio de 2016).



- Shim WB, Woloshuk CP. 2001. Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. *Appl Environ Microbiol*, 67(4): 1607-1612.
- Soliman KM, Badeaa RI. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol*, 40(11): 1669-1675.
- Soliman EA, El-Moghazy AY, El-Din MM, Massoud MA. 2013. Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. *JEAS*, 2013, 3: 48-55.
- Souza JM, Caldas AL, Tohidi SD, Molina J, Souto AP, Fangueiro R, Zille A. 2014. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Rev Bras Farmacog*, 24(6): 691-698.
- Stark AA. 2009. Molecular mechanism of detection of aflatoxins and other mycotoxins. In *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer Berlin Heidelberg. 21-37 p.
- Tequida-Meneses M, Cortez-Rocha M, Rosas-Burgos EC, López-Sandoval S, Corrales-Maldonado C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam Micol*, 19: 84-88.
- Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, Eslamifar A, Zad SJ, Jaimand K, Taeb J, Rezaee MB, Kawachi M, Shams-Ghanfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Int J Food Microbiol*, 139(3): 127-133.
- Top Tropicals. 2016. Disponible en: <http://toptropicals.com/index.htm>. (Fecha de acceso: 26 de mayo de 2016).
- Torres O, Matute J, Gelineau-Van Waes J, Maddox JR, Gregory SG, Ashley-Koch AE, Showker JL, Voss KA, Riley RT. 2014. Human health implications from co-exposure to aflatoxins and fumonisins in maize-based foods in Latin America: Guatemala as a case study. *World Mycotoxin J*, 8(2): 143-159.
- Vega AS, Valdés LF, Rendón AC. 2012. Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT*, 38(128): 33-42.
- Velásquez CL. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1): 1-22.

- Vélez-Haro JM. 2013. Estudio de la respuesta fisiológica de estrés de *A. niger* en presencia de quitosano. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Velluti A. 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Tesis doctoral. Universidad de Lérida, España.
- Velluti A, Sanchis V, Ramos AJ, Egido J, Marí S. 2003. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int J Food Microbiol*, 89(2): 145-154.
- Xie Y, Yang Z, Cao D, Rong F, Ding H, Zhang D. 2015. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). *Ind Crop Prod*, 77: 780-786.
- Xing F, Hua H, Selvaraj JN, Yuan Y, Zhao Y, Zhou L, Liu Y. 2014. Degradation of fumonisin B1 by cinnamon essential oil. *Food Control*, 38: 37-40.
- Xing K, Zhu X, Peng X, Qin S. 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agron Sustain Dev*, 35(2): 569-588.
- Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich KC. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Rev Iberoam Micol*, 19(4): 191-200.
- Zhao Z, Liu N, Yang L, Wang J, Song S, Nie D, Wang J, Yang X, Hou J, Wu A. 2015. Cross-linked chitosan polymers as generic adsorbents for simultaneous adsorption of multiple mycotoxins. *Food Control*, 57: 362-369.