

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE AGRONOMIA

PLANTAS DE LA FAMILIA RUTACEAE CON ACTIVIDAD
FUNGICIDA EN *Aspergillus flavus* Link

por:

NORMA CECILIA CÁRDENAS ORTEGA



Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en
Ciencias Agropecuarias

Tutor: Dra. Claudia Romano Moreno.
Asesores: Dr. Ernesto Moreno Martínez.
Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel.

San Luis Potosí, S.L.P., México

Junio 1998

El trabajo titulado "Plantas de la familia Rutaceae con actividad fungicida en *Aspergillus flavus* Link" como requisito parcial para obtener el grado de "Maestro en Ciencias Agropecuarias" fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

Presenta: Norma Cecilia Cárdenas Ortega.

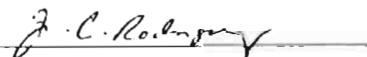
TUTOR: Dra. CLAUDIA ROMANO MORENO



ASESORES: Dr. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ



Dr. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL



Ejido Palma de la Cruz, municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 16 días del mes de mayo de 1998.

DEDICATORIA

Dios, gracias por darme tanto...

Con gratitud y amor a mi mamá Ma. Teresa Ortega de Cárdenas, quien con su ejemplo me ha enseñado la paciencia y la perseverancia en la lucha por los ideales.

Con mucho amor al Dr. Raúl A. Martínez Martínez, gracias por tu amor, tu compañerismo y apoyo incondicional para poder alcanzar mi sueño, y con todo mi cariño a Chari y Raulito, gracias por su gran ayuda y por todo lo bueno que me han brindado.

Como un tributo a la memoria de un gran hombre, mi papá Sr. Víctor Manuel Cárdenas Almaraz y de mis abuelitos Sr. J. Concepción Ortega García y Sra. Sara Camacho de Ortega

Con mucho cariño a toda mi familia, en especial:

A mis hermanas Maritere, Paty, Olga, Gaby y Alicia, a mis sobrinos Víctor, Manuel Antonio, Karla, Darío, Carlitos, Mauricio, Khadije, Sebastián, Raulito y Natalia. Por su cariño, su paciencia, por apoyarme en la desesperanza y alegrarse conmigo en los pequeños logros.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por esta gran oportunidad de superación profesional.

A la Dra. Claudia Romano Moreno, al Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel y al Dr. Ernesto Moreno Martínez, por su apoyo, sus enseñanzas y el privilegio de su sabia dirección.

De una forma muy especial mi cariño y profundo agradecimiento a la Q.F.B. Ana Luisa Salas Ortiz, por todo lo que me has enseñado, por tu apoyo y por tu incondicional amistad.

A la Q.F.B. Alicia Zavalza Stiker por todas las enseñanzas que a lo largo de mi vida profesional me ha brindado y en especial por sus atinados consejos en la elaboración de este trabajo.

A mis amigas: Dra. Silvia Romano, Q.F.B. Lourdes Rodríguez Borjas, Q.F.B. Lourdes Pedroza, Q.F.B. Claudia González, Q.F.B. Lourdes del Valle por su AMISTAD y cariño.

A mis amigas y compañeras: M. en C. Bertha Irene Juárez Flores y M. en C. Yolanda Jasso Pineda, por tantas cosas que compartimos y seguiremos compartiendo.

Al Laboratorio de Control de Calidad de CONASUPO, por el donativo de los materiales y reactivos, y las facilidades brindadas para la determinación de aflatoxinas. En especial al Biol. José Melgarejo Hernández y al Q.F.B. Salvador Sánchez Vázquez.

A la Ing. Agr. Sonia Salas de León y Q.F.B. Elida Lobo Ramírez por la identificación de las plantas de este estudio.

A la M. en C. Ma. Luisa Rodríguez Escobedo, M. en C. Jesús Antonio Flores Reyes, M. en C. Jesús Huerta Díaz, M. en C. Andrés Delgadillo Pascuali y M. en C. Clara Teresa Monreal por sus valiosas observaciones en la realización de este trabajo.

A los señores Hildeberto Jasso y Juana Pineda de Jasso por su valiosa orientación y ayuda, en la recolección de las plantas de este estudio.

En forma muy especial quiero agradecer a los alumnos de servicio social, becarios y tesisistas de los Laboratorios de Microbiología y Micología por cederme tantas horas de su trabajo y en especial a la Q.F.B. Miroslava Mireles Ontiveros y a la maestra Q.F.B. Lilia Frago Morales por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al personal de Laboratorios Altair, mis amigas y colaboradoras, Q.F.B. Norma Torres Camacho, Q.F.B. Marcela G. Cuevas Lara y Q.F.B. Magdalena Navarro Barrón por su gran ayuda.

A mis alumnas Ericka García Chávez, Lucía Martínez Villalpando y Angélica García Bonifant por su ayuda, su cariño y amistad.

A mis maestros por todas sus enseñanzas.

A todas las personas que de alguna forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Página.
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Almacenamiento de granos	4
II.2. Factores Involucrados en el Deterioro de los Granos	6
II.2.1. Humedad.	7
II.2.2. Temperatura.	8
II.2.3. Tiempo.	9
II.2.4. Secado y daño físico del grano.	9
II.3. Diversidad Agrícola en el estado de San Luis Potosí.	10
II.4. Plagas de Productos Acrícolas.	12
II.4.1. Hongos contaminantes de productos agrícolas.	12
II.4.2. Especies de hongos de importancia.	13
II.4.3. Clasificación de los hongos presentes en granos y semillas y sus requerimientos.	14
II.4.4. Género <i>Aspergillus</i>	17
II.4.4.1. <i>Aspergillus flavus</i> Link ex Grey.	18
II.4.4.1.1. Identificación.	18
II.4.5. Micotoxinas.	21
II.4.5.1. Tipos de micotoxinas.	21
II.4.5.2. Condiciones que favorecen el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas.	23
II.4.5.3. Aflatoxinas.	23
II.4.5.3.1. Métodos de análisis de aflatoxinas.	30
II.4.6. Implicaciones generales de los hongos en granos y sus derivados.	31
II.5. Control de Plagas en Granos Almacenados.	33
II.5.1. Medidas de combate indirecto.	33
II.5.1.1. Prácticas culturales, secado del grano.	34
II.5.2. Medidas de combate directo.	34
II.5.2.1. Plaguicidas.	34

II.5.2.1.1. Generalidades.	34
II.5.3. Manejo integrado de plagas.	35
II.5.3.1. Control genético.	35
II.5.3.2. Control biológico.	36
II.5.3.3. Control legal (cuarentenas).	36
II.5.3.4. Control cultural.	37
II.5.3.5. Control químico.	37
II.5.4. Utilización de plaguicidas en México.	37
II.6. Plantas con actividad antifúngica.	39
II.6.1. Efecto de plantas en <i>Aspergillus</i>	44
II.6.2. Familia Rutaceae.	47
.....	
II.6.2.1. Características morfológicas.	47
II.6.2.2. Géneros principales.	47
II.6.2.3. Rutáceas presentes en México.	48
II.6.2.4. Rutáceas presentes en el estado de San Luis Potosí.	48
II.6.2.5. Distribución geográfica.	49
II.6.2.6. Composición química de las rutáceas.	49
.....	
II.6.3. Localización y descripción morfológica de las rutáceas en estudio.	49
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	52
III.1 Ubicación del estudio.	52
III.2. Recolección del Material Vegetal.	52
III.3. Preparación de los Extractos Vegetales.	52
III.4. Estandarización del Inóculo de <i>Aspergillus flavus</i> Link.	53
III.5. Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Extractos de Rutáceas.	54
III.6. Determinación del tipo de Actividad Antifúngica (Fungicida o Fungistática).	54
III.7. Determinación de Concentración Mínima Fungicida.	55
III.8. Prueba de Protección del Grano en Almacén.	55
III.9. Análisis de resultados.	57
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	58
IV.1. Evaluación de la Actividad Antifúngica.	58
IV.2. Actividad Fungicida o Fungistática.	62
IV.3. Concentración Mínima Fungicida contra <i>A. flavus</i> Link.	62

IV.4. Prueba de Protección de Grano de Maíz en Almacén.	63
V. CONCLUSIONES.	67
VI. RECOMENDACIONES.	68
VII. LITERATURA CITADA.	69

INDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro 1. Principales tipos de cultivos y municipios productores en el estado de San Luis Potosí. Volumen de producción en el año agrícola 93/94 por disponibilidad de agua según el tipo de cultivo.	11
Cuadro 2. Contenidos de humedad de diferentes granos y semillas en equilibrio con humedades relativas de 65 a 90% y hongos que comunmente se les encuentra bajo esas condiciones de humedad.	15
Cuadro 3. Algunas toxinas producidas por especies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Fusarium</i>	22
Cuadro 4. Principales propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas.	27
Cuadro 5. Plantas de la familia Rutaceae recolectadas en el estado de San Luis Potosí.	59
Cuadro 6. Estandarización del inóculo de <i>Aspergillus flavus</i> Link. (+) carta de Wickerham API 20 C (1×10^6 conidios/mL).	60
Cuadro 7. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de rutáceas. Prueba de selección de extractos activos (100 μ L = 50 mg).	61
Cuadro 8. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Actividad antifúngica.	58
Cuadro 9. Análisis de Varianza (ANOVA) Concentración Mínima Fungicida.	63
Cuadro 10. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) de extractos de rutáceas en <i>Aspergillus flavus</i> Link.	64
Cuadro 11. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Propágulos/g a 20 días de almacenamiento.	65
Cuadro 12. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Aflatoxinas μ g/kg a 20 días de almacenamiento.	65
Cuadro 13. Prueba de protección de maíz cacahuazintle a la infección por <i>A. flavus</i> Link (10 000 propágulos), 20 días de almacén a 26°C.	66

INDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Cabeza conidial <i>Aspergillus flavus</i> Link ex Grey.	20
Figura 2. Estructuras moleculares de las aflatoxinas.	28

RESUMEN

En la producción agrícola de alimentos para el hombre y sus animales domésticos, debido al ataque de plagas, se pierden grandes volúmenes de granos por el desconocimiento y el uso inadecuado de las técnicas de conservación para el combate de los hongos, de los insectos y de los roedores; plagas que deterioran la calidad nutricional y sanitaria del grano, el poder germinativo de las semillas y en general el valor económico de los productos agrícolas almacenados. Los hongos contaminantes de granos pueden producir toxinas que imposibilitan su consumo. Por lo tanto, es imprescindible buscar nuevos métodos de combate alternativos a los químicos actuales, que son costosos y contaminantes, y que inclusive favorecen el desarrollo de organismos resistentes a dichos plaguicidas. En este trabajo se determinó la actividad fungicida de extractos por maceración etanólica e infusión acuosa de ramillas, ramillas con flor y frutos de las Rutáceas: *Helietta parvifolia*, *Ptelea trifoliata*, *Casimiroa pringlei*, *Citrus limonia*, *Citrus aurantium* y *Citrus medica*. Para ello se utilizó la técnica de pozo en agar Czapek frente a control negativo, en el cual todos los extractos etanólicos con excepción de los de *Citrus medica* manifestaron actividad antifúngica frente a *Aspergillus flavus* Link (Tukey=0.418, $p < 0.05$). Con concentraciones decrecientes de estos extractos, en medio líquido frente a *A. flavus* Link, se estableció la concentración mínima fungicida (CMF); los mejores resultados fueron para *Citrus limonia*, fruto inmaduro 125 mg mL^{-1} ; fruto maduro 250 mg mL^{-1} y las ramillas con flor de *Casimiroa pringlei*, 312.5 mg mL^{-1} ; equivalentes a 500, 1000 y 1250 mg de planta seca, respectivamente. En la evaluación de su capacidad de protección de granos de maíz cacahuazintle a la infección por *A. flavus*, los extractos etanólicos de frutos inmaduros y maduros de *C. limonia* y de las ramillas con flor de *C. pringlei*, manifiestan actividad protectora a la infección por *A. flavus* ($p < 0.05$) por lo que inhiben la producción de aflatoxinas ($p < 0.05$).

ABSTRACT

In the food agricultural production for the human and domestic animals, due to the plague attack, great volume of grains have lost, mainly because the people unknown or use erroneously the technique of conservation for the combat of the fungi, the insects and the rodent; pest that deteriorate the nutritional quality and sanitary of grains, its capacity of germination of the seeds and general, its economic value of the agricultural products stored. The contaminant fungi in grains produce toxins and make impossible to eat those grains. For these reason is essential to find new control methods, different from actual chemical products, that are expensive and contaminants, and allow the development of resistant organisms. In this research, our goal was to determine the fungicide activity, in vitro, of plants extracts by ethanolic maceration and water infusion of branch, branch with flowers and fruits of Rutaceas' species: *Helietta parvifolia*, *Ptelea trifoliata*, *Casimiroa pringlei*, *Citrus limonia*, *C. aurantium* and *C. medica*; to develop these experiment we used the well technique in Czpek agar and a negative control, all ethanolic extracts, with exception of the *C. medica* showed antifungus activity against *Aspergillus flavus* Link (Tukey=0.416, $p < 0.05$); and with decreasing concentrations of these extracts in liquid culture against to *Aspergillus flavus* Link we find the minimum fungicide concentration (CMF), the best results were in *Citrus limonia*, unripe fruit 125 mg mL^{-1} ; ripe fruit 250 mg mL^{-1} and *Casimiroa pringlei* branch with flowers, 312.5 mg mL^{-1} ; equivalents to 500, 1000 and 1250 mg of dried plant respectively. In the evaluation of protection capacity of cacahuazintle corn grains in the infection by *A. flavus*, ethanolic extracts from unripe and ripe fruits of *C. limonia* and the branch with flowers of *C. pringlei* show protected activity in the infection by *A. flavus* ($p < 0.05$) and is the cause of inhibition in the production of aflatoxins ($p < 0.05$).

I. INTRODUCCIÓN

Durante la recolección, transporte, almacenamiento y distribución, las cosechas de maíz, trigo, arroz, sorgo, frijol, etc., son objeto de ataque por una diversidad de plagas de insectos, hongos, roedores, pájaros, etc., que causan pérdidas estimadas entre el 15% y el 25%, lo que depende de las condiciones del lugar (SARII, 1980). Reducir estas pérdidas es el objetivo primordial de los diversos estudios para contrarrestar las plagas de los granos almacenados.

Dependiendo de la tecnología postcosecha que se utilice para almacenar el maíz, las pérdidas que ocasionan dichas plagas pueden llegar a 30%. La cantidad de grano que anualmente se pierde a nivel mundial y nacional puede llegar a ser cuantiosa, por el desconocimiento y el uso inadecuado de las técnicas de conservación para el combate de los hongos, de los insectos y de los roedores. La situación es más alarmante en áreas tropicales donde las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de hongos e insectos, plagas que deterioran de manera importante la calidad nutricional y sanitaria del grano, el poder germinativo de las semillas y en general el valor económico de los productos agrícolas almacenados.

Sin embargo, el efecto que dichos factores tienen sobre la calidad del grano puede ser aun más importante por su impacto en la salud pública y animal. La reducción en la calidad del grano puede reflejarse en una baja sensible de su valor comercial, pero peor aun, lo puede ser el ataque de ciertos hongos como *Aspergillus flavus* Link, que pueden generar la producción de sustancias altamente peligrosas que afectan al ser humano y a los animales domésticos.

A. flavus es un hongo que con frecuencia infecta el maíz almacenado y es responsable de producir una sustancias altamente tóxicas como son las aflatoxinas. Actualmente se conocen varios tipo de aflatoxinas, entre ellas: B₁, B₂, M₁, G₁ y G₂. De éstas, las aflatoxinas B₁ son las más comunes, las más tóxicas y con propiedades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas ampliamente reconocidas.

A pesar de la tremenda amenaza que representan las aflatoxinas para el ser humano, la diversidad de fungicidas autorizados para su combate es muy limitada. Además, junto con el uso indiscriminado de funigantes que pueden ocasionar la generación de plagas resistentes, convierte su presencia en un factor de riesgo oncogénico. Por lo que es imprescindible buscar nuevos métodos de combate alternativos a los químicos actuales que son costosos y contaminantes, y que inclusive favorecen el desarrollo de organismos

resistentes a dichos plaguicidas. Por ello se ha intensificado la búsqueda de opciones como el uso de extractos de plantas para el control de hongos fitopatógenos y de almacén, que sean económicas, efectivas, no contaminantes para el ambiente, abundantes en el entorno y que no representen ningún riesgo importante para la salud humana y animal. Las plantas de la familia Rutaceae podrían contener metabolitos secundarios con actividad fungicida, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto fungicida de extractos de plantas de la familia Rutaceae en *Aspergillus flavus* Link.

II. ANTECEDENTES

La base del desarrollo exitoso de una sociedad se fundamenta en su capacidad para producir, almacenar y distribuir alimentos. El aumento en la productividad de granos y cereales trae como consecuencia la necesidad de almacenar estos productos para lograr una oferta sostenida en épocas y regiones de mayor demanda. Similarmente, los técnicos postcosecha han diseñado metodologías efectivas para reducir las pérdidas de las cosechas durante el almacenamiento (Gómez, 1995).

El rendimiento de las cosechas en todo el mundo se reduce por los efectos de una gran diversidad de plagas de insectos, hongos, bacterias, malezas, etc. En EUA la producción agrícola aumentaría en un 33% si se lograra controlar las plagas y es de gran significado las pérdidas similares para los países que más sufren sus efectos y que cuentan con menos recursos para alimentar a sus poblaciones (Naturaleza, 1982). Este problema es más importante porque la mayoría de los pequeños productores carecen de sitios para almacenamiento adecuados y el lugar donde guardan sus cosechas no cuenta con las condiciones mínimas sanitarias, por lo que las pérdidas pueden ser muy grandes.

El siglo XX ha sido uno de los periodos más importantes en la historia del hombre, una razón ha sido el gran incremento y la mejora en la estabilidad de la producción de alimentos, especialmente a partir de la Segunda Guerra Mundial. En este siglo es cuando la agricultura ha cambiado desde una actividad tradicional a una industria basada en la ciencia y tecnología. El cambio hacia una agricultura científica significa una producción mayor y más estable, y una mejor calidad de vida para millones de personas. La disponibilidad de alimentos básicos producidos en el propio país para los sectores de escasos recursos económicos, es un elemento de gran importancia para el mantenimiento de la paz social.

El desarrollo más importante en el siglo XX, ha sido nuestra habilidad para producir grandes cosechas que establezcan la seguridad alimentaria para una población mundial creciente. Solamente hace 20 o 30 años, comentaristas internacionales pronosticaron hambrunas a nivel global y estimaron que millones de personas morirían de hambre a finales de este siglo. Estas predicciones no se han llevado a cabo porque la producción agrícola se ha comportado mucho mejor que lo esperado. La agricultura científica ha sido responsable de la mayoría de las ganancias obtenidas en la producción de alimentos. Estas ganancias se deben a la mejora del potencial genético de las especies, mejores prácticas

de manejo y mejoras en la capacidad de almacenar y proteger estas cosechas (Gómez, 1995).

Desde la Segunda Guerra Mundial, los países industrializados han dependido cada vez más del uso de sustancias químicas para proteger sus cosechas. El efecto biológico de los plaguicidas es rápido, pueden almacenarse y transportarse con facilidad y se conservan por mucho tiempo. Sin embargo tienen desventajas que se hacen cada vez más evidentes. Los agricultores que fueron los últimos en admitir los efectos secundarios dañinos de los plaguicidas, cuestionan ahora su utilidad y eficacia (Naturaleza, 1982).

II.1. Almacenamiento de Granos.

La producción de maíz en México al igual que en otros países latinoamericanos, se ha llevado a cabo en dos sistemas de explotación agrícola: la del pequeño productor de escasos recursos económicos y tecnológicos y el de tecnología avanzada, llevada a cabo por productores de mejores recursos económicos. Es por ello que la problemática de postcosecha del maíz difiere considerablemente en cuanto a la magnitud de las pérdidas cuantitativas y cualitativas, pero no en cuanto a los factores que las provocan.

Tradicionalmente, la producción de maíz se lleva a cabo por los productores de escasos recursos, el manejo que ellos dan al maíz en sus campos y en sus fincas, se refleja en la calidad del grano que se comercializa en los centros urbanos de consumo y de industrialización, si ya han sido afectados los granos, se encuentran en condiciones de más vulnerabilidad para seguir perdiendo calidad nutricional y sanitaria cuando lleguen a las almacenadoras comerciales. Además, el pequeño productor guarda alrededor del 30 a 40% de su cosecha para autoconsumo, por lo que el grano debe ser conservado en buenas condiciones ya que representa su alimento cotidiano.

La disponibilidad de granos no solamente depende de la producción, sino también del manejo postcosecha; lo que ya se ha producido puede perderse por deficiencia en el sistema de almacenamiento y de la conservación de las cosechas, también depende de la adecuada distribución (Moreno, 1995).

La magnitud de las pérdidas varía de país a país y de región en región dentro de un país, por la situación geográfica, económica, del nivel educativo y de su avance tecnológico. Las pérdidas postcosecha, tanto en su naturaleza como por la forma en que los granos se manejan, son difíciles de determinar con precisión; por lo que solo existen estimaciones, a nivel local llegan al orden del 30% o más, pero a nivel mundial se estiman en 5 a 10%. Las pérdidas reales se enmáscaran por dos prácticas que comúnmente se

realizan: la mezcla de grano dañado con grano sano y la utilización del grano dañado para la alimentación de animales domésticos (Moreno, 1991; Schneider, 1995a).

Las pérdidas cuantitativas y cualitativas de las cosechas se inician en el campo desde el momento en que los granos alcanzan su madurez fisiológica. Esta madurez se alcanza cuando los granos dejan de acumular carbohidratos y otros componentes nutritivos y obtienen su mayor peso seco; es en ese momento en el que prácticamente se inicia el almacenamiento de las cosechas. La magnitud y la rapidez con que dichas pérdidas ocurren dependen de la manera en que los granos son manejados, después de que estos están listos para ser cosechados. Poca importancia se le ha dado a las pérdidas cualitativas de los granos, las que significan un riesgo de sanidad pública y animal por la reducción de su calidad nutricional y sanitaria (Moreno, 1991; 1995).

El maíz puede ser cosechado cuando el grano tiene una humedad de 30 a 35%; lo cual implica un secado inmediato del grano. Este tipo de cosecha se recomienda para semilla de maíz. Sin embargo, para los grandes volúmenes de grano destinados a la alimentación, ese manejo no ha sido rentable por el alto costo de la infraestructura para la cosecha y el secado de las mazorcas (Schneider, 1995b).

Una vez que el maíz ha sido cosechado; las mazorcas o el grano, lo cual en el medio rural se hace manualmente, se almacenan en diversos tipos de estructuras, desde las trojes tradicionales, cuartos habitación del campesino hasta los silos metálicos herméticos, que en México, se han utilizado de manera empírica en algunos estados del sureste del país.

Dado el estado actual del almacenamiento de granos en el nivel rural se requiere una rápida y efectiva acción para aminorar las pérdidas en cantidad y calidad de los granos y muy en particular del maíz, que se almacena en miles de pequeñas fincas rurales. La tendencia principal debería ser la de apoyar la producción y el manejo en forma colectiva para optimizar el uso de los recursos económicos, tecnológicos y de asistencia técnica, que son difíciles de canalizar hacia ese sector, por la disgregación en la producción y en el almacenamiento de este grano, así como favorecer el establecimiento de pequeñas industrias que transformen el maíz en productos con valor agregado, como lo puede ser la harina de maíz.

El almacenamiento del maíz se ha llevado a cabo tradicionalmente en tres sectores: el oficial, el privado y el sector rural. Al igual que en todos los países latinoamericanos, en México el sector más desprovisto de tecnología de poscosecha es el de los campesinos del medio rural (Moreno, 1995).

En la República Mexicana se produce anualmente 10 300 000 ton de maíz, 1 000 000 ton de frijol, 3 700 000 ton de sorgo y 680 000 ton de soya como principales productos alimenticios (INEGI, 1995a), pero gran parte de campesinos mexicanos que

practican una agricultura de subsistencia, almacenan todos los años parte de su cosecha en un tipo de troje rústico, cuya forma y estructura varía con la región. En este tipo de almacén, el campesino guarda regularmente el maíz en mazorca o desgranado o el frijol en costales (Sifuentes, 1977). En San Luis Potosí la mayoría de los pequeños agricultores guardan poco o casi nada de sus cosechas ya que conforme van cosechando, consumen los productos ellos mismos o los utilizan para alimentar a sus animales. El grano que es conservado se guarda en almacenes rústicos, desgranado o en mazorca y fumigado algunas veces, pero la mayoría sin protección.

En el estado existen 145 116 unidades de producción, de las cuales 66 956 son rurales y destinadas a autoconsumo y 55 398 son ejidales de las cuales 53 251 destinan su producción a autoconsumo y venta local y nacional. En el año 1994, 10 752 unidades de producción no reportaron producción (INEGI, 1995b).

II.2. Factores Involucrados en el Deterioro de los Granos.

Uno de los principales papeles de las estructuras para el almacenamiento es el de aislar y proteger los productos de los agentes climáticos y bióticos que inciden en el deterioro de las cosechas. La carencia de estructuras adecuadas así como del equipo para secar, limpiar y mantener los granos bajo buenas condiciones durante su transporte y almacenamiento hacen posible que factores físicos, la humedad y la temperatura favorezcan la acción de los insectos y de los hongos de almacén, además estructuras inadecuadas permiten la entrada de roedores y pájaros que merman las cosechas de manera cualitativa y cuantitativa. Estos factores ocasionan cambios en el grano y todos están íntimamente relacionados entre sí (Moreno, 1995; Schneider, 1995a).

El mayor problema detectado que puede afectar la calidad de los granos almacenados es el ataque de plagas, el cual se presenta prácticamente en todas las bodegas y silos donde se conserva el grano. Este ataque de plagas representa un 68.3% de los problemas, seguido de contaminación por polvo en un 22% e infiltración de agua por los techos de las bodegas en un 5%. Se presentan otros problemas menores, como son los causados por la condensación del agua en 1.5% y cambio en el contenido de humedad en algunos sitios puntuales de la masa de grano en un 3.2 %.

El contenido de humedad, la temperatura, los hongos, los insectos, las impurezas presentes en la masa de granos, los daños físicos y los roedores son factores que influyen en su conservación durante el almacenamiento. De estos factores, los principales que influyen en el deterioro de los granos son la temperatura y el contenido de humedad. En

general mientras más seco y frío se conserva el grano en el almacén, mayor será el periodo que permanecerá en buenas condiciones (Ospina, 1995).

Miembros de la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), estiman que el 5% de los granos cosechados se pierden antes de su consumo. En México el problema de la conservación de los granos y semillas reviste mayor importancia por la carencia de buenos almacenes y de medidas sanitarias adecuadas para el almacenaje, especialmente en las áreas cálidas y húmedas, las cuales propician las plagas que dañan al grano (Ospina, 1995).

La principal pérdida económica es ocasionada por insectos, los cuales llevan normalmente inoculada una carga de hongos de almacén. A medida que estos insectos se desarrollan en los granos aumenta el contenido de la humedad del grano por el agua que producen durante su metabolismo y favorecen el rápido crecimiento de los hongos (Beti, 1995). Los insectos elevan la temperatura del grano plagado y provocan un desarrollo más rápido de los hongos que a su vez constituyen un alimento rico en proteínas y carbohidratos para los insectos. Existe un verdadero reciclaje de nutrimentos entre insectos, hongos y granos (Ramírez, 1981).

II.2.1. Humedad.

La humedad es el factor más importante en la conservación de los granos, tanto la del ambiente (humedad relativa) como el agua en los granos (contenido de humedad), ya que la disponibilidad de agua es determinante en el desarrollo de los insectos y de los hongos de almacén, así como su efecto sobre los procesos fisiológicos de las semillas, de los que depende la pérdida de vigor y viabilidad (Moreno 1995; 1996; Schneider, 1995b).

El agua contenida en los granos y semillas se ha clasificado en tres categorías: agua de absorción, que se encuentra en los espacios intragranulares y en los poros del tejido vegetal, se mantiene por fuerzas capilares; agua de adsorción, que se encuentra ligada al material por atracción molecular y el agua de composición, que esta químicamente unida a los elementos constitutivos de las semillas. En las determinaciones de humedad de los granos por métodos que remueven el agua, se elimina fácilmente el agua de absorción y de adsorción que se considera como agua libre, pero de acuerdo a la temperatura y al periodo de secado utilizado también se remueve parte del agua de composición (Moreno, 1984; 1996).

Algunos de los insectos de almacén pueden desarrollarse a humedades muy bajas, como *Sitophilus zeamais* y *S. granarius*, que son los insectos más importantes en el

deterioro del maíz almacenado. En estos niveles de humedad, la actividad de los hongos de almacén es muy baja, los hongos que pueden crecer a esas bajas humedades lo hacen muy lentamente y sus efectos también son lentos y poco perceptibles como *Aspergillus halophilicus*. Los hongos de almacén que más daño causan a los granos y semillas requieren una actividad del agua superior a 0.75%, que corresponde a humedades relativas superiores al 75% y a contenidos de humedad del grano de maíz superiores al 13%. Entre estos hongos están los miembros de los grupos *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus flavus*.

La humedad contenida en los granos y semillas no se distribuye en forma uniforme, no solamente dentro de la masa del grano, sino de grano en grano, aun en granos que se encuentran juntos. Por lo que las cifras que se obtienen al determinar la humedad, siempre seran un promedio y se debe considerar las implicaciones que esto tiene para el adecuado manejo de los granos y semillas. Además de la distribución errática de la humedad, el desarrollo de las diferentes especies de hongos ocurre en forma exponencial como respuesta a pequeñas diferencias de humedad de tan solo 0.2 % en los granos (Moreno, 1984; 1995).

Hay que considerar que el agua contenida en los granos es un factor muy importante en el comercio de los mismos; de su manejo y sobre todo de su medición depende que el productor sea perjudicado, la mayor de las veces, o sea beneficiado lo que raramente ocurre en el momento de la recepción.

II.2.2. Temperatura.

Es un factor de importancia en la conservación de las cosechas, por su efecto en el desarrollo de las poblaciones de insectos y de hongos. Estos últimos pueden crecer desde temperaturas muy bajas (0°C) hasta temperaturas que llevan al calentamiento de los granos (45°C), y en ocasiones hasta su combustión. El desarrollo de los hongos a temperaturas bajas es lento, incrementándose a medida que la temperatura es mayor. Los insectos reducen su actividad a temperaturas menores de 18°C, y quedan prácticamente inactivos a temperaturas alrededor de 10°C (Moreno, 1995).

En el lugar de almacenamiento es necesario tomar en cuenta la temperatura del aire y del grano. En un clima muy frío, los insectos y hongos no crecen muy rápidamente o no crecen del todo y las semillas no respiran en gran medida, por lo que se retrasa su deterioro. En lugares cálidos los hongos, insectos y semillas respiran más rápido y causan un incremento de temperatura y humedad, por lo que se llega a extremos de

descomposición total si se dejan sin cuidado. El contenido de humedad y temperatura interactúan constantemente por lo que es necesario mantener el grano seco y fresco (Schneider, 1995a).

II.2.3. Tiempo.

El factor tiempo también es importante en el deterioro de los granos por la acción de los hongos y los insectos. A periodos largos de almacenamiento, corresponde un mayor riesgo de daño, lo cual es directamente proporcional al contenido de humedad y a la temperatura. Para determinar el periodo de almacenamiento se requiere conocer con precisión la humedad del grano y la del ambiente, así como la temperatura y condición del grano y niveles de infestación por insectos y contaminación por hongos.

La única manera de combatir los hongos de almacén, es almacenar las semillas a contenidos de humedad relativa baja del 70 a 75%, conforme aumenta la humedad relativa el periodo de buen almacenamiento se reduce por la presencia de hongos y por la acción de los procesos fisiológicos de las semillas, o bien almacenar las semillas a temperaturas muy bajas, para reducir con ello la velocidad de desarrollo de los hongos y los procesos de deterioro. Almacenar las semillas a temperaturas bajas permite prolongar los periodos de almacenamiento, sin embargo, esto solo es posible para la conservación de semillas básicas, bancos de germoplasma o bien para semillas cuyo valor permite agregarles el costo del almacenamiento a bajas temperaturas (Moreno, 1996).

II.2.4. Secado y daño físico del grano.

La mayoría de los agricultores, en el medio rural, secan su grano en el campo de producción hasta que el grano alcanza un contenido de humedad alrededor del 14%. En algunas regiones doblan la planta del maíz para que la mazorca quede inclinada hacia el suelo, o bien sin doblar las plantas. En otras regiones cortan las plantas de maíz con todo y la mazorca y las ponen a secar en el campo con diferentes arreglos. Las plantas y mazorcas permanecen en los campos de 2 a 4 semanas, para luego proceder a la cosecha manual. Durante el tiempo que el grano está en el campo, existen fluctuaciones muy grandes en el contenido de humedad y están expuestas al ataque de insectos, hongos, roedores y pájaros. Este almacenamiento en el campo es la manera más favorable para el inicio acelerado de las pérdidas postcosecha. El grano que se seca en el campo siempre

tendrá daño físico. Gran parte de la producción de grano se seca en forma natural, expuesto a los rayos solares y a las corrientes de aire en la propia planta y se utilizan patios apisonados o de concreto. El secado artificial se realiza en los centros de acopio (Moreno, 1995; Schneider, 1995b).

El secado de los granos es una importante fuente de daño físico, que induce la formación de fisuras, las que pueden llevar a la fragmentación del grano al golpearse en los ductos de transporte o en las caídas normales dentro de las estructuras de almacenamiento. Ese daño físico se refleja en el ataque de los hongos, en la pérdida de viabilidad, en la cantidad de grano con fisuras, de grano quebrado y la presencia de partículas provenientes de dicho daño. La cuantificación de estas características de deterioro físico permiten inferir la almacenabilidad del grano, pudiéndose establecer disposiciones operativas respecto al manejo de un determinado lote de grano, dependiendo de su condición física y biológica (Moreno, 1995).

Cualquiera que sea el método de secamiento, el grano trata de estar en equilibrio con su ambiente. Para almacenamiento seguro del maíz, se debe evitar que el grano tenga un contenido de humedad en equilibrio mayor de 14% (Schneider, 1995b).

Grano en buena condición física y biológica, es grano que puede almacenarse por periodos más largos que grano dañado, ya que está menos expuesto al ataque de los hongos. Un conocimiento preciso y continuo de la condición del grano durante su almacenamiento permitirá tomar decisiones inteligentes, en cuanto a cómo se debe manejar y disponer de los diferentes volúmenes de granos (Moreno, 1995).

II.3. Diversidad Agrícola en el estado de San Luis Potosí.

El maíz en México es considerado como alimento básico. En el estado de San Luis Potosí en el ciclo 94-95 alcanzó el 42.2% del área cultivable. En los años 93-94 en el ciclo primavera-verano, el 8.44% es cultivado con riego y el 91.56% es de temporal. En el ciclo otoño-invierno, el 9.55% es de riego y el 38.87% corresponde a cultivo de temporal. De todos los cultivos realizados, solamente el 44.39% son atendidos con servicios de sanidad vegetal (INEGI 1995a; INEGI, 1995b y SAGAR 1995).

El maíz es el primer producto agrícola de importancia en el estado, tanto en los ciclos primavera-verano como otoño-invierno. En el estado de San Luis Potosí, los cultivos principales son: maíz, frijol, sorgo y forrajes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales tipos de cultivos y municipios productores en el estado de San Luis Potosí. Volumen de producción en el año agrícola 93/94 por disponibilidad de agua según el tipo de cultivo (INEGI, 1995a).

Cultivos y Municipios	Volumen (toneladas)		
	Total	Riego	Temporal
Maíz	198 688	68 218	130 470
Ebano	58 614	9 912	48 709
Rioverde	34 245	15 807.5	18 437.5
Cd. Fernández	19 973.8	6 944.8	13 029
Tamuín	18 380	1 518	16 862
Villa Juárez	8 295.1	2 932.6	5 362.5
Guadalcázar	7 103.3	642.4	6 464.9
Frijol	48 050	17 221	30 833
Villa de Ramos	23 569	10 930	12 639
Santo Domingo	10 428	1 259	9 169
Salinas	2 574	480	2 094
Charcas	1 302	--	1 302
Maíz-Frijol	23 607	3 538	20 069
Villa de Ramos	6 586	--	6 586
Salinas	4 587	--	4 587
Rayón	2 997	28	2 969
Cd. Fernández	2 042	2 024	18
Sorgo-grano	43 560	5 994	37 566
Ebano	22 238	4 760	17 478
Tamuín	8 004	990	7 014
Cerritos	7 060	78	6 982

II.4. Plagas de Productos Agrícolas.

La principal plaga de los productos agrícolas la constituyen los insectos, los cuales se alimentan y arruinan una gran cantidad de granos. Algunos como los gorgojos se desarrollan dentro de los granos y no se pueden ver hasta que han causado mucho daño. La actividad de los insectos y el daño que provocan, está muy relacionado con la temperatura, humedad y el manejo del grano en el almacén. Solamente se necesitan unos cuantos insectos bajo las condiciones adecuadas para que aparezcan grandes poblaciones. A mayor población de insectos, mayor temperatura y humedad lo que favorece el desarrollo de hongos y otros microorganismos (Schenider, 1995a).

En general, los microorganismos son los segundos en importancia en las pérdidas de los granos, sin embargo, pueden llegar a ser los primeros por las condiciones del lugar. El deterioro de los granos es causado por tres tipos de microorganismos: hongos, bacterias y levaduras, cada uno requiere de factores específicos de oxígeno, nutrientes, humedad y temperatura. De esta forma las condiciones ambientales determinan el tipo de microorganismo que va a prevalecer en el producto y será el que cause el mayor daño (Schneider, 1995c).

II.4.1. Hongos contaminantes de productos agrícolas.

Los hongos pertenecen al Reino Fungi. Son eucariotes heterótrofos por lo que dependen de la obtención de compuestos orgánicos a través de sus actividades saprofiticas o parasitarias. Están constituidos por estructuras tubulares llamadas hifas, las cuales en algunas especies se mantienen simples y forman lo que se conoce como micelio, y en otras se agregan para formar estructuras con cierto grado de complejidad, como lo son las llamadas setas u hongos superiores. Las levaduras son una excepción a esta característica por ser unicelulares. La reproducción de los hongos se realiza por medio de propágulos de origen asexual (conidias) y sexual (esporas) o bien, por estructuras vegetativas como el micelio o estructuras derivadas del mismo.

Los hongos tienen una influencia directa sobre el bienestar del hombre, por ser altamente benéficos como en la producción de antibióticos. Otros hongos presentan un papel muy importante en la naturaleza como degradadores de materia orgánica, pero por otra parte, los hongos son la principal causa de enfermedades de los cultivos agrícolas y pueden afectar severamente la economía del hombre (Moreno, 1988).

SISTEMA DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE
SAN LUIS POTOSÍ

Los hongos son los microorganismos más importantes en el grano, son aerobios o sea que necesitan oxígeno para vivir; se reproducen por medio de esporas que bajo condiciones climáticas apropiadas producen estructuras filamentosas llamadas hifas. Las hifas penetran la cubierta (capa externa) del grano y avanzan hasta el embrión y éste se decolora. Las esporas son muy resistentes a condiciones adversas como frío, calor, sequedad y falta de nutrientes. Los hongos pueden llegar a sobrevivir meses y años en forma de esporas.

Los hongos son pequeños organismos que causan daño al producir compuestos químicos que pueden detener la germinación y el crecimiento de las semillas; producen semillas arrugadas y sustancias tóxicas, y disminuyen la calidad del grano para la alimentación y el comercio. El daño producido por hongos se detecta con la vista y el olfato: decoloran el grano y producen mal sabor y olor. La única salvación para proteger el grano del ataque de hongos en el almacén es secarlo y guardarlo en un lugar seco, fresco y sin insectos (Schneider, 1995d; 1995c).

La alimentación humana y animal en gran parte se basa en el consumo de granos y sus derivados, los que frecuentemente son invadidos por hongos, que causan la contaminación de los mismos con sustancias tóxicas: las micotoxinas.

Las personas involucradas en la producción pecuaria y los encargados del almacenamiento de los granos destinados al consumo humano y de las semillas agrícolas, demandan información sobre los hongos que invaden a estos productos para prevenir los problemas que ocasionan y a sus metabolitos tóxicos a través de un manejo adecuado de los granos y semillas después de la cosecha (Moreno, 1988).

II.4.2. Especies de hongos de importancia.

Los granos y las semillas son invadidos por diversos hongos en el campo: *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Diplodia*, *Curvularia*, *Phoma* y *Mucor* entre otros, que causan enfermedades a las plantas y que son transmitidos de un ciclo agrícola a otro a través de las semillas. Por otra parte, también los granos y las semillas son invadidos por hongos cuyo hábitat natural no es el campo sino el almacén, la bodega, el silo y las trojes y son atacados principalmente por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Moreno, 1988; Schneider, 1995c).

II.4.3. Clasificación de los hongos presentes en granos y semillas y sus requerimientos (Moreno, 1988; Schneider, 1995c).

Los granos pueden ser invadidos por los hongos durante su formación en la planta, en la cosecha, transporte, acondicionamiento y almacenamiento. Por las condiciones ambientales en las que se desarrollan los hongos se han clasificado en: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado (Moreno, 1988, Schneider, 1995c).

1. Hongos de campo. Son agentes causales de enfermedades de los cultivos e invaden a los granos en el campo, son transportados por el aire, la erosión, los animales o através del suelo. Su existencia varía de acuerdo al cultivo, localidad, sistema de cosecha y condiciones ambientales. En general el microclima alrededor del grano posee condiciones de humedad suficientes para su desarrollo.

2. Hongos de granos almacenados u hongos de almacén. Se desarrollan bajo condiciones de relativa baja humedad después de la cosecha, durante el transporte, el secado lento, el almacenamiento y procesamiento de los granos.

3. Hongos de deterioro avanzado. Requieren alto contenido de humedad para su desarrollo, se encuentran en la naturaleza y colonizan la materia orgánica en proceso de descomposición.

La principal diferencia entre estos tres grupos son los requerimientos de agua para crecer, los hongos de campo necesitan humedades relativas de 90 a 100% equivalente a humedad del grano de 22 al 23% o más, normalmente no continúan desarrollándose en el almacén por la falta de humedad, sin embargo, el daño después de la cosecha ya ha sido realizado. En cambio los hongos de almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90% y temperatura de 25 a 35°C. El factor más importante en su desarrollo es la humedad interna del grano que debe ser superior a 14%. Una diferencia de 1% puede determinar que una especie sea la predominante y la velocidad del daño del grano (Cuadro 2). En grano seco, el desarrollo de varias especies de hongos que ocurren en una secuencia biológica según el contenido de humedad del grano en donde crecen, la primera especie que atacará el grano es *A. restrictus* a 14.0 a 14.5% de humedad del grano, se irán presentando otras especies adaptadas al contenido de humedad ascendente, hasta llegar a humedades apropiadas para el ataque de bacterias (Moreno, 1988; Schneider, 1995c).

Los hongos de deterioro avanzado incluye a aquellos hongos que colonizan granos y otros productos alimenticios que han sufrido un deterioro biológico previo y proliferan en productos almacenados en altas humedades relativas superiores al 90%. Este tercer grupo de hongos invade a los granos y a productos almacenados que han estado en pésimas

Cuadro 2. Contenidos de humedad ¶ de diferentes granos y semillas en equilibrio con humedades relativas de 65 a 90% y hongos que comunmente se les encuentra bajo esas condiciones de humedad (Moreno, 1988).

Humedad Relativa (%)	Avena, arroz, cebada, centeno, maíz, sorgo, trigo y triticale	Soya	Cártamo, Cacahuete y Girasol	HONGOS
65 a 70	13.0 a 14.0	12.0 a 13.0	5.0 a 6.0	<i>Aspergillus halophilicus</i>
70 a 75	14.0 a 15.0	13.0 a 14.0	6.0 a 7.0	<i>A. restrictus</i> , <i>A. glaucus</i>
75 a 80	14.5 a 16.0	14.0 a 15.0	7.0 a 8.0	<i>A. candidus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. halophilicus</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. glaucus</i>
80 a 85	16.0 a 18.0	15.0 a 17.0	8.0 a 10.0	<i>A. flavus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. halophilicus</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>Penicillium</i>
85 a 90	18.0 a 20.0	17.0 a 19.0	10.0 a 12.0	<i>Penicillium</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. candidus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. halophilicus</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. glaucus</i>

¶ Porcentaje de humedad con base a peso húmedo. Las cifras son aproximaciones, en la práctica se pueden esperar variaciones $\pm 1.0\%$.

Fuente: Christensen y Sauer (1982).

condiciones de almacenamiento, las cuales se pueden iniciar en el campo como por ejemplo, cuando se dejan las mazorcas de maíz en las plantas en el campo o en el caso del almacenamiento de grano forrajero a la intemperie.

Los hongos de deterioro avanzado prácticamente destruyen a los granos y productos que invaden, debido a su alta capacidad de degradar la materia orgánica y además algunos de ellos tienen la capacidad de producir micotoxinas.

Los daños que causan los hongos de campo a los granos dependen en gran medida de la severidad del ataque y del hongo de que se trate. Si el ataque es muy severo puede prácticamente destruir el grano como frecuentemente sucede con las pudriciones de las mazorcas del maíz por especies de *Fusarium*; si el ataque no es severo el hongo permanece en la semilla sin afectarla aparentemente, y ésta es la forma en que muchos hongos son transmitidos por la semilla de un ciclo agrícola a otro. Para combatir a estos hongos acarreados en las semillas se utiliza el tratamiento de las semillas con diversos fungicidas.

Algunos hongos de campo ponen en peligro la salud de los animales domésticos y la del hombre, debido a que ciertas especies producen micotoxinas y se les ha denominado micotoxicosis, a las intoxicaciones que causan cuando se les ingieren. Entre estos hongos se encuentran algunas especies de *Fusarium*, hongo que desafortunadamente es muy común en los cultivos agrícolas y en particular en los cereales, este hongo es uno de los tres más importantes productores de micotoxinas (Moreno, 1998; Schneider, 1995d)

El combate de los hongos de campo está muy ligado al buen manejo de los cultivos durante su desarrollo, lo cual implica el empleo de variedades resistentes a enfermedades y a plagas, el uso adecuado de fertilizantes y fungicidas, la oportunidad de los riegos y todas aquellas prácticas agrícolas que permitan el desarrollo de plantas sanas y vigorosas y por último una cosecha a tiempo y un manejo de postcosecha adecuado.

Los hongos de almacén, especies de *Aspergillus* y *Penicillium* no dañan el grano antes de la cosecha, con excepción de *Aspergillus flavus*, cuando el maíz es atacado por gusanos de la mazorca, pueden encontrarse en toda clase de granos y sus derivados. La presencia de materiales extraños, granos dañados o quebrados, otras especies de granos, malezas, partículas de suelo e insectos vivos o muertos, pueden propiciar el desarrollo rápido de estos hongos. Causan diversos daños a los granos y semillas almacenadas, entre los más sobresalientes son la reducción del poder germinativo de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas (Moreno, 1988, 1996; Schneider, 1995c; 1995d).

Actualmente, el combate de estos hongos se logra secando los granos a niveles de humedad relativa desfavorables para su desarrollo (inferior a 75%). Otra manera es almacenar los granos a bajas temperaturas o en ausencia de oxígeno.

Los microorganismos que invaden a los granos y sus derivados, requieren contenidos de humedad mínimos para su desarrollo y esos requerimientos son iguales en productos con alto contenido de almidón, el caso de los cereales, o con alto contenido de aceite, como cacahuete y soya.

Al identificar el tipo de hongo, podemos decir si el grano puede ser potencialmente tóxico, o si las condiciones durante el almacenamiento no fueron apropiadas. También es posible predecir como se podrá almacenar el grano en el futuro, si se conoce además el contenido de humedad (Schneider, 1995c).

II.4.4. Género *Aspergillus* (Ellis, 1994; Frey, 1985; Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991).

Este género ha sido dividido en 18 grupos, con 132 especies. Entre los hongos que invaden granos almacenados, *A. glaucus*, *A. restrictus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. fumigatus* y *A. clavatus*, son grupos importantes en el deterioro de los granos y semillas, afectan su calidad física, biológica, nutricional y sanitaria (Moreno, 1991). Cada grupo está integrado por especies con características morfológicas o fisiológicas similares y su clasificación en especies individuales se basa principalmente en características morfológicas específicas (forma, estructura, tamaño y color) y fisiológicas (reproducción y crecimiento). La identificación general se basa en las características generales del grupo: color, apariencia de la colonia, características morfológicas y el color de las cabezuelas conidiales. La presencia de hongos de este género es indicativa de una mala conservación de los granos, pero no es determinante para concluir que las micotoxinas están presentes en el producto del cual fueron aislados. En el caso de las aflatoxinas se confirma su presencia por análisis químico y bioensayo. Las aflatoxinas son producidas por dos especies importantes *Aspergillus flavus* Link y *A. parasiticus* Speare; ambas especies pertenecen al grupo *Aspergillus flavus*, en las que algunas cepas son productoras de aflatoxinas. Colonizan diversos productos como cacahuete, maíz, arroz, copra y semilla de algodón.

El género *Aspergillus* se caracteriza por no requerir agua libre para su desarrollo, ya que algunas especies pueden hacerlo en productos con una actividad acuosa muy baja (0.70), por lo que se les considera xerófitas (Moreno y Gil, 1991).

II.4.4.1. *Aspergillus flavus* Link ex. Grey.

El *Aspergillus flavus* tiene una amplia distribución, generalmente se encuentra como saprófito de la tierra y en muchos tipos de materia orgánica en descomposición. Este grupo tiene once especies cuyas características morfológicas son las siguientes: cabezuelas globosas o columnares, de colores verde-amarillento pálido, verde-amarillo fuerte o café oliva. Fiálides uniseriadas o biseriadas y frecuentemente con ambas características en la misma cepa o aun en la misma cabezuela. Las especies de este grupo no presentan estado sexual; es común la presencia de esclerocios de color café-rojizo, café-púrpura o negros cuando están maduros. La forma de los esclerocios es globosa, subglobosa o verticalmente elongada (Ellis, 1994).

Por simple observación de una colonia y basándose principalmente en el color, se puede llegar a concluir que una especie pertenece al grupo *A. flavus*, pero para identificar la especie, es necesario hacer observaciones al microscopio, lo que permite definir de que especie se trata. De las once especies del grupo *Aspergillus flavus*, solamente aquellas cepas o aislamientos que muestran las características descritas por Link, podrán ser consideradas como *A. flavus* Link; igualmente para la especie descrita por Speare, *A. parasiticus* (Moreno y Gil, 1991).

II.4.4.1.1. Identificación.

Características macroscópicas: sus colonias son de crecimiento rápido y se extiende ampliamente con aspecto algodonoso, su color varía de verde-amarillento a verde oscuro. En agar Czapeck las colonias son granulares, planas y a menudo con surcos radiales, amarillas al principio que cambian a grises-verdosas con el tiempo.

Características microscópicas: las conidiosporas son incoloras, rugosas de pared gruesa y miden más de 1 µm de largo por 10 a 20 micras de ancho. La expansión terminal produce una vesícula globosa de 10 a 60 micras de diámetro, esta estructura lleva los esterigmás en toda su superficie y se colocan en una fila simple o doble. Las microconidias son piriformes o globulares, de pared rugosa, incoloras o de tono amarillo a verde con un diámetro promedio de 3 a 4 micras.

Datos claves: el hifomiceto presenta cabezas conidiales con esterigmás que nacen directamente de la vesícula como capa simple o doble como palizada, las microconidias son hialinas y rugosas. Cabezas conidiales de color amarillo pálido a intenso o verde-

amarillo. Esterigmás de dos series, cabezuelas radiadas o columnares, las columnas no compactas (Figura 1).

Las especies de *A. flavus* Link no son xerófitas, por lo que crece bien en el medio de Czapek al 3 % de sucrosa y en malta-sal-agar al 6%, así como en papa-dextrosa-agar normal.

El ciclo biológico de las especies de *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare corresponden al de los hongos imperfectos o sin estado sexual conocido, en el cual las esporas germinan y producen micelio que origina los conidióforos, que en su parte apical presentan una vesícula con las fialides, en una o dos series, que producen las cadenas de esporas. Las vesículas, las fialides y las esporas conforman lo que se conoce como cabezuelas, cuyo color está dado por el inmenso número de esporas que de ellas nacen y a su vez las cabezuelas dan el color a la colonia.

Las especies de *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare presentan cabezuelas globosas o radiadas, las de *A. flavus* Link son de color verde-amarillento brillante y los esterigmás en dos series; por otra parte, *A. parasiticus* Speare es de color verde amarillo oscuro y con esterigmás en una serie. Las colonias de *A. flavus* Link tienen una superficie irregular y con hifas aéreas, en cambio las de *A. parasiticus* Speare tienen una superficie compacta y afelpada.

Las esporas son producidas en gran número, ya que el hongo ha aprendido que muchas esporas no son viables y que otras caen en lugares inhóspitos donde no pueden establecerse o germinar. El viento es el principal vehículo de las esporas y su distribución es cosmopolita.

Las esporas para germinar requieren una humedad relativa mínima de 83% y para establecerse, el hongo requiere de una humedad relativa mínima de 85%. Por lo tanto, los granos de cereales y oleaginosas pueden ser invadidos por especies de *Aspergillus flavus* cuando el contenido de humedad de los granos no sea menor al 16 y al 8%, respectivamente.

Algunos aislamientos o cepas de *A. flavus* Link forman esclerocios, que son estructuras de resistencia formadas por la aglomeración de hifas o que pueden permanecer viables por meses y quizá por años en el suelo (Moreno y Gil, 1991).

Las especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* son consideradas como parásitos débiles, por lo que invaden con mayor facilidad a plantas y semillas débiles. En tejidos muertos proliferan con gran velocidad, debido a que son más sapróbios que parásitos.

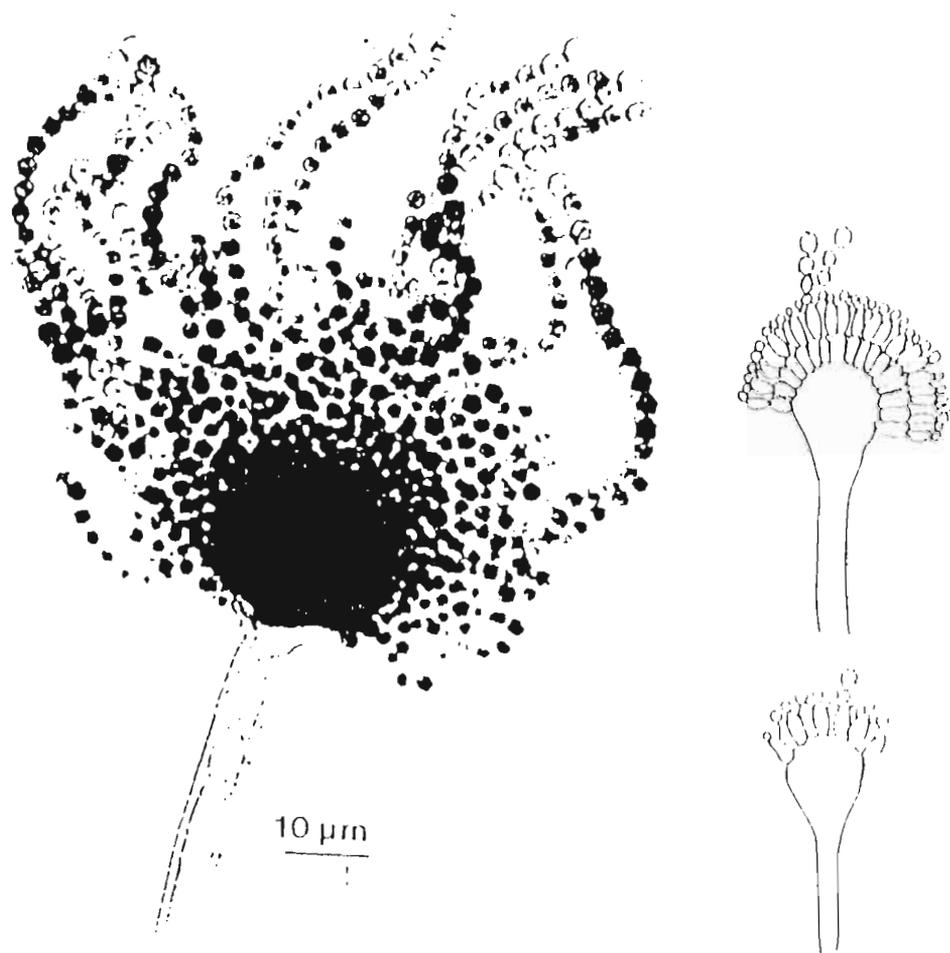


Figura 1. Cabeza conidial *Aspergillus flavus* Link ex Grey (Ellis, 1994).

11.4.5. Micotoxinas (Ellis, 1994; Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995d).

Las micotoxinas son sustancias producidas por ciertos hongos que en pequeñísimas cantidades pueden ser tóxicas a los animales que las ingieren y en algunos casos lo son por contacto con la piel como algunas toxinas de *Fusarium*.

Las micotoxinas son producidas por los hongos microscópicos que invaden los productos agrícolas y alimentos derivados de ellos, en los cuales secretan estos metabolitos tóxicos. A las intoxicaciones ocasionadas por micotoxinas se les denomina micotoxicosis. En ocasiones la invasión por el hongo pasa inadvertida, la cual solo puede ser determinada mediante el cultivo de los hongos en el laboratorio. Frecuentemente los hongos toxigénicos desaparecen de los granos y quedan solamente las micotoxinas por lo que se tiene que recurrir a técnicas químicas y biológicas para conocer su calidad sanitaria.

11.4.5.1. Tipos de micotoxinas.

Existen muchas micotoxinas producidas por especies de los hongos *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* que son los principales hongos productores de micotoxinas, sin embargo, por sus efectos las aflatoxinas han sido las más estudiadas, ya que se les reconoce como las sustancias carcinogénicas más potentes hasta ahora conocidas; las aflatoxinas además de ser carcinogénicas, son teratogénicas y mutagénicas; el órgano más afectado es el hígado por lo que se consideran hepatotóxicas. También existen evidencias de que las partículas de grano y el polvo en el aire pueden estar contaminados con aflatoxinas, las que al ser inhaladas pueden ocasionar cáncer pulmonar, esto es importante por la salud de los trabajadores que están expuestos al manejo de granos contaminados con estas toxinas (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991).

El hongo *Aspergillus flavus* secreta aflatoxinas, compuestos tóxicos químicamente relacionados que varían en su grado de toxicidad. Cuando las toxinas son ingeridas en dosis tan pequeñas que no causan una enfermedad declarada, ocasionan una reducción en el crecimiento de los animales, del vigor, de la conversión del alimento y en general una reducción en la producción animal. Además, altera la calidad sanitaria de los granos destinados al consumo humano y originan un riesgo para la salud pública (Cuadro 3).

Las evidencias actuales que se tienen sobre la importancia de los diferentes hongos toxígenos que invaden los granos son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, y

Cuadro 3. Algunas toxinas producidas por especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Moreno, 1988; Rosiles, 1996).

Género <i>Aspergillus</i>		Género <i>Penicillium</i>		Género <i>Fusarium</i>	
Hongo	Toxina	Hongo	Toxina	Hongo	Toxina
<i>A. chevalier</i> Thom. y Churh	Xantocilina	<i>P. cyclopium</i> Westling.	Acido Penicílico Ocratoxina	<i>F. avenaceum</i> Sacc.	Tricotecenos Zearalenona
<i>A. clavatus</i> Desm.	Patulina	<i>P. expansum</i> Link ex Gray	Patulina Citrinina	<i>F. culmorum</i> W. G. Smith. Sacc.	Tricotecenos Zearalenona
<i>A. fumigatus</i> Frasenius	Viriditoxina Gliotoxina Fumagilina	<i>P. islandicum</i> Sopp.	Islanditoxina	<i>F. equiseti</i> Corda. Sacc.	Tricotecenos Zearalenona
<i>A. niger</i> U. Tiegh.	Malformina Acido oxálico	<i>P. purpurogenum</i> Stoll.	Rubratoxinas Ac. Glaucánico	<i>F. graminearum</i> Shwabe.	Zearalenona Tricotecenos
<i>A. ochraceus</i> Wilhelm Sacc.	Ocratoxinas Acido penicílico	<i>P. viridicatum</i> Westling.	Ocratoxinas Viridicatina Citrinina	<i>F. moliniforme</i> Sheld.	Moliniformina Zearalenona Fusarina
<i>A. versicolor</i> Vuill. Tirab.	Esterigmatocistina	<i>P. citrinum</i> Thom.	Citrina	<i>F. oxysporum</i> Shcl.	Zearalenona Moniliformina
<i>A. parasiticus</i> Speare	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1	<i>P. citreoviride</i> Biourse	Citreoviridina	<i>F. nivale</i> Ces. Rabenh	Butenolida
<i>A. flavus</i> Link	Aflatoxinas B1,B2, G1, G2	<i>P. terrestre</i> Jensen	Ac. Terréstrico	<i>F. tricinctum</i> Corda. Sacc.	T -2

corresponden al 58% de 943 cepas de hongos con probada toxicidad. También, algunas especies de los géneros *Stachybotrys*, *Pithomyces* y *Rhizoctonia* causan micotoxicosis.

Dentro de una determinada especie de hongo, diferentes cepas difieren en su capacidad toxigénica, esto dificulta la detección de materiales sospechosos de contener toxinas ya que la ausencia de hongo no elimina la posibilidad de que el producto contenga micotoxinas (Moreno 1988).

11.4.5.2. Condiciones que favorecen el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas (Moreno 1988; Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996).

Los principales factores para el desarrollo de hongos son: humedad en el substrato, temperatura adecuada, oxígeno y tiempo, que no son las mismas que se requieren para la producción de toxinas, productos del metabolismo secundario de los hongos. La temperatura es el factor más importante en la inducción de la producción de micotoxinas, seguido del substrato, por ejemplo, *Fusarium roseum* requiere de 20 a 25°C para un crecimiento vegetativo vigoroso y para la producción de la toxina zearalenona requiere una temperatura de 14°C, de igual manera para el desarrollo óptimo de *Aspergillus flavus* se requiere temperatura de 36 a 38°C. Sin embargo, para la producción de aflatoxinas requiere temperatura de 25 a 35 °C (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996).

Además de las condiciones que normalmente son consideradas favorables para el desarrollo de los hongos y probablemente para la producción de toxinas, se ha observado que otros factores coadyuvan a la producción de toxinas dependiendo del hongo en cuestión. Tales factores son: baja temperatura, condiciones climáticas anormales durante la formación de los granos, infestación por insectos en el campo, daño físico en los granos y por último y no menos importante, el descuido del hombre en la cosecha, transporte, manejo y conservación de los productos agrícolas (Moreno, 1988; Schneider, 1995d).

11.4.5.3. Aflatoxinas (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Moreno, 1995; Rosiles, 1996).

Las aflatoxinas, son un problema grave de sanidad pública y animal. La producción de aflatoxinas en maíz se puede dar en dos ambientes: en el campo, cuando los granos están en formación, o bien en la etapa de postproducción. En el campo, la producción de

aflatoxinas está relacionado con la condición de las plantas de maíz en cuanto a su vigor, lo cual está directamente conectado con el estrés de agua y la presencia de altas temperaturas diurnas y nocturnas, durante la formación del grano. Plantas de maíz bajo esas condiciones son altamente vulnerables a la invasión por las cepas toxigénicas de *A. flavus* (Moreno, 1995).

Esas condiciones ambientales, la sequía, la presencia de insectos que atacan las mazorcas y las altas temperaturas, son los factores más importantes en la contaminación del maíz con aflatoxinas en el campo, al debilitar a la planta y con ello favorecer el establecimiento del hongo y la actividad metabólica del mismo, que conlleva a la producción de estos metabolitos (Moreno y Gil, 1991).

Después de la cosecha, en el transporte o almacenamiento, para que las aflatoxinas se produzcan se requiere que el grano de maíz tenga un contenido de humedad superior al 16.5%. La condición física del grano y las condiciones de manejo y almacenamiento del grano, son factores importantes para la producción de aflatoxinas, tanto en el campo como en el almacén. Parece ser que las altas temperaturas nocturnas están relacionadas con cierto daño físico que ocurre en los granos, facilitando la entrada de los hongos productores de estas toxinas (Moreno, 1995).

La producción de aflatoxinas depende de varios factores principalmente: la cepa del hongo productor, el substrato, el contenido de humedad del substrato y la humedad del ambiente, la temperatura, la microflora asociada, el oxígeno en la atmósfera de almacenamiento y el periodo de almacenamiento. La sola presencia del hongo en un determinado producto, aún de una cepa productora de aflatoxinas, no significa que las aflatoxinas estén presentes o que se vayan a producir, ya que para su producción se requiere que los diferentes factores mencionados coincidan bajo determinadas circunstancias y condiciones (Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995d).

Aspergillus flavus Link produce principalmente aflatoxinas B₁ y B₂ mientras que *A. parasiticus* Speare produce B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁. Son un grupo de metabolitos secundarios producidos por estos hongos, la aflatoxina B₁ es la que se encuentra en mayores concentraciones, es la más potente, carcinógena, teratógena y mutágena. Se ha señalado que *A. flavus* Link tiene mayor actividad proteolítica y *A. parasiticus* Speare lipolítica. Aparentemente la especie más común en maíz es *A. flavus* y en cacahuete es *A. parasiticus*. No todos los aislamientos o cepas de *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare producen aflatoxinas, aún bajo condiciones óptimas en el laboratorio, por lo que la mera presencia de estos hongos, aún en grandes cantidades, en un producto sospechoso de estar contaminado con aflatoxinas, no significa que las aflatoxinas están presentes en la muestra del producto. Por otra parte, el no encontrar el hongo tampoco indica que no

existan aflatoxinas, el hongo pudo haber producido las aflatoxinas y después, por condiciones ambientales y por el transcurso del periodo de almacenamiento, el hongo pudo haber desaparecido (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995d).

Prácticamente en todo sustrato en que pueda crecer *A. flavus* se pueden producir aflatoxinas, los cereales son buenos sustratos. El contenido de humedad relativa mínima de los productos agrícolas (trigo, maíz, sorgo, arroz y mijo) requerido para el desarrollo de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas es de 85% que corresponde a contenidos de humedad de 16.5 a 18%, y en semillas como cacahuate y girasol o en copra de 8.5 a 10%. No hay límite superior en cuanto a contenido de humedad, ya que los hongos pueden producir aflatoxinas en medio líquido, sin embargo en la naturaleza su comportamiento tiende a ser xerofítico en la producción de aflatoxinas (Moreno 1988; Moreno y Gil, 1991).

La temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es de 12°C, la óptima de 25 a 35°C, y la máxima de 40 a 42°C. *A. flavus* crece lentamente a temperatura de 8°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C, pero en ambos casos no produce aflatoxinas. En condiciones óptimas, la producción de aflatoxinas puede ser alta a los 24°C y el máximo se alcanza de 7 a 10 días de cultivo. Aparentemente la producción de aflatoxinas no ocurre a temperaturas menores de 10 ni mayores de 45°C y la producción de las diferentes aflatoxinas varía con la temperatura, a temperaturas más elevadas predomina la B₁. Las aflatoxinas resisten las temperaturas utilizadas en la elaboración de alimentos (Moreno, 1988; Moreno y Gil, 1991; Moreno, 1995; Rosiles, 1996).

Cualquier sustrato que permita el desarrollo de las dos especies productoras de aflatoxinas, servirá como sustrato para la producción de éstas, pero por otras condiciones ambientales y respuestas fisiológicas de los hongos, la producción de aflatoxinas puede ser mayor o menor dependiendo del sustrato. En el maíz, cacahuate, copra o semilla de algodón, se producen aflatoxinas en forma natural en cantidades que los convierten en productos de alto riesgo para la salud humana y animal; por otra parte, hay sustratos como la soya que no favorecen la producción de aflatoxinas. De los cereales, el maíz y el sorgo son los de más riesgo de estar contaminados, además del cacahuate y diferentes tipo de nueces. Entre los productos en los que se ha encontrado aflatoxinas están: maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada, mijo, avena, pastas de cacahuate, de soya, de algodón, de copra, y girasol, harina de pescado, papas, en aceites vegetales de olivo y de coco, en higos, chicharos, avena y casava (Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996).

También se ha determinado presencia de aflatoxinas en maíz ensilado en silos aéreos y de tipo trinchera. Las toxinas se localizaron en la parte superior hasta 80 cm de profundidad y en la parte inferior hasta 40 o 50 cm de altura y además se detectó en el

cuerpo del ensilado en lugares conocidos como “manchas calientes”. Se ha demostrado que granos y cereales dañados requieren de menos humedad para propiciar el crecimiento micótico que en el caso de los mismos en buenas condiciones (Rosiles, 1996).

Algunas cepas de hongos se han vuelto más agresivas en el campo y se ha observado que aislamientos o cepas de las dos especies productoras de aflatoxinas difieren en la cantidad de aflatoxinas producidas y en el tipo de aflatoxina, lo cual señala que existen diferencias genéticas y fisiológicas entre estos hongos, por lo que es necesario conocer más de la genética y fisiología del hongo y de la planta, así como de la interacción del ambiente físico y biótico en la producción de las aflatoxinas (Moreno y Gil, 1991).

Las cepas productoras de aflatoxinas son malas competidoras con otros hongos que crecen bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura y esa competencia evita la producción de aflatoxinas.

Las especies de *Aspergillus* son aerobias, por lo que requieren oxígeno para su desarrollo. A niveles de 1% de oxígeno en la atmósfera de almacenamiento se detiene el desarrollo de los hongos y el riesgo de la producción de aflatoxinas, lo que se logra con el uso de atmósferas controladas y almacenamiento hermético.

En cuanto al tiempo que se requiere para la producción de aflatoxinas, pueden ser una cuantas horas a varios días, siempre y cuando se conjunten los factores adecuados de humedad, temperatura y ausencia de microflora competitiva (Moreno y Gil, 1991; Rosiles, 1996).

En el Cuadro 4 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas de las aflatoxinas y en la figura 2 las estructuras moleculares de las mismas (Moreno y Gil, 1991).

Muchas investigaciones se han realizado sobre el efecto de las aflatoxinas en los animales domésticos, entre los que se incluyen: mortalidad, baja ganancia de peso, desarrollo lento, problemas en la reproducción, diarrea, desórdenes respiratorios, hemorragias, reducción en la producción de leche y huevos, incremento en la susceptibilidad a las infecciones por bacterias y virus y otros agentes causales de enfermedades.

Además del daño al hígado, las aflatoxinas afectan la absorción y metabolismo de los lípidos, de las vitaminas y los minerales. Son peligrosas por ser acumulativas y pasan del tracto digestivo a la leche y a los tejidos de los animales que las consumen, con el consiguiente riesgo de llegar a la alimentación humana (Moreno y Gil, 1991; Schneider, 1995d; Rosiles, 1996).

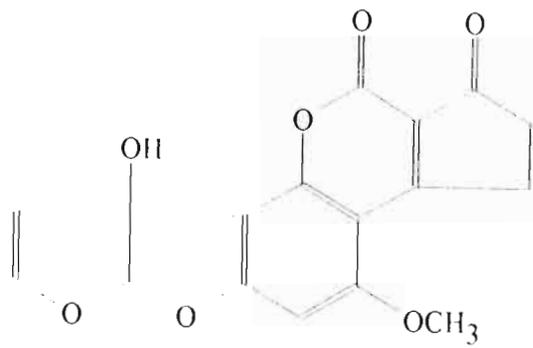
Las aflatoxinas pueden considerarse como inhibidores biosintéticos en el hígado y pueden causar una inhibición total; reducidas dosis lo hacen progresivamente al afectar

Cuadro 4. Principales propiedades fisicoquímicas de las Aflatoxinas (Moreno y Gil, 1991).

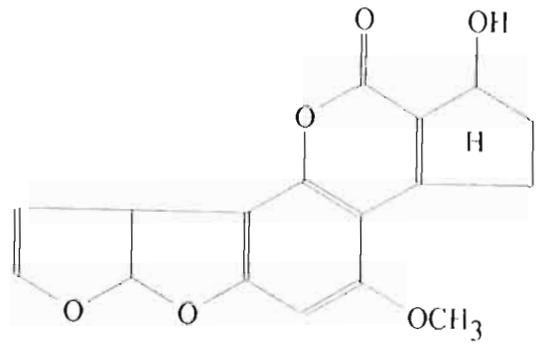
Características	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2	Aflatoxina M1	Aflatoxicol
Fórmula Química	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₆ O ₆
Peso Molecular	312	314	328	330	330	314
Punto de fusión °C	268-269 (d)	287-289 (d)	244-249 (d)	230	290 (d)	230-234
Absorción UV	223(25,600)	220(20,500)	243(11,500)	217(28,000)	226(23,100)	
En etanol nm (E)	285(23,400) 362(21,800)	265(12,700) 263(24,000)	257(9,900) 264(10,000)	245(12,900) 365(19,300)	265(11,600)	
Fluorescencia	425 nm	425 nm	450 nm	425 nm	425 nm	425

(d) = Desaparición

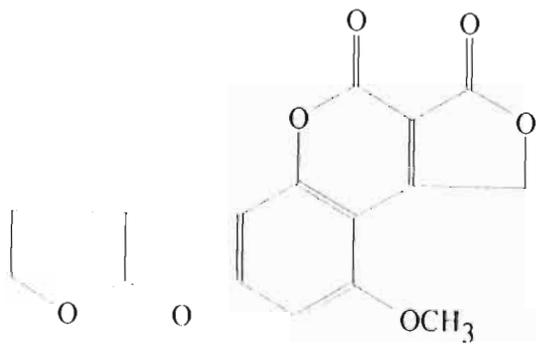
(E) = Extinción nm.



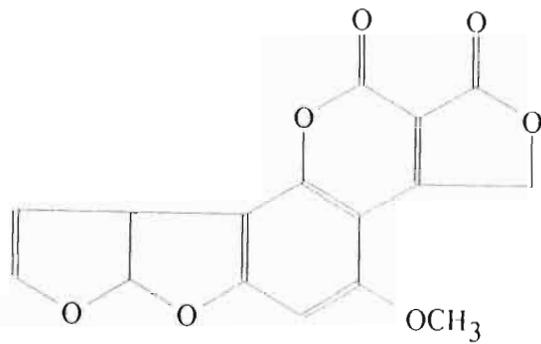
AFLATOXINA M₁



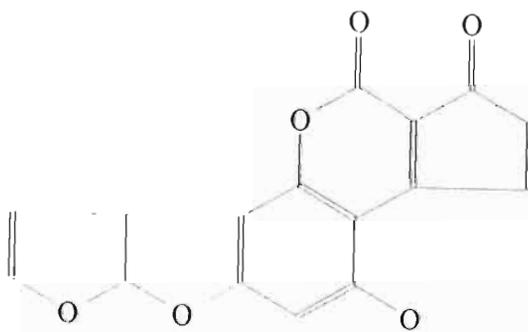
AFLATOXICOL



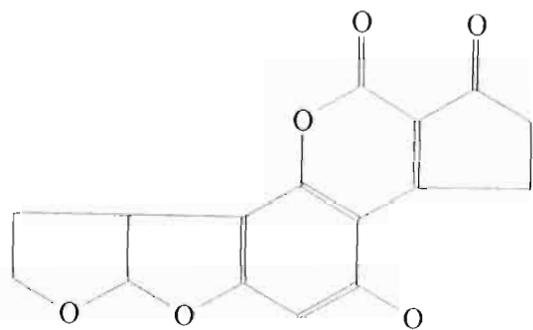
AFLATOXINA G₂



AFLATOXINA G₁



AFLATOXINA B₁



AFLATOXINA B₂

Figura 2. Estructura molecular de las aflatoxinas.

diferentes sistemas biosintéticos. Se pueden mencionar las etapas sucesivas en la actividad biológica de las aflatoxinas sobre los hepatocitos, y cada etapa es una consecuencia de la etapa previa: interacción con DNA e inhibición de las polimerasas responsables para la síntesis de DNA y RNA, supresión de la síntesis de DNA, reducción de la síntesis de RNA y la inhibición de RNA mensajero y reducción de la biosíntesis de proteínas. A nivel celular la aflatoxina B₁ sufre conversión a aflatoxina M₁ y esta se localiza fuera de la célula por lo que puede encontrarse en fluidos biológicos como suero, leche, etc. (Ramírez, 1995; Rosiles, 1996).

El control de aflatoxinas en el mundo se ha impuesto por medio de regulaciones sanitarias en torno al contenido de ellas en alimentos destinados a consumo humano y animal; algunos países consideran todos los alimentos y todas las aflatoxinas, en cambio otros, un alimento y la aflatoxina B₁ que es la más tóxica, por ejemplo: en Estados Unidos el nivel máximo permitido de aflatoxinas en leche es de 0.5 ppb, en Japón todos los alimentos se regulan y se acepta un límite máximo de 10 ppb de aflatoxina B₁. En México se regulan todos los alimentos y un límite máximo de 20 ppb para aflatoxinas totales (Ramírez, 1995).

Para la alimentación humana, la de animales jóvenes, la de ganado lechero, así como de grano de uso no determinado, el maíz no debe contener más de 20 microgramos por kilogramo; para la alimentación de reproductores de ganado bovino y porcino o de aves adultas, no debe contener más de 100 microgramos por kilogramo; para cerdos en la etapa final de engorda (más de 45 kilos) no debe contener más de 200 microgramos por kilogramo y no más de 300 microgramos por kilogramo para ganado bovino en su etapa final de engorda.

Por otra parte, la mezcla de grano contaminado con grano no contaminado se permitió solo para maíz no destinado a consumo humano. Actualmente no se permiten mezclas y el grano que excede de los 300 microgramos de aflatoxinas se debe destruir.

La tendencia de los países desarrollados es de disminuir el límite máximo permitido de aflatoxinas, en la alimentación humana (Moreno y Gil, 1991).

Se han realizado en México y diversos países de Latinoamérica una variedad de trabajos sobre micotoxinas y micotoxicosis para establecer su incidencia, cuantificación y su repercusión en la salud tanto humana como animal, además de formas de control de micotoxinas por medios adsorbentes como aluminosilicatos y sustancias como aminoácidos, urea y amonio (Carvajal, 1994).

En cuanto a destoxificación aún no se ha llegado a un desarrollo tecnológico aplicable, la nixtamalización, en el caso del maíz reduce el nivel de contaminación original

en el grano, pero no la elimina. Las aflatoxinas pueden reactivarse al acidificarse (Moreno y Gil, 1991).

Algunos hongos tiene la capacidad de remover la toxina de un sistema de prueba cuyo modo de acción no ha sido bien esclarecido, pero en las fermentaciones producidas por *Aspergillus niger* originaban condiciones ácidas y las aflatoxinas se convirtieron en productos hidroxidihidros (Rosiles, 1996).

Por lo que se ha señalado sobre las condiciones que favorecen el desarrollo de los hongos de poscosecha, y dada la importancia de los hongos toxigénicos, la manera más obvia de combatirlos es mantener los granos y semillas en los almacenes bajo condiciones que no favorezcan su proliferación; es decir, mantenerlos con baja humedad del ambiente y del grano, baja temperatura de almacenamiento, o combinaciones de ambos factores; el uso de inhibidores químicos para granos destinados a la alimentación animal; o bien con el uso de fungicidas cuando se trata de maíz para semilla.

Para aminorar la producción de aflatoxinas en el campo, se debe tener como meta el que las plantas de maíz no entren en estrés por falta de agua, y sembrar híbridos o variedades que sean más resistentes a esas condiciones de estrés (Moreno, 1995).

II.4.5.3.1 Métodos de análisis de aflatoxinas.

En la actualidad, los métodos para análisis de las aflatoxinas varían en cuanto al objetivo para el cual fueron desarrollados. Los hay desde aquellos que señalan la posibilidad de la presencia de aflatoxinas, hasta los que las cuantifican con precisión.

El análisis de las aflatoxinas en productos agrícolas actualmente se lleva a cabo por tres tipos de pruebas.

Prueba presuntiva, puede realizarse en el campo y esta basada en la propiedad de ciertas partículas que bajo la luz negra o luz ultravioleta de onda larga, 365 nm, presentan una fluorescencia amarillo-verdosa brillante, que esta asociada a la presencia de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* y se debe a la reacción de ácido kójico, producido por el hongo y una peroxidasa del grano. Esta prueba funciona en grano de maíz vivo, pero las aflatoxinas se producen en granos vivos y muertos.

Pruebas rápidas de escrutinio, estas pruebas sirven para definir la ausencia o presencia de las aflatoxinas por métodos de minicolumnas, el método de Romer y el método de Holaday-Velasco.

Pruebas por métodos analíticos, son los más adecuados para determinar en forma más precisa el nivel de contaminación. Entre estos se encuentra la cromatografía de capa

fina bajo luz ultravioleta de 365 nm, con lo que presentan fluorescencia azul (B) o verde (G) los subíndices se refieren a su posición relativa en las placas de cromatografía. Este método se consideraba semicuantitativo pero con el uso de densitómetros se ha mejorado la precisión de esta técnica.

Existen diversos sistemas analíticos con cromatografía líquida de alta resolución pero hay que considerar que la aflatoxina B₁ sufre alteraciones durante su análisis con algunos de estos métodos y se han desarrollado varios métodos para convertir la aflatoxina B₁ en otros compuestos.

Los métodos serológicos se han desarrollado como métodos rápidos, relativamente económicos y algunos pueden ser cuantitativos como el Aflatest, EZ-Screen y las minicolumnas, de estos, el método Aflatest permite realizar la cuantificación por medio de un fluorómetro digital (Moreno y Gil, 1991).

La confiabilidad de los resultados depende en gran parte de un buen muestreo, porque las aflatoxinas tienen una distribución altamente heterogénea en los productos; unos cuantos granos de cacahuete o maíz pueden contener aflatoxinas que pone fuera de norma un lote por lo que es de esperarse una gran variación entre muestras y entre lotes. Los productos molidos o líquidos presentan una distribución más homogénea de las aflatoxinas (Moreno y Gil, 1991).

II.4.6. Implicaciones generales de los hongos en granos y sus derivados.

Cuando en una muestra de granos se aíslan solamente hongos de campo, significa que es recién cosechado o que el grano ha sido bien conservado. Los hongos de campo tienden a desaparecer en largos períodos de almacenamiento pero no así las micotoxinas.

En el caso de los hongos de almacén presentes en una muestra de grano, señala las condiciones de humedad a las que se almacenó el grano analizado y por la diversidad y abundancia de estos hongos se puede inferir el cuidado que se ha tenido después de la cosecha. Al hacer muestreos periódicos, la micoflora nos indica si tendremos problemas de conservación en un futuro cercano y podremos tomar medidas adecuadas para evitarlos; el análisis micológico también nos puede indicar si se trata de una mezcla de lotes de diferente calidad. Si se aíslan hongos del tercer grupo indican que esos granos han sido almacenados con alto contenido de humedad y que otros hongos han antecedido a la sucesión microbiana, entre ellos se encuentran *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* y *A. clavatus*, indicadores de mala calidad de los granos (Moreno, 1988).

La investigación de la micoflora presente en granos de sorgo, nos permite conocer la posible relación entre el grano infectado y la presencia de micotoxinas y establecer la probabilidad de que las micotoxinas sean las responsables de abortos en cerdos. En el análisis químico, la presencia de aflatoxinas y zearalenona fueron descartadas al hacer las pruebas confirmatorias para estas micotoxinas en granos de sorgo contaminados. Los mohos predominantes fueron *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y varias especies de *Aspergillus*. *A. alternata* ha sido asociada con grano dañado, manchado y en muy malas condiciones debido al exceso de lluvia durante la cosecha o en épocas muy cercanas a la misma o porque ha sido mal manejado y también por la presencia de micotoxinas. Lo anterior sugiere que en estudios químicos preliminares, la zearalenona y las aflatoxinas en sorgo pudieron ser confundidas con alternariol, ácido alternárico, metil éster del alternariol, etc. Por lo anterior, conocer la micobiotica presente en el grano de sorgo resulta muy útil tanto para detectar posibles problemás sanitarios de contaminación con micotoxinas y con implicaciones de biodeterioro (García y Martínez, 1993).

Debido a que el sorgo en México se usa principalmente en la producción de alimentos balanceados, es importante conocer además de las micotoxinas contaminantes, la micobiótica presente y las implicaciones que estos mohos pudiesen tener en la industria de los alimentos balanceados.

En cuarenta y cuatro muestras de sorgo dulce que fueron analizadas para determinar aflatoxinas y zearalenona, la micobiótica presente y el porcentaje de germinación, fueron encontradas 19 y 20 muestras contaminadas con zearalenona y aflatoxinas respectivamente; sin embargo, después de las pruebas confirmatorias, solo 7 y 0 de estas muestras, fueron confirmatorias con las toxinas correspondientes. Los mohos predomianates fueron *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, y varias especies de *Aspergillus* (García y Martínez, 1991).

En la determinación de la incidencia de hongos que colonizan semillas de plantas arvenses en un campo agrícola, donde éstos pueden causar la muerte o debilitamiento de semillas o plántulas, sin embargo, también pueden provocar efectos benéficos en las semillas protegiéndolas contra sus consumidores o bien escarificándolas y con ello favorecer su germinación. Se aislaron 21 géneros de hongos donde la mayoría de las infecciones son causadas por *Alternaria alternata* y *Fusarium sp.* Esto indica una baja diversidad de colonizadores. La susceptibilidad a hongos de las semillas es variable y no se encontró correlación entre el grado de infección y la germinación por lo que puede existir un mutualismo entre algunas especies de *Alternaria* o *Fusarium* y las semillas de plantas arvenses como el descrito entre *Alternaria* y trigo (Espinosa y Vázquez, 1994).

II.5. Control de Plagas en Granos Almacenados (Sifuentes, 1977; SARH, 1980; CICOPLAFEST, 1994).

Entre los factores que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas están las enfermedades y las plagas, las cuales pueden atacar los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento, hasta la cosecha y aún en el almacenamiento. Por lo que el principal factor que limita la disponibilidad mundial de alimentos lo constituye las pérdidas de granos durante su almacenamiento. Se estima que se pierde entre 5 y 10% de todos los granos alimenticios cosechados a causa de insectos, ácaros, roedores y hongos, y es más severo en los países en vías de desarrollo (González, 1995). Existen varias opciones para la protección de los granos almacenados, desde medidas preventivas de bajo costo como la regulación de humedad, hasta la utilización de variedades de granos resistentes a los hongos, el uso de productos químicos o de microorganismos antagónicos (Montes y Figueroa, 1995).

II.5.1. Medidas de combate indirecto.

Son una serie de medidas que implican desde buenas prácticas agrícolas, el uso de semillas resistentes y condiciones higiénicas apropiadas para el almacenamiento (Schneider, 1995d).

II.5.1.1. Prácticas culturales, secado del grano.

El secado del grano, la preparación, así como la limpieza y selección del mismo es muy importante para el éxito de cualquier método de almacenamiento. Si el grano humedo se almacena sin que el aire pase a través de éste, se calentará, respirará más rápido y producirá más calor y humedad; por lo que el grano caliente se deteriorará más rápido. Si el grano está humedo el calor aumenta más rápido, los hongos se desarrollan velozmente y el grano puede germinar. Los procesos vitales ocurren en forma muy lenta cuando hay poca humedad; lo mismo ocurre con el grano. El grano bien secado no se deteriora. El secado previene del ataque de hongos y no debe utilizarse como única medida de garantía de un buen almacenamiento (Schneider, 1995b).

11.5.2. Medidas de combate directo.

Se refiere a la utilización de procedimientos químicos, físicos o mecánicos para contrarrestar plagas de almacén.

11.5.2.1. Plaguicidas (Sifuentes, 1977; SARII, 1980; CICOPLAFEST, 1994).

Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Se incluye en esta definición las sustancias defoliantes y las desecantes.

11.5.2.1.1. Generalidades (CICOPLAFEST, 1994).

Los plaguicidas permiten controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos y del ganado, así como reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos. También contribuyen al control de vectores de diversas enfermedades.

Actualmente se calcula que alrededor del 65% del consumo nacional de plaguicidas se aplica en los cultivos de maíz, sorgo, soya, caña de azúcar, arroz, hortalizas y pastos.

No obstante la importancia económica de estos productos, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños al ambiente; por ejemplo, el deterioro de la flora y la fauna silvestres, la contaminación de suelos, mantos freáticos y aguas continentales y costeras también puede ocasionar la generación de plagas resistentes, por sus características de bioacumulación y de movilidad a través de las redes tróficas, algunos de ellos pueden llegar al hombre y causar efectos adversos para la salud.

El uso y manejo incorrectos de los plaguicidas son peligrosos para el hombre, lo cual se puede manifestar por intoxicaciones de grado diverso y por efectos nocivos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, mutagénesis y otros.

II.5.3. Manejo integrado de plagas (Sifuentes, 1977; SARII, 1980; CICOPLAFEST, 1994).

Nuestro país debe impulsar aún más el sistema de control conocido como manejo integrado de plagas, el cual consiste en el empleo de dos o más de los siguientes métodos seleccionados de acuerdo con la plaga que se intenta controlar; ninguna de estas medidas se considera la mejor, mas bien son complementarias y aplicables en determinadas circunstancias, por lo que no deben descartarse otras opciones que demuestren su viabilidad práctica y económica.

II.5.3.1. Control genético.

Se refiere al uso de variedades de plantas y razas animales resistentes o tolerantes a las plagas, como el uso de semillas mejoradas que permiten obtener mayor volumen de cosechas, debido a su resistencia al ataque de las plagas en cultivo, clases o variedades de maíz que produzcan granos más resistentes (con menor contenido de almidón lo que les hace ser más duros) al ataque de insectos y hongos.

La utilidad de variedades enanas de trigo y arroz diseminadas durante la Revolución Verde para aumentar la productividad de granos básicos, con mejores índices de cosecha y mayor capacidad defensiva ante plagas y enfermedades, es innegable. Las razas criollas y los cultivares híbridos desarrollados por científicos agrícolas son formas más duraderas de resistencia a plagas y enfermedades. La caracterización de algunas propiedades química y físicas asociadas con la resistencia a insectos y patógenos como la presencia de polifenoles que confieren resistencia a hongos de la intemperie. Las características físicas asociadas al pericarpio y endospermo pueden utilizarse en aumentar la capacidad defensiva ante plagas del almacenamiento (Gómez, 1995).

El mejoramiento genético de la calidad de almacenamiento de los granos alimenticios y de la calidad biológica de las semillas, es una opción muy promisoría para aminorar las pérdidas postcosecha que limitan la disponibilidad de alimentos y de las semillas para los programas de producción de granos.

Una forma de aminorar los problemas de almacenamiento, relativa a la calidad de granos y semillas en el cual los hongos de almacén desempeñan un papel importante, es la de desarrollar semillas con genotipos más vigorosos, de tal manera que los hongos se verían limitados en su desarrollo, al considerar que son mas agresivos en genotipos débiles. Esta variabilidad genética existe y puede ser utilizada para generar cultivares

tolerantes a perder su vigor, su viabilidad y así resistir mejor el ataque de los hongos, bajo condiciones adversas de almacenamiento. El mejoramiento genético del maíz ofrece una alternativa para aminorar o eliminar el peligro de la contaminación de este grano con las toxinas producidas por *Aspergillus flavus*, contaminación que se origina desde el campo de cultivo. El mejoramiento del grano de maíz se realiza con miras a obtener resistencia al ataque de los insectos que dañan la mazorca y que permiten o facilitan la entrada de los hongos; igualmente se realiza para obtener una mejor cobertura de la mazorca, para generar maíces que se sequen más rápidamente y sin daño mecánico, y para la obtención de genotipos que no sean un buen sustrato para la producción de las toxinas.

Por otra parte, al considerar que los hongos y los insectos son aerobios, al privarlos de oxígeno su desarrollo se ve inhibido. Una de las características del almacenamiento hermético es la reducción del oxígeno y el incremento de dióxido de carbono debido a la respiración de los propios hongos, de las semillas y de los insectos. Hongos como *Aspergillus flavus* no proliferan bajo atmósferas carentes de oxígeno; por lo tanto, el almacenamiento hermético es una excelente alternativa para la conservación de los granos en el medio rural, en aquellas regiones donde los productores guardan parte de sus cosechas para su autoconsumo (Moreno, 1995).

II.5.3.2. Control biológico.

Puede ser natural o inducido con enemigos naturales de las plagas o insectos estériles; en estudios recientes se encontró que algunas especies del género *Pseudomonas*, obtenidas de suelos cultivables, inhiben el desarrollo de hongos de campo que pueden atacar a las plantas en cultivo; ésta es una opción para no utilizar plaguicidas (Ferrera-Cerrato, 1994).

II.5.3.3. Control legal (cuarentenas).

Las cuarentenas impiden que un problema fitosanitario salga del área en que se presenta para evitar que se extienda a otras regiones.

II.5.3.4. Control cultural.

Se refiere a buenas prácticas agrícolas como la rotación de cultivos que conserva la fertilidad del suelo, irrigación, uso de leguminosas, abonos orgánicos, destrucción de residuos de la cosecha anterior, destrucción de plantas hospederas, uso de semilla tratada, limpieza y protección de los rayos solares del sitio de almacenaje (Lindblad y Druben, 1981; Schneider, 1995a). Las plagas de los cultivos y del almacén se pueden combatir por una serie de medidas preventivas que evitan su proliferación, denominadas "Combate Indirecto" que se refiere a buenas prácticas de almacenamiento, que van desde medidas sanitarias del almacén antes y después de su utilización, la fácil ventilación para poder fumigar y almacenar el grano con bajo contenido de humedad, se aceptan como límites superiores para maíz, cebada y avena 13 % de humedad, sorgo y soya 11 %, trigo y arroz 14 % y frijol 12 % (SARH, 1980).

II.5.3.5. Control químico.

Se refiere al empleo de plaguicidas; se realiza específicamente con procedimientos químicos, físicos o mecánicos y se denomina "Combate Directo".

Se utilizan fumigantes, que son plaguicidas que ejercen su acción tóxica en forma de gas. Tienen gran poder de penetración y llegan a todos los sitios de forma más óptima que por otros métodos de aplicación de materiales químicos. Solo son efectivos en espacios cerrados, no tienen acción residual y ésta termina una vez que los gases escapan (SARH, 1980)

II.5.4. Utilización de Plaguicidas en México.

El tipo de plaguicida utilizado varía de acuerdo a la plaga que se desea controlar y si es para grano almacenado o cultivo. En México se utiliza para suelos, el bromuro de metilo, cloropicrina, dazomet, isotiocianato de metilo y 1,3 dicloropropeno, en espacios vacíos cloropicrina, para grano encostado el bromuro de metilo y fosforo de magnesio y para granel bromuro de metilo en forma general. En el caso de grano almacenado, en especial para evitar la proliferación de hongos contaminantes se utiliza ácido propiónico en cantidad de 0.1 a 0.3 l/100 kg. para conservar maíz y sorgo su aplicación depende del

contenido de humedad del grano y éste es el fumigante permitido para granos de consumo humano (DGSV, 1994a; DGSV, 1994b).

Aún cuando recientemente se le ha dado una gran publicidad e impulso al uso de sustancias químicas para combatir a los hongos en el almacén en México, su uso se ha restringido a la adición de ciertos inhibidores orgánicos a los alimentos balanceados terminados, con resultados no muy claros. Estos inhibidores principalmente son ácidos orgánicos y sus sales. Entre estos compuestos, el más efectivo ha sido el ácido propiónico y es el más usado para la preservación de granos en Inglaterra y Estados Unidos; en este último país se ha utilizado ampliamente en las granjas para preservar maíz con alto contenido de humedad para la alimentación del ganado. Por la información que existe parece que hay microorganismos tolerantes a los ácidos orgánicos, entre ellos algunas cepas de *Aspergillus flavus*. Entre los inconvenientes que presentan estos inhibidores, se pueden señalar que son corrosivos, que destruyen el poder germinativo de las semillas, que imparten olores y sabores no agradables para la alimentación humana, por lo que sólo se recomienda como alimento para el ganado y no se pueden usar para tratar semillas. La combinación de ácido propiónico con la práctica de secado con baja temperatura, tiene ventajas sobre la manera de uso convencional, y reduce costos de secado. Las semillas agrícolas normalmente son tratadas con fungicidas para protegerlas de los hongos que las dañan en el momento de la germinación en el suelo y en la emergencia, causando lo que en fitopatología se conoce como ahogamiento; así como para evitar la transmisión de enfermedades acarreadas por las semillas. A estos hongos el doctor Christensen les llamó "hongos de campo" por invadir y dañar a las semillas en el campo, ya sea en las plantas o en el suelo, y de esta manera diferenciarlos de los "hongos de almacén". El combate químico de los hongos de almacén fue investigado en los años cuarenta y cincuenta sin éxito, al señalar que los fungicidas no funcionaban por la falta de agua bajo las condiciones en que se almacenan las semillas. Investigaciones posteriores señalaron que sí es posible el combate químico de estos hongos, ya que con algunos fungicidas se tiene éxito aún bajo condiciones de baja humedad relativa de almacenamiento; también se encontró que son efectivos para prevenir la infección más que combatirla cuando ya está establecida; una mayor efectividad de estos fungicidas se logra con contenidos de humedad de las semillas de 14 a 15%. Estudios realizados en México muestran que es posible almacenar semilla de maíz no tratada pero pierde completamente su viabilidad en dos o tres semanas (Moreno, 1995).

Por otra parte, el uso de los insecticidas para contrarrestar el efecto nocivo de los insectos de almacén no siempre ha sido el más adecuado, tanto en lo que se refiere a los productos químicos empleados como a los sistemas y dosis de aplicación. Es de gran

importancia hacer llegar a los campesinos la información y la asistencia técnica que les permita el uso adecuado de los plaguicidas, sin riesgo para su salud y sin comprometer la estabilidad del ambiente. Mucho se ha hablado en contra del uso general de los plaguicidas en la agricultura, pero más serio es el problema cuando se usan en forma indiscriminada en la conservación de los granos que están próximos a su consumo, ya que su efecto es directo sobre la salud de los hombres y los animales domésticos (Moreno, 1995).

Debido a que el tratamiento químico de las semillas es una práctica común con fungicidas, se han realizado estudios para comprobar la fitotoxicidad de estos, tanto en el momento del tratamiento como a través de su almacenamiento, en condiciones de baja y alta humedad de la semilla, en donde se observó el efecto de los fungicidas en el deterioro biológico de la germinación causado por hongos. Entre los fungicidas más utilizados están: Captan 650 y 1 300 ppm, Carboxin 800 y 1 600 ppm, mezclas de Captan-Carboxin 160+360 ppm y 320+720 ppm, Clorotalonil 750 y 1 500 ppm, Quintozeno 1 500 y 3 000 ppm y Thiram 795 y 1 590 ppm todos utilizados por kilogramo de semilla. El fungicida Carboxin origina efecto fitotóxico temporal altamente significativo en semillas de trigo en pruebas de germinación que no es observado durante el almacenamiento de la semilla. El fungicida más efectivo contra especies de *Aspergillus* es el Captan (Moreno *et al*, 1991). El clorotalonil y el quitozono son plaguicidas restringidos en México. Todos estos plaguicidas se utilizan solo para proteger semillas para siembra.

II.6. Plantas con Actividad Antifúngica.

En México, son cientos de miles de agricultores que guardan toda o parte de su cosecha de maíz y frijol para el autoconsumo familiar, o bien, para venderlo poco a poco según sus necesidades. Los pequeños agricultores no cuentan con una adecuada infraestructura para el almacenamiento, y es en este sector donde se produce la mayor cantidad de pérdidas, por ello es necesario realizar investigaciones tendientes a incrementar o preservar las fuentes alimenticias para hacer frente a las necesidades de una población con crecimiento rápido y continuo (Pardavé, 1994).

Debido a que dentro de los factores bióticos los hongos juegan un papel importante en el deterioro de los granos y semillas, por afectar su poder germinativo como simientes, su calidad nutricional y sanitaria como granos alimenticios y conscientes de la problemática de postcosecha de nuestro país y del cuestionado uso indiscriminado de los fumigantes usados en la producción de alimentos con riesgos oncogénicos. Además del

conocimiento de que 150 especies de hongos fitopatógenos han desarrollado resistencia a los productos que existen en el mercado, y dado que, ante estos problemas y que en muchos cultivos y regiones del país, las fungosis se manifiestan como problemas desbastadores en corto tiempo, se requieren de medidas inmediatas que no ofrecen otros métodos de control, como el control genético, el control con microorganismos antagónicos y el control cultural.

Es por ello que a nivel nacional se ha intensificado la búsqueda de opciones para el control de los problemas fitosanitarios, como es el aprovechamiento de la gran diversidad de metabolitos secundarios que las plantas han desarrollado en su proceso evolutivo y que en gran medida están relacionadas con su capacidad de autodefensa, como el uso de extractos de plantas para el control de hongos fitopatógenos y de almacén.

Se han descrito 220 000 especies de plantas y del conocimiento empírico han surgido innumerables propiedades de ellas y su diversidad química ha contribuido en gran medida al desarrollo industrial. La industria de los plaguicidas agrícolas se inició con la utilización de plantas como el tabaco, el crisantemo y el *Derris* spp pero con el desarrollo de productos sintéticos, se abandonó su uso (Moreno, 1988; Montes, 1994; Montes y Figueroa, 1995).

Se han encontrado alrededor de 2000 especies de plantas con propiedades contra plagas agrícolas y la elucidación de la estructura de 10 000 metabolitos secundarios. En México se tienen antecedentes del uso de polvos vegetales para el control de los insectos plaga de granos almacenados como una técnica tradicional transmitida verbalmente de generación en generación, sin embargo, en el caso de hongos fitopatógenos se han llegado a conocer alrededor de 400 plantas con propiedades antifúngicas. Las investigaciones realizadas demuestran que la propiedad de inhibir o detener el desarrollo de hongos fitopatógenos es un fenómeno frecuente en estudios exploratorios sobre todo en el caso de aceites esenciales. Los principios activos son de muy diversa naturaleza: alcaloides, flavonoides, compuestos sulfúricos, taninos, esteroides y triterpenoides cuya acción puede ser sobre la germinación de las esporas en el proceso de penetración de los tejidos, la colonización o la producción de propágulos y a nivel celular, pueden alterar la membrana o inhibir la respiración. Existen diversos reportes de la eficacia de extractos vegetales equiparables a la de fungicidas sintéticos e inclusive existen ya en el mercado presentaciones comerciales de tabaco para el combate de insectos y hasta hace pocos años surgió un producto fungicida en base a extracto de semilla de toronja comercialmente conocido como BC-1000 en Chile, en donde se recomienda para *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr, *Fusarium oxysporum* Schlecht. y *Erwinia carotovora* L.R. Jones en

vid y frambuesa; en México se le denomina Citricidal pero está en proceso de aprobación (Lagunes, 1994; Montes, 1994; 1996; Montes y Figueroa, 1995).

En diversas partes del mundo se están realizando estudios para conocer la actividad fungicida de especies vegetales y determinar los principios químicos fungicidas.

Una de las más destructivas enfermedades de los árboles de cítricos, especialmente en el limón de la región del mediterráneo, es conocida como Mal-secco originada por el hongo *Deuterophoma tracheiphila*, pero algunas especies de cítricos presentan resistencia al hongo como son las de mandarina y naranja dulce y también se ha observado en las uvas. Desde 1930 Petri observó esta actividad y se asumió la presencia de algunos principios fungistáticos en diferentes especies de cítricos, reportó la actividad antifúngica de ciertas fracciones extraídas de hojas de Cleopatra mandarina (*Citrus reticulata*), una variedad conocida por ser altamente resistente al Mal-secco. En el estudio químico de las hojas de Avana mandarina y de Cleopatra mandarina se encontró tangeritina y nobelitina (flavonas), además la Avana mandarina contiene otras tres flavonas más, la 5-hidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxi flavona (5-O-desmetil-nobelitina), 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxi flavona y la 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxi flavona. Todas las flavonas fueron activas sobre el hongo causante del Mal-secco y además la nobelitina y la tangeritina fueron activas sobre *Fusarium oxysporum* (Pinkas *et al*, 1968).

La 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxi flavona llamada xantomicol fue aislada de la *Mentha piperita* y caracterizada por Jullien *et al*, en 1984; además se encuentra reportada por Corticchiato *et al*, en 1995 al ser aislada de *Thymus herba barona*. Este compuesto también ha sido aislado de *Ononis natrix* y tiene actividad antiespasmódica y actividad antimicótica contra *Aspergillus parasiticus*, *Candida tropicalis* y *Fusarium solani* por lo que se le encontró actividad fungicida y fungistática en hongos fitopatógenos (Suleiman *et al*, 1995).

La 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxi flavona también fue aislada de las partes aéreas de *Thymus herba barona* y fue caracterizada por Corticchiato *et al* en 1995 y se le conoce con el nombre de 8-OMe cirsilineol.

Estos compuestos fueron aislados de la *Larrea tridentata* y estudiados contra hongos patógenos humanos, solo la 5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxi flavona tiene una ligera actividad antimicótica contra *Trichophyton rubrum* probablemente debido a su escasa solubilidad en etanol (Cornejo *et al*, 1997).

Los estudios realizados sobre los terpenoides de *Mikania monagasensis* muestran que los germacránolidos, mikanólidos y dihidromikanólidos eran capaces de inhibir el crecimiento de hongos levaduriformes como *Candida albicans* (Rodríguez, 1977).

En diversos programas de investigación se han tratado de encontrar los agentes antimicrobianos en cultivos de células vegetales, tal es el caso del estudio realizado con extractos metanólicos del cultivo de células de *Papaver somniferum*, en donde se encontró que eran activos contra *Fusarium sp.* y otras especies de microorganismos (Evans *et al.*, 1986).

El extracto de éter de petróleo de las partes aéreas y de la raíz de *Wedelia paludosa* proporcionaron 7 ácidos kaurenóicos, un labdano y una secokaurenolactona, de los cuales la secokaurenolactona posee actividad antimicrobiana inhibiendo el desarrollo de bacterias, hongos levaduriformes y dermatofitos (Roque *et al.*, 1987).

De un estudio realizado en Guatemala sobre 50 plantas con probables actividades antifúngicas, encontraron que los extractos de 25 plantas inhiben uno o más dermatofitos. Las plantas americanas que mostraron mejor actividad son: *Byrsonima crassifolia*, *Cassia grandis*, *Cassia occidentalis*, *Diphysa carthagenensis*, *Diphysa robinoides*, *Gliricidia sepium*, *Piscidia piscipula*, *Smilax regelii*, *Solanum americanum* y *Solanum nigrescens*. Se demostró actividad fungicida y fungistática y se demostró la concentración mínima inhibitoria (Cáceres *et al.*, 1991).

Asimismo, se ha visto a *Aspergillus flavus* como productor de quitinasa en maíz y maní en germinación (Carvajal, 1994). Debido a que existe mucho paralelismo entre el mecanismo y ataque patógeno bacteriano, micótico y la colonización de insectos. Los patógenos bacterianos y micóticos destruyen la cohesión de la matriz de pectina intercelular separando las células por digestión enzimática. Las células vegetales son destruidas en este proceso (Dreyer y Cambell, 1986).

Entre los estudios que se han realizado en México sobre plantas antifúngicas, se encuentran los siguientes: los extractos de *Beschorneria yuccoides* (Agavaceae) en etapas de postfloración demuestran tener actividad antifúngica a diversas concentraciones y mejores resultados en pruebas de difusión con discos que en la técnica de pozo frente a los dermatofitos más comunes (Alba *et al.*, 1991).

De la resina de la Gobernadora (*Larrea tridentata*) se han aislado 18 flavonoides además de ácido nordihidroguayarático (NDGA) de los cuales se ha determinado su actividad microbiológica la cual mostró que la resina tiene actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium sp.*, y otros hongos fitopatógenos; los responsables de esta actividad son lignanos, NDGA, ácido guayarático metilado, derivados fenólicos del NDGA y flavonoides, además de haber demostrado una gran acción antifúngica frente a patógenos humanos (Hurtado *et al.*, 1979; Barragan *et al.*, 1994).

En la infusión acuosa de *Dodonaea viscosa* var *angustifolia* se aisló el ácido furanoditerpenoide, saponinas y la flavona II a la que se le atribuye actividad antiséptica (Dominguez *et al*, 1980b).

En el estudio realizado para identificar las especies de hongos que originan enfermedades en el frijol y la evaluación de su control con extractos vegetales se observó, que los principales hongos presentes son: *Urocyces appendiculatus*, *Alternaria tenuis* y *Fusarium oxysporum* entre otros. Los extractos vegetales que presentan la mayor actividad contra roya, son los obtenidos con los frutos de *Citrus limonia* (Rutaceae), las flores de *Spathodea campanulata*, el bulbo de *Allium sativus*, las flores de *Bougainvillea spectabilis*, los tallos de *Equisetum* sp y los de las hojas y los tallos de *Tribulus cistoides*. Para antracnosis los resultados más significativos se obtuvieron con los extractos de *S. campanulata* y *T. cistoides*. Para la cenicilla los mejores extractos fueron los de las hojas de *Eucaliptus globulus*, las flores de *Tagetes erecta* y de *T. cistoides*, el cual parece tener el mayor espectro de acción (Montes, 1991).

Algunas especies del género *Solanum* (Solanaceae) entre cuyas especies se encuentran: *S. campechiense*, *S. houstonii*, *S. dasycarpum*, *S. corymbosum* (nuevas especies del estado de Jalisco), *S. tridynamum* (especie silvestre del estado de Yucatán) contienen compuestos esteroidales, alcaloides y la saponina esteroide diosgenina sobre todo en sus frutos. De la raíz de *S. chrysotrychum* se ha realizado cultivo celular para obtener los principios químicos responsables de su actividad antimicótica. Estas especies son fuentes potenciales de antimicóticos naturales (López *et al* 1993; Mejía *et al* 1993; Vargas y Rodríguez, 1993).

Se determinaron los grupos químicos antifúngicos y su espectro de acción así como su capacidad de protección a sus hospederos de una serie de plantas reportadas con propiedades antifúngicas, de las cuales, las plantas que presentan mayor cantidad de grupos químicos con posible acción antifúngica fueron *Tribulus cistoides*, *Chenopodium album* y *Acacia farnesiana*, en las dos primeras especies se encontró taninos y glicósidos y en la 2a. y 3a. especies flavonoides. *T. cistoides* presenta el mejor espectro de acción seguida de *Ch. album* y *Spathodea campanulata* tanto en la germinación de las esporas como en la protección de la planta (Cruz y Montes, 1993).

También se ha tratado de incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivo celular por inducción biótica y abiótica como en el caso de *Catharantus roseus* el cual produce 19 veces más ajmalicina (alcaloide indólico) cuando se estimula con homogenado de *Aspergillus* sp., (Moreno y Loyola, 1993).

En la búsqueda de antagonistas naturales de los hongos fitopatógenos se ha probado *in vitro* la actividad antibiótica de bacterias aisladas de agroecosistemas de melón frente a *Fusarium oxysporum* el cual es capaz de sobrevivir por 10 años en el suelo. Las bacterias corresponden al género *Pseudomonas* y se observó variación en el grado de inhibición del crecimiento de *Fusarium* entre las diversas bacterias aisladas (Ferrera-Cerrato, 1994).

En México existen numerosas rutáceas no estudiadas ni descritas correctamente como *Stauranthus perforatus*, que junto con otras especies de esta familia como *Zanthoxylom fagara*, *Z. plerota*, *Z. caribeum*, *Esenbeckia pentaphylla* y *Pilocarpus racemosus* son denominadas por los mayas "tankas-che" o "tankasche' ". Han sido utilizadas con fines medicinales para combatir el dolor de cabeza, la epilepsia, como anestésico, diuréticos, contra la flatulencia, etc. Dado que las especies de la familia Rutaceae contienen alcaloides y cumarinas que pueden desempeñar un papel importante en las interacciones planta-planta y planta-microorganismo se probaron extractos de la raíz de *S. perforatus* los cuales mostraron actividad inhibitoria de los hongos fitopatógenos *Alternaria sp* y *Fusarium oxysporum*. De esta especie vegetal se aisló xanteletina, sesamina, pellitorina y una furano-cumarina como constituyente bioactivo (Mendieta y del Amo, 1981; García *et al*, 1995).

Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que la propiedad antifúngica de los metabolitos secundarios es un fenómeno frecuente y la diversidad de hongos fitopatógenos y de almacén también genera una diversidad de respuestas al interactuar con las plantas. Hay alrededor de 50 familias de plantas en las que se han encontrado especies antifúngicas entre las que destacan la Asteraceae, Fabaceae y Brassicaceae; se han estudiado aceites esenciales y diversos extractos de los cuales los hay con amplio espectro de acción contra hongos fitopatógenos, pero la mayoría tienden a ser específicos; entre las especies que más destacan por su amplio espectro de acción están el ajo (*Allium sativum* L.) y la cebolla (*Allium cepa* L.) que contienen compuestos azufrados volátiles que dan poco efecto residual (Montes, 1996).

II.6.1. Efecto de plantas en *Aspergillus*.

La literatura relacionada con los metabolitos vegetales que afectan el desarrollo de las especies de *Aspergillus* o la síntesis de sus aflatoxinas es escasa, sin embargo existen datos importantes tanto de productos vegetales, metabolitos de diferentes plantas y metabolitos del propio maíz, como la actividad inhibitoria del extracto clorofórmico de raíz de zanahoria sobre el desarrollo y la producción de aflatoxina B₁ de *A. parasiticus*,

asi como la inhibición en la producción de aflatoxinas de *A. parasiticus* con la corteza de *Philodendron sp.*, los extractos de *Brassica nigra* y *Zanthophyllum sp.*, los cuales tienen menor actividad sobre *A. flavus*. Se ha observado que con polvos de especias existe efecto inhibitorio en el desarrollo de *A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. versicolor* en los extractos de *Syzygium aromaticum*, *Illicium anisatum* y *Pimenta dioica* y la mayoría de otras especias inhiben la producción de micotoxinas. Los aceites esenciales de clavo y canela afectan el desarrollo de *A. parasiticus* pero no la producción de aflatoxinas. Además los metabolitos de maíz 1-heptanol, 2-nonanol, 1-monanol, geraniol, 2-octanol, 2-decanol, brionona, 2,4-hexadienal, trans-2-hexanal y 2,4-decadienal inhiben completamente a *A. flavus* en cultivos (Montes y Figueroa, 1995).

En los estudios realizados en plantas recolectadas en los estados de Morelos, Oaxaca y el Distrito Federal sobre la germinación de las esporas, el desarrollo del micelio y la protección de los granos contra la contaminación con *A. flavus*, se observó que algunos extractos acuosos tienen la capacidad de retrasar el desarrollo del micelio como los de *Pinus sp.*, *Lepidium virginicum*, *Teloxys ambrosioides*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Amaranthus hybridus* y *Piper auritum*; otros reducen en cierto grado la contaminación del grano como los de *Rosmarinus officinalis* que reducen en un 61% la frecuencia de contaminación; algunos actúan en los tres niveles como los de *Raphanus raphanistrum* (rabanillo), *Coffea arabica* (café) y *Larrea divaricata* (gobernadora). La mayoría de los extractos de aceites esenciales estudiados tienen efecto erradicante sobre el hongo como son los de canela *Cinnamomum zeylanicum*, clavo *Syzygium aromaticum*, epazote *Teloxys ambrosioides* y el tomillo *Thymus vulgaris*, los cuales tienen el inconveniente del olor penetrante que puede ocasionar rechazo de alimentos elaborados con maíz tratado. Esto puede evitarse con la utilización de los metabolitos secundarios que sean efectivos y sin el inconveniente odorífero; con los avances logrados se puede suponer que existen amplias perspectivas para que se pueda utilizar este tipo de técnicas para el control de *Aspergillus flavus* y otros hongos del maíz (Montes y Figueroa, 1995).

En la aplicación de polvos y extractos acuosos y hexánicos de 106 especies de plantas correspondientes a 50 familias que incluyen plantas hortícolas, frutales, forestales, medicinales y arvenses, sobre la germinación de las esporas, el desarrollo del micelio y la protección de los granos contra la contaminación con *A. flavus*, se observó que solo la gobernadora (*Larrea tridentata*), la pimienta gorda (*Pimenta dioica*) y el clavo (*Syzygium aromaticum*) además de *Chenopodium album*, *Ficus tecolutensis*, *Raphanus raphanistrum* y *Nicotiana tabacum* fueron activas en la inhibición de germinación de esporas y desarrollo micelial, el extracto acuoso del café (*Coffea arabica*) y el polvo no permitieron el desarrollo del hongo. De las especies evaluadas en la protección de maíz

solo *Larrea tridentata*, *Rosmarinus officinalis*, *Tridax coronopifolia* y *Colons blumei* son activas y algunas otras como *Coffea arabica*, *Raphanus raphanistrum* son potencialmente prometedoras. En este trabajo el extracto hexánico de *Ruta chalapensis* manifestó acción significativa en la inhibición del micelio aunque su efecto en la protección de grano no es significativo (Montes *et al*, 1997).

En el estudio realizado sobre *Helietta parvifolia* del extracto en éter de petróleo se aislaron 3 compuestos caracterizados como: el alcaloide Flindersiamina, Tetracosanol y un hidrocarburo saturado el Dotiacontane (Dominguez y Merijanian, 1980).

De la raíz de *Fraxinus greggi* en extracto con éter de petróleo se aislaron una serie de compuestos entre los que destaca la cumarina Heliettina I previamente aislada de *Helietta longifoliata* y cuyo acetato tiene propiedades antitumorales. Este compuestos es ópticamente inactivo en comparación con la Chalepina, de igual estructura que fue aislada de la rutácea *Ruta chalapensis* por lo que la heliettina debe ser la correspondiente modificación racémica (Dominguez *et al*, 1980a).

Al determinar el potencial alelopático de *Helietta parvifolia* (Gray) Benth se encontró que su dominancia puede ser por la producción de sustancias alelopáticas que impiden o limitan el desarrollo de otras plantas, contiene un alcaloide que se libera através del agua de lluvia y probablemente también tienen efecto en los microorganismos parásitos patógenos de esta planta, por ello se utiliza para postes de cercas por su resistencia a la pudrición. Muestra actividad antifúngica en algunos hongos saprofiticos del suelo entre ellos, especies de *Aspergillus*. El extracto más activo es el aceite esencial que contiene eugenol, metil eugenol, safrol e isosafrol.(Graue y Rovalo, 1982).

Se estableció el potencial insecticida del aceite esencial sobre la mosca de fruta y la cucaracha, además diversos extractos como el agua de arrastre de hojas de *Helietta parvifolia* (Gray) Benth. y el aceite esencial, mostraron efecto fungicida al aplicarse por contacto y volatilidad en los hongos *Penicillium sp*, *Fusarium sp*. y *Rhizopus sp*. mientras que las especies del género *Aspergillus* solo presentaron alteraciones anatómica y fisiológicas graves. En pruebas de protección de granos con varios métodos de aplicación del aceite esencial se encontró reducción en el número de esporas. El mejor resultado se obtuvo con el agua de arrastre que contenía 600 ppm de aceite esencial, el cual mostró efecto fungicida para el control de hongos de almacén en condiciones de alta humedad relativa (Rovalo *et al*, 1983).

En diversos países Latinoamericanos se utilizan una diversidad de plantas con propiedades plaguicidas y en la recopilación realizada por Sabillón y Bustamante en 1996, se presenta la descripción de las plantas y las propiedades plaguicidas, entre ellas se encuentran descritas algunas con propiedades fungicidas como son: *Citrus aurantium* L.

que se ha utilizado como repelente y antialimentario en forma de extracto acuoso y el aceite obtenido por presión, *Ruta graveolens*, *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Amaranthus hybridus*, *A. viridis*, *Argemone mexicana*, *Azadirachta indica*, *Chenopodium ambrosioides*, *Lepidium virginicum*, *Lycopersicon esculentum*, *Melia azedarach*, *Ocimum micranthus*, *Parthenium hysterophorus* y *Ricinus communis*.

II.6.2. Familia Rutaceae.

Orden: Rutales. Suborden: Rutineae.

II.6.2.1. Características morfológicas.

Flores radiadas, tetrámeras o pentámeras, hermafroditas. Estambres $5\alpha\alpha$, gineceo sentado sobre un disco que funciona de nectario de 4 a 5 carpelos unidos, con $1\alpha\alpha$ óvulos en cada división. Fruto seco o carnoso. Plantas herbáceas o leñosas con glándulas interiores llenas de aceite etéreo. Hojas enteras o partidas, marcadas con puntos transparentes, sin estípulas. Inflorescencias cimosas. De distribución vasta sobre la tierra. Árboles o arbustos (Reiche, 1963; Willis, 1973).

La familia se compone de 150 géneros y 900 especies principalmente arbusto o árboles. Tienen glándulas con esencia en las hojas y en otro órganos, de flores dispuestas en cimas de 4-5 sépalos, 4-5 pétalos, 8-10 estambres y un ovario súpero. Sus frutos son muy variados, ejem. Subfamilia *Aurantioideae* (naranjas) es un hesperidio (Trease y Evans, 1987).

II.6.2.2. Géneros Principales.

Los géneros principales de la familia son: *Citrus* con 12 especies, *Fagara* con 250 especies, *Haplophyllum* con 70 especies, *Zanthoxylum* con 20 a 30 especies, *Cusparia* con 30 especies, *Tecla* con 30 especies, *Galipea* con 13 especies, *Ruta* con 7 especies, *Esenbeckia* con 38 especies y muchos otros como *Pilocarpus*, *Helietta*, *Casimiroa*, *Ptelea* (Martínez, 1979; Trease, 1987).

II.6.2.3. Rutáceas presentes en México.

En México, se ha documentado la existencia de 54 géneros de rutáceas: *Esenbeckia floya* T.S. Brandegee, *Casimiroa edulis* Llave et Lex, *C. greggi*, *Zanthoxylum caribaenum* Lam, *Z. fagara* (L) Sarg., *Z. plerota* F., *Stauranthus perforatus*, *Ruta chalapensis*, *Citrus sinensis* (L) Osbeck, *Citrus limonia* Osbeck, *Citrus aurantium* L., *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle, *Casimiroa tetrameria*, *Helietta parvifolia* (Gray) Benth., *Aegle arelos* Corr., *Alseis yucatanensis* Stand., *Amyris balsamifera* L., *Amyris rekoii* Blake, *Amyris sylvatica* Jacq., *Casimiroa pubescens* Ram., *Casimiroa sapota* Oerst., *Casimiroa watsonii* Engl., *Choisya ternata* H.B.K., *Choisya dumosa* Torr., *Chomelia barbata* Stand., *Chomelia spinosa* Jacq., *Citrus grandis* Osbeck o *Citrus maxima* (Burn) Merr., *Citrus limeta* Risso, *Citrus medica* L., *Citrus nobilis* Lour. Var. *Deliciosa* (Ren.) Swingle, *Diclatropis bicolor* (Zucc.) Radlk., *Esembeckia berlandieri* Baill., *Esembeckia hartmanii* Rob et Fern, *Fortunella margarita* (Lour) Swingle, *Murraya exotica* L. *Murraya paniculata* Jacq., *Peganum mexicanum* Gray., *Polyaster boronioides* Hook, *Ptelea trifoliata* L., *Sargentia greggii* Wats., *Stauranthus conzattii*, *Triphasia trifolia* Burn., *Peltostigma pteleoides* (Hook) Walp., *Zanthoxylum alfine* H.B.K., *Zanthoxylum aguilari* Stand et Steyeim., *Zanthoxylum arborescens* Rose., *Zanthoxylum belizense* Lund., *Zanthoxylum elegantissimum* (Engl.) P. Wilson, *Zanthoxylum mayanum* St., *Zanthoxylum melanostictum* Schl. et Cham., *Zanthoxylum microcarpum* Griso., *Zanthoxylum procerum* Donn. Sm. y *Ruta graveolens* L. (Martínez, 1979).

II.6.2.4. Rutáceas presentes en el estado de San Luis Potosí.

En el estado de San Luis Potosí se ha documentado 21 géneros de rutáceas: *Diclatropis bicolor* (Zucc) Radlk., *Amyris madrensis* Swats., *Casimiroa pringlei* (Wats) Engel., *C. tetrameria* Mill sp., *Chalcas exotica* Mill sp., *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Choisya palmeri* Standley, *Citrus limonia* Osbeck, *Ruta graveolens* L., *R. chalapensis* L., *Ptelea trifoliata* L., *Helietta parvifolia* (Gray) Benth., *Zanthoxylum fagara* L., *Casimiroa pubescens* Ram., *Choisya ternata* H.B.K., *Citrus aurantium* L., *Esembeckia berlandieri* Boill., *Peganum mexicanum* Gray., *Peltostigma pteleoides* (Hook) Walp., *Sargentia greggii* y *Zanthoxylum elegantissimum* (Engl.) P. Wilson (Martínez, 1979).

II.6.2.5. Distribución Geográfica.

Las 54 especies de la familia Rutaceae que se encontró registradas, se distribuyen en vegetaciones de tipo selva baja, mediana a semidesértica o xerófita. Se encuentra reportada la presencia de rutáceas en los estados de Yucatán, Chiapas, Tabasco, Sinaloa, Oaxaca, Veracruz, Michoacán, Puebla, Estado de México, Morelos, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí, Jalisco, Chihuahua, Coahuila, Sonora, Nayarit, Tamaulipas, Nuevo León, y Zacatecas, los estados de San Luis Potosí con 21 géneros reportados, ocho en el SE del estado en la zona Huasteca y 13 en la zona semiárida y matorral submontana, Oaxaca con 14 géneros reportados y Yucatán con nueve géneros, son los que tienen el mayor número de ellos.

En el estado de San Luis Potosí, en el municipio que mayor número de especies reporta es Guadalcázar con ocho especies de seis géneros y el S.E. Zona Huasteca con siete especies (Martínez, 1979).

II.6.2.6. Composición química de las rutáceas.

Las plantas de la familia Rutaceae contienen gran cantidad de alcaloides, esencias, raunoheterósidos, cumarinas, terpenoides y furanoquinolinas. Alcaloides de tipo amina alcaloidica, imidazol, indol, isoquinoleína, piridina, pirrolidina, quinazolina y quinoleína entre otros. Los frutos son ricos en ácidos como el ácido cítrico y otros ácidos orgánicos, sustancias aromáticas y vitamina C (Trease y Evans, 1987). Por lo que muchas especies de esta familia son utilizadas con fines medicinales.

II.6.3 Localización y descripción morfológica de las rutáceas en estudio.

La planta en estudio *Helietta parvifolia* (Gray) Benth., llamada Barreta (Nuevo León), Palo Blanco (Guadalcázar S.L.P.) y Guayacán (Hidalgo), es un arbusto o árbol de hasta 8 m de altura, con hojas opuestas, digitadas con 3 hojuelas obovadas de 1 a 5 cm, fruto alado de 6 a 8 mm y flores blancas. Se ha encontrado en los estados de Guerrero, Nuevo León, Chiapas, Coahuila, Tamaulipas, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí (Ramírez y Alcocer) (Martínez, 1979; Trease y Evans, 1987).

Según la revisión realizada en el Herbario del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (I.I.Z.D.) de la U.A.S.L.P., la planta *Helietta parvifolia* (Gray) Benth., se encuentra registrada en recolectas realizadas desde el año 1954 al año 1984 en las siguientes localidades: La Joya, municipio de Ventura, El Realejo, Charco Blanco, Cañón del Granizo al E. de Nuñez y El Milagro de Guadalupe del municipio de Guadalcázar, Armadillo de los Infantes, al E. de Santa Catarina municipio de San Nicolás Tolentino, Minas de San Rafael municipio Villa de Juárez, Boquilla del municipio Rioverde y La Joya del municipio de Soledad de Graciano Sánchez, en el Estado de San Luis Potosí. A una altitud que varía de 1100 a 1800 msnm y en laderas o depresiones calizo-yesosas en vegetaciones de matorral submontano, matorral desértico-rosetófilo o vegetación xerólita.

Ptelea trifoliata L. Comúnmente llamada "Zorrillo" (Coahuila, Guadalcázar, S.L.P.) y Pinacatillo (Hidalgo). Es un arbusto o arbolito de hasta 8 m de altura con olor desagradable, hojas alternas con 3 hojuelas trifoliadas, flores blanco-verdosas, el fruto es una sámara de 1 a 2.5 cm. Se ha encontrado en los estados de Sonora, Coahuila, Hidalgo y San Luis Potosí (Martínez, 1979).

En la revisión de Herbario del I.I.Z.D. de la UASLP, la planta *Ptelea trifoliata* L. se encuentra registrada en recolectas realizadas desde el año 1954 al 1984 en las siguientes localidades: 1 km Carr. Central-Guadalcázar, El Realejo y camino a la Gruta de San Cayetano en el municipio de Guadalcázar, Estación Catorce del municipio de Catorce, al sur de Cedral municipio de Cedral, Km 7 al E. Cándido Navarro municipio de Soledad de Graciano Sánchez, Km 47 Carretera San Luis Potosí-Matehuala municipio de Villa Hidalgo, Armadillo de los Infantes y Puerto de la Huerta Km 35 Carretera San Luis Potosí-Rioverde municipio de Zaragoza, en matorral submontano, crasicaule y a la orilla del camino. Se encuentra en floración de junio a septiembre y en una altitud de 2250 msnm.

Casimiroa pringlei (Wats.) Engl. llamada "Zapotillo" (Guadalcázar, S.L.P.) Arbusto o arbolito de 3 a 5 m, hojas compuestas de 2 a 3 hojuelas obovadas a elípticas, lisas y enteras, flores amarillo-verdosas, fruto oval o globoso de 1.2 a 1.8 cm de ancho con semillas de 10 a 12 mm. Se ha reportado en los estados de Durango, Nuevo León y San Luis Potosí. (Rzedowski) (Martínez, 1979).

En la revisión de Herbario del I.I.Z.D. de la UASLP se ha reportado en: Charco blanco Km 76 Carr. San Luis Potosí- Antigua Morelos, Km 10 sobre el entronque de la Carretera Central-Cerritos y en el Aguaje de los García a 8 Km de la desviación de la Carr. Central-Guadalcázar en el municipio de Guadalcázar, en recolectas realizadas en los

años 1989 a 1991; en vegetación de matorral desértico micrófilo con yuca y submontano, a una altitud promedio de 1470 msnm.

Citrus limonia Osbeck. Comunmente llamado "Limonero" o limón, alemuncuabiti (Yucatán), mimu (otomí, Hidalgo), Tsajpox, tzaposhi (lengua mixe en San Lucas Camotlán Oaxaca). *Citrus limonium* Risso. Arbolillo espinoso de hojas elípticas, crenadas, de 5 a 7.5 cm, con pecíolos alados y flores blancas, frutos de 4 a 6 cm, amarillo-verdosos con 10 segmentos ácidos. Cultivado en climas cálidos al SE del Estado. De vasta distribución en el País (Martínez, 1979).

Según la revisión de Herbario en el I.I.Z.D. del UASLP se encuentra en el SE del estado (Huasteca), municipio de Venado y en la ciudad capital.

Citrus aurantium L. Conocida como "Naranja ágría", Jiliy-Lanax (Lengua Huasteca SE de San Luis Potosí), (Rzedowski), K'ah-pak'al, Pah-papkal, Sut's-pak'al (Maya), Motoo (Chinanteca en Oaxaca), Naranjo amateco o Ta-hiña (lengua chinanteca en San Lucas Oaxaca) (Martínez, 1979). Arbolito espinoso, hojas ovales agudas o acuinadas, la base curvada. El pecíolo alado, flores blancas con 20 a 24 estambres, fruto de 7 a 8 cm. Es cultivado en el SE del estado. Se encuentra reportado en los estados de Yucatán, Oaxaca y SE de San Luis Potosí.

Citrus medica L. Llamada "Cidrero" o "Cidra" (Guadalcázar S.L.P.), (Ramírez y Alcocer). Cidra-limón, Be-hui-na yi-xtilla, Cicanaca-gueto-na-yy-castilla (zapoteca, Oax.). Se ha reportado en los estados de Oaxaca y San Luis Potosí, (Reko). Es un arbolillo espinoso de hojas ovales, redondeadas en el ápice, serruladas, con los pecíolos no alados, flores blancas, rojizas abajo, con 30 a 40 estambres, fruto oblongo u oval, algo mamilado de 15 a 25 cm de largo por 10 a 15 cm de ancho, amarillento, con la cáscara gruesa y la pulpa ácida. Es un árbol cultivado en climas cálidos (Martínez, 1979).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Ubicación del Estudio.

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Farmacia, Microbiología y Micología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, así como en las instalaciones de Laboratorios Altair de análisis clínicos y microbiológicos en la ciudad de San Luis Potosí y en el laboratorio de Control de calidad de CONASUPO en la ciudad de México.

III.2. Recolección del Material Vegetal.

En la zona semiárida del estado de San Luis Potosí, se recolectaron de acuerdo a su fenología, seis especies de plantas de la familia Rutaceae: *Helietta parvifolia* (Gray) Benth. (ramillas y ramillas con flor), *Ptelea trifoliata* L. (ramillas y ramillas con fruto), *Casimiroa pringlei* (Wats.) Engl. (ramillas y ramillas con flor), *Citrus limonia* Osbeck (ramillas, ramillas con flor y frutos inmaduros y maduros), *Citrus aurantium* L. (ramillas, frutos inmaduros y maduros) y *Citrus medica* L. (ramillas, ramillas con flor y fruto inmaduro). Las tres primeras especies son silvestres y las restantes cultivadas. De cada especie vegetal se recolectó cantidad suficiente para obtener 600 g de muestra seca por estructura vegetal, y se prepararon muestras para herbario por duplicado, cuyos especímenes quedaron depositados en el herbario del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP como material de referencia.

III.3. Preparación de los Extractos Vegetales.

El material vegetal fresco que se recolectó, se secó a la sombra por un periodo de 15 a 25 días, de acuerdo al tipo de muestra (Dominguez, 1985; Lagunes, 1994). El material vegetal seco, se pulverizó previa separación de los tallos gruesos, en dos etapas: (Lagunes, 1994; Cáceres *et al*, 1995), trituración de la muestra con un molino eléctrico para granos y molienda con una licuadora de tipo casero, para obtener un tamaño de partícula que pase por una malla de 40 hilos/pulgada (0.353 mm).

En las muestras vegetales pulverizadas se realizaron dos tipos de extracciones: maceración etanólica e infusión acuosa.

Para preparar la maceración fraccionada etanólica, se pesaron 25 g del polvo vegetal, se agregaron 30 mL de etanol al 95% y se dejó reposar por tres días al abrigo de la luz. Al tercer día se separó la fase líquida y se agregó 15 mL de etanol al 95%, repitiéndose este procedimiento para obtener la mayor cantidad posible de los principios solubles. El extracto se filtró por gasa y por papel Whatman 2. La parte sólida se eliminó y la líquida se ajustó por volumen hasta obtener una concentración de 500 mg/mL. El tiempo total de preparación del extracto fue de siete días.

Para obtener la infusión acuosa se procedió de la siguiente manera: a 25 g de polvo vegetal se le agregó 50 mL de agua destilada caliente, el recipiente respectivo se cerró para evitar pérdida de sustancias volátiles. La mezcla se dejó reposar por 24 horas y se filtró. La parte sólida se desechó y la líquida se ajustó por volumen a una concentración de 500 mg/mL.

Los extractos (maceración fraccionada etanólica e infusión acuosa con 24 horas de maceración) se esterilizaron por microfiltración mediante el uso del sistema millipore con la siguiente secuencia: pre-filtros AP-25, AP-15, membrana hidrofílica de 0.45 μm y filtro de hemicelulosa hidrofílica de 0.22 μm y en condiciones estériles por filtro de hemicelulosa hidrofílica de 0.22 μm en campana de seguridad Tipo II, previo lavado quirúrgico de brazos y manos.

Los 32 extractos estériles o tratamientos a evaluar, se guardaron en alícuotas en viales de cierre hermético y se mantuvieron a 4°C hasta que fueron utilizados en los ensayos biológicos (no más de 30 días).

III.4. Estandarización del Inóculo de *Aspergillus flavus* Link.

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de rutáceas se realizó sobre *Aspergillus flavus* Link; cepa 1273 SRRC del National Center for Agricultural Utilization in Peoria Il. La estandarización del inóculo de prueba de *Aspergillus flavus* Link, se realizó por una modificación al método semicuantitativo de comparación visual turbidimétrico del equipo API 20-C para identificación de levaduras, y se utilizó la escala (+) de la carta de Wickerham (Analytab Products). Este método fue utilizado en forma semicuantitativa en la evaluación de hongos patógenos humanos (Cornejo *et al*, 1997). En el presente trabajo se le asignó un valor de 1×10^6 conidios/mL a la escala (+) y se comprobó por la cuenta de colonias obtenidas por siembra en placas de agar Czapek, con

incubación a 28°C por 72 horas, se realizaron 20 repeticiones y se estableció la reproducibilidad cuantitativa del método, el coeficiente de variación del mismo así como el intervalo de confianza para la media.

Para comprobar la homogeneidad en la densidad de desarrollo del inóculo del hongo y establecer el tiempo de incubación en el ensayo biológico, se sembró en la superficie de cajas de Petri con agar Czapeck 0.1 mL del inóculo estandarizado (100 000 conidios) por espatulación. Se incubó por 72 a 96 horas a 28°C y se determinó el tiempo en que se logró un desarrollo homogéneo.

III.5. Evaluación de la Actividad Antifúngica de los Extractos de Rutáceas.

Se realizó una prueba de selección de extractos activos en placa, por modificaciones de los métodos de difusión en disco y técnica de pozo, con base a un diseño completamente al azar con cinco repeticiones (Koneman, 1997; Bonifáz y García, 1990; Cornejo *et al.*, 1997). Esta prueba se realizó en placas de agar Czapek de 4 mm de altura y un pozo de 0.6 cm de diámetro, se inocularon 100 000 conidios (0.1 mL de la suspensión de conidios estandarizada) de *A. flavus* Link en la superficie del agar y se extendió por espatulación hasta cubrir la superficie del medio. La perforación de los pozos se realizó con asa de 0.6 cm de diámetro y se les depositó a cada uno, 100 µL (50 mg) del correspondiente tratamiento. Como testigos negativos se utilizaron agua destilada y etanol. Para evitar la evaporación de los extractos y permitir la difusión en el agar, se refrigeraron por 30 minutos a 4 °C y se incubaron durante 72 horas a 28 °C. La actividad antifúngica se determinó por el tamaño del halo de inhibición de desarrollo del hongo en cm. A los tratamientos que resultaron positivos se les determinó el tipo de actividad antifúngica.

III.6. Determinación del tipo de Actividad Antifúngica (Fungicida o Fungistática).

Los extractos de las rutáceas que manifestaron actividad antifúngica en la prueba de selección de extractos activos, se evaluaron para conocer si esta acción es fungicida o fungistática, la cual se estableció por inhibición de desarrollo en caldo sabouraud dextrosa (CSD) y en la resiembra en agar Czapek. Este estudio se realizó con base a un diseño completamente al azar con cinco repeticiones frente a testigos negativos de agua destilada y etanol.

Previamente se estableció la cantidad máxima de etanol permitida que no presentara interferencia en el desarrollo del *A. flavus*. Se colocó en tubos de ensaye en condiciones estériles 1 mL del tratamiento de prueba (extracto vegetal etanólico o acuoso a concentración de 500 mg/mL) o testigo negativo (etanol o agua destilada). Los tubos que contenían etanol se evaporaron a 37°C en estufa de incubación hasta obtener un residuo seco que se redisolvió con 0.1 mL de etanol. A todos los tubos se les agregó 4 mL de CSD y 1000 conidios de *A. flavus* Link del inóculo estandarizado, se homogenizó y se incubó a 28°C por 72 horas. Pasado este tiempo se homogenizó y se resembró 0.1 mL de este cultivo líquido, en la superficie de 4 mL de agar Czapek inclinado en tubo, se incubaron a 28°C por 72 horas y se observó la inhibición de desarrollo de *A. flavus* Link. La ausencia de desarrollo en la resiembra se interpretó como efecto fungicida del extracto y el desarrollo escaso o moderado como efecto fungistático.

III.7. Determinación de Concentración Mínima Fungicida.

A todos los extractos que manifestaron actividad fungicida o fungistática a 500 mg de prueba sobre *A. flavus* Link se les determinó la concentración mínima fungicida (CMF), la cual se realizó con base a un diseño completamente al azar con tres repeticiones frente a testigo negativo de etanol, con modificaciones al método de dilución en caldo (Koncman, 1997). Se utilizó una serie por triplicado de cantidades decrecientes 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025, 0.02 y 0.01 mL del correspondiente tratamiento de prueba (extracto vegetal etanólico a 500 mg/mL de las plantas en estudio) y etanol como testigo negativo, con el procedimiento descrito para la determinación de actividad fungicida o fungistática. La máxima cantidad ensayada fue 3 mL de extracto que corresponden a 1.5 g de planta seca. La evaluación se realizó por la ausencia de desarrollo en los tubos de agar Czapek inclinado y se consideró que la concentración mínima fungicida es la menor cantidad de extracto necesaria para matar el hongo *in vitro*.

III.8. Prueba de Protección del Grano en Almacén.

Se llevó a cabo con los tres extractos etanólicos que dieron el mejor resultado *in vitro* (la menor concentración mínima fungicida) como son los de: *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl., ramillas con flor y los extractos de frutos maduros e inmaduros de *Citrus limonia* Osbeck. Se evaluó su capacidad de protección del grano de maíz Cacahuazintle a

la infección (penetración) por *Aspergillus flavus* Link, con base a un diseño completamente al azar con tres repeticiones; los extractos de las muestras vegetales se utilizaron a concentración mínima fungicida y dos veces esta cantidad (CMF y 2CMF), así como un blanco sin tratamiento como testigo negativo y como testigo positivo el Daconil a 750 ppm activo. Se utilizó un lote de maíz cacahuazilte de 8 kg al que se le determinó por triplicado su contenido de humedad, por método de pérdida por secado a 103°C por 72 horas (Moreno, 1984; 1996). La evaluación micológica del grano, se realizó por triplicado con modificaciones al método de dilución (Moreno, 1988; Beti, 1995) previa desinfección con cloro al 2% activo y Tween 80 por 3 minutos y un posterior lavado superficial con agua destilada estéril y secado del grano desinfectado en campana de seguridad Tipo II. Se sembraron diluciones del homogenizado del grano de maíz desinfectado en agar Czapek y se incubaron a 28°C por 72 horas. El grano debería estar libre de infección por *A. flavus*.

El establecimiento de la prueba piloto de protección en almacén se realizó bajo las siguientes condiciones experimentales: la cantidad de grano por prueba fue 160 g con un inóculo de *A. flavus* Link estandarizado de 10 000 propágulos, la temperatura de almacén de 25 a 27 °C y con una humedad relativa ambiental de 85 %, la cual se logró con una solución sobresaturada a 30°C de KCl; el tiempo de incubación fue por 20 días y un contenido de humedad del grano aproximado de 18 %, el cual se corrigió por medio de la ecuación de Phillip Hereim para establecer el volumen de agua para ajuste de humedad (Pixton, 1982). Se valoró el porcentaje de humedad del grano tratado, por método de pérdida por secado a 103°C por 72 horas, al inicio y al final del periodo de almacenamiento.

La aplicación de los tratamientos se realizó en dos partes en una campana de seguridad Tipo II y con el siguiente procedimiento: en cada uno de dos matraces Erlenmeyer estériles y con tapón de hule se colocó la mitad del agua para ajuste del contenido de humedad, se agregó la mitad del correspondiente tratamiento (extracto vegetal o testigo), 5 000 propágulos de *Aspergillus flavus* Link (0.5 mL de dilución 1:100 del inóculo estandarizado) y 160 g de maíz cacahuazintle del lote evaluado, al primer matraz para cada tratamiento. Se tapó bien con el tapón de hule y se agitó hasta que todo el líquido se embebió. Se vació al segundo matraz Erlenmeyer que contenía la segunda parte del tratamiento correspondiente, se mezcló hasta que el líquido se embebió y se vació el grano tratado a un frasco de boca ancha estéril y se cubrió con un cuadro de plástico delgado sujetado con una liga al cuello del frasco al que se le hicieron tres pequeñas perforaciones con la punta de un alfiler.

Se colocaron los frascos con los tratamientos en un recipiente que contenía solución sobresaturada de KCl en cantidad suficiente para tener un sedimento de cristales de 0.5 a 1 cm de alto y un soporte donde se colocaron los frascos sin que se mojaran con esta solución. Se analizaron un total de 24 muestras. El almacenamiento se realizó en estufa microbiológica por 20 días a temperatura de 25 a 27°C (26°C). A las muestras de prueba se les evaluó: el porcentaje de contenido de humedad a 0 y 20 días de incubación por método de pérdida por secado a 103°C por 72 horas y el grado de infección del grano (propágulos/g) a 20 días, por método de dilución en agua agar 0.12 %, previa desinfección superficial del grano de prueba. Se sembró en placas de agar Czapek por método de vaciado (Moreno, 1984; 1996) y se incubó a 28°C por 72 horas. Al finalizar, se esterilizaron todos los frascos con los granos tratados a 121°C por 3 minutos con calor húmedo y se dejó enfriar lentamente el autoclave.

Los granos se extendieron en charolas de unicel para secarlos al sol y se guardaron en bolsas de papel y plástico en refrigeración (2 a 4°C) hasta la evaluación de la producción de aflatoxinas.

Se evaluó la producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* Link en las muestras de prueba a 20 días de incubación en las condiciones de almacenamiento por método de Aflatest (Vicam LP).

III.9. Análisis de resultados.

La estandarización del inóculo de *Aspergillus flavus* Link se analizó por prueba de t de Student, se estableció el intervalo de confianza 95 % y el coeficiente de variación del método. Las diferencias en la actividad antifúngica de los tratamientos en la prueba de selección, se sometió a una Análisis de Varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) seguida de comparación de medias Tukey. La actividad fungicida o fungistática se analizó por prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El establecimiento de concentración mínima fungicida y las prueba de protección en almacén se analizaron por Análisis de Varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$) seguida de comparación de medias Tukey con el programa SIANEXHF.EXE (Huerta y Flores, 1997) y en paquete de diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las especies vegetales recolectadas, la parte de la planta utilizada, la fecha de recolección, su registro de herbario y la localización se muestran en el Cuadro 5.

Al estandarizar el inóculo de *Aspergillus flavus* Link se comprobó que el método de comparación visual turbidimétrico es un buen procedimiento para obtener suspensiones cuantitativas de *A. flavus* con resultados reproducibles (Cuadro 6).

Con la aplicación de la prueba de t de Student para diferencia de medias se determinó que la media del número de conidios/mL del inóculo es estadísticamente igual al valor esperado ($p < 0.05$).

Se estableció que el mejor tiempo de incubación del inóculo para obtener un desarrollo homogéneo fue de 72 horas a 28°C.

IV.1. Evaluación de la Actividad Antifúngica.

En la prueba de selección de extractos activos, se obtuvieron los siguientes resultados: los extractos obtenidos por infusión acuosa no manifestaron actividad antifúngica, al igual que los controles negativos de agua destilada o etanol y los extractos de *Citrus medica* L., mientras que los extractos etanólicos de las muestras vegetales que manifestaron actividad antifúngica se muestran en el Cuadro 7.

Para realizar la prueba de hipótesis a través del estudio de la variación, se eliminaron 21 tratamientos ya que no produjeron efecto antifúngico, con lo que quedaron únicamente 11 extractos vegetales a analizar (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Actividad antifúngica ($\alpha=0.05$).

F.V.	G.L	S.C.	C.M.	F cal	P>F
Tratamientos	11	18.2619	1.66017	45.0731	2.08
Error	48	1.76797	0.0368328		
Total	59	20.0298			

Cuadro 5. Plantas de la familia Rutaceae recolectadas en el estado de San Luis Potosí.

Planta	Muestra de estudio	Fecha de recolección	Registro de herbario ^a	Localización
<i>Helietta parvifolia</i> (Gray) Benth	Ramillas	16-I-96		Aguaje de los García, Guadalcázar, SLP
	Ramillas con flor	16-IX-96	SLPM 26255 No.2	
	Ramillas	16-I-96 30-I-97		1 Km entronque a Guadalcázar, SLP- Matehuala, Guadalcázar, SLP
<i>Ptelea trifoliata</i> L.	Ramillas con fruto	3-IX-96	SLPM 26267 No.4	La lagunita del Tule. Poniente del Aguaje de los García, Guadalcázar, SLP
<i>Casimiroa pringlei</i> (Wats) Engl.	Ramillas	16-I-96		Aguaje de los García, Guadalcázar, SLP
	Ramillas con flor	22-IV-96	SLPM 26256 No. 3	
<i>Citrus limonia</i> Osbeck	Ramillas	11-VIII-96		
	Ramillas con flor	1-IV-96	SLPM 26269 No. 5	San Luis Potosí, SLP
	Fruto inmaduro	11-VIII-96		
	Fruto maduro	11-VIII-96		
<i>Citrus aurantium</i> L.	Ramillas	23-VII-96		
	Ramillas con flor	21-III-97	SLPM 26270 No. 6	Ebano, SLP
	Fruto inmaduro	23-VII-96		
	Fruto maduro	20-I-96		
<i>Citrus medica</i> L.	Ramillas	16-I-96,		
	Ramillas con flor	8-III-96	SLPM 26244 No. 1	Aguaje de los García, Guadalcázar, SLP
	Fruto inmaduro	16-I-96 3-IX-96		

^a Herbario del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, UASLP.

Cuadro 6. Estandarización del inóculo de *Aspergillus flavus* Link, (+) carta de Wickerham
API 20 C (1 x 10⁶ conidios/mL).

Repeticiones	** Conidios/mL	% de las Observaciones
4, 10, 17	700 000	15
2, 7	800 000	10
1, 12, 13, 19, 20	900 000	25
3, 11, 14	1 000 000	15
5, 6, 8, 9, 16	1 100 000	25
15, 18	1 200 000	10

** I.C. 100(1 - 0.05) = 879 880 a 1 031 000 conidios/ mL

C.V. = 16.8 %, media = 955 000 ± 160 500 conidios/mL

Cuadro 7. Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de rutáceas. Prueba de selección de extractos activos (100 µL= 50 mg.).

Especie	Parte de planta (Extracto etanólico)	Halo de inhibición (cm)	
		Rango	Media ¶
<i>Casimiroa pringlei</i>	Ramillas	1.5 - 1.9	1.68 bcd
	Ramillas con flor	2.3 - 2.8	2.56 a
<i>Helietta parvifolia</i>	Ramillas	1.7 - 2.0	1.86 b
	Ramillas con flor	1.3 - 1.9	1.60 bcde
<i>Ptelea trifoliata</i>	Ramillas	1.5 - 2.2	1.84 b
	Ramillas con fruto	1.6 - 2.0	1.80 bc
<i>Citrus limonia</i>	Ramillas	1.2 - 1.6	1.36 de
	Ramillas con flor	1.2 - 1.4	1.26 e
	Fruto inmaduro	1.0 - 1.6	1.34 de
	Fruto maduro	1.1 - 1.5	1.22 e
<i>Citrus aurantium</i>	Fruto inmaduro	1.2 - 1.5	1.40 cde
Control negativo	Etanol	0.0	0.00 f

¶ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$, Tukey=0.4180).

C.V. = 12.78 %.

Para encontrar a cual o cuales de los tratamientos se debe la diferencia significativa, se procedió a realizar la prueba de comparación de medias que en este caso corresponde a la prueba de rango múltiple de Tukey (Cuadro 7) donde se formaron 5 grupos de medias de tratamientos. El grupo de mayor respuesta tiene medias desde 2.3 hasta 2.8 cm de inhibición de desarrollo. El grupo de plantas que ocasionan el menor halo de inhibición de desarrollo, tienen medias que van desde 1.0 a 1.5 cm de inhibición de desarrollo.

En base a las comparaciones de medias de Tukey, los mejores tratamientos fueron los extractos etanólicos de: las ramillas con flor y ramillas de *Casimiroa pringlei*, de las ramillas y ramillas con flor de *Helietta parvifolia* y de las ramillas y ramillas con fruto de *Ptelea trifoliata*.

Cabe hacer mención que de las especies de rutáceas evaluadas: *Citrus limonia*, *Citrus aurantium*, *Ptelea trifoliata* y *Casimiroa pringlei*, no se tienen antecedentes de actividad antifúngica en *Aspergillus flavus*.

IV.2. Actividad Fungicida o Fungistática.

Con la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo que hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$). Los extractos etanólicos que manifestaron actividad fungicida para 1 mL de extracto (500 mg) de prueba fueron: *Citrus limonia* Osbeck (fruto inmaduro y fruto maduro), *Ptelea trifoliata* L. (ramillas) y *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl. (ramillas con flor).

Los extractos etanólicos que manifestaron actividad fungistática para 1 mL de extracto (500 mg) de prueba fueron: *Citrus limonia* Osbeck (ramillas y ramillas con flor), *Helietta parvifolia* (Gray) Benth. (ramillas y ramillas con flor), *Citrus aurantium* L. (fruto inmaduro), *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl. (ramillas) y *Ptelea trifoliata* L. (ramillas con fruto).

IV.3. Concentración Mínima Fungicida contra *A. flavus* Link.

Los extractos etanólicos de las rutáceas que manifestaron actividad fungicida parcial a la máxima cantidad de extracto ensayado fueron: ramillas con flor de *Helietta parvifolia*, ramillas de *Casimiroa pringlei* y los de las ramillas y ramillas con flor de *Citrus limonia*.

Para realizar la prueba de hipótesis a través del estudio de la variación se eliminaron los extractos que no manifestaron actividad fungicida total por lo cual quedan siete extractos al analizar (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Concentración Mínima Fungicida ($\alpha=0.05$).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal	Prob>F
Tratamientos	6	2.625	0.4375	44413.53	0.0000
Error	14	1.387E-17	9.91E-19		
Totales	20	2.625			

Para establecer a cual o cuales extractos se debe la diferencia significativa, se realizó prueba de comparación de medias de Tukey, con lo cual se forman cuatro grupos y en base a los resultados obtenidos, las menores concentraciones mínimas fungicidas (CMF) se obtuvieron con los frutos inmaduros y maduros de *Citrus limonia* Osbeck y las ramillas con flor de *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl. La cantidad máxima ensayada fue de 3 mL de extracto etanólico equivalente a 1.5 g de planta (Cuadro 10).

IV.4. Prueba de Protección de Grano de Maíz en Almacén.

Se realizó la prueba de protección del grano de maíz cacahuazintle en almacén con los extractos etanólicos a CMF y 2CMF de los frutos inmaduros y maduros de *Citrus limonia* Osbeck y las ramillas con flor de *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl., frente a blanco sin tratamiento y control positivo (Daconil a 750 ppm activo) con 20 días de almacenamiento a 26°C y con una humedad relativa de 85%. Todos los granos tratados conservaron el contenido de humedad aproximado de 18% en el periodo de almacenamiento.

En los resultados obtenidos a 20 días de almacenamiento se puede observar que existe diferencia significativa con los tratamiento tanto en la evaluación de protección a la infección (propágulos/g) por el hongo como en la producción de aflatoxinas (Cuadros 11 y 12).

Cuadro 10. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) de extractos de rutáceas en *Aspergillus flavus* Link.

Extracto etanólico	CMF (mg/mL) ¶	Planta seca (mg)
<i>Citrus limonia</i> Osbeck		
Fruto inmaduro	125 a	500
Fruto maduro	250 b	1000
<i>Casimiroa pringlei</i> (Wats) Engl.		
Ramillas con flor	312.5 c	1250
<i>Citrus aurantium</i> L.		
Fruto inmaduro	375 d	1500
<i>Ptelea trifoliata</i> L.		
Ramillas	375 d	1500
Ramillas con fruto	375 d	1500
<i>Helietta parvifolia</i> (Gray) Benth		
Ramillas	375 d	1500

¶ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$, Tukey=0.0014).

Cuadro 11. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Propágulos/g a 20 días de almacenamiento ($\alpha=0.05$).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal.	F 0.05
Tratamientos	7	7.58624E+10	1.08375E+10	5.90	2.66
Error	16	2.94E+10	1.8375E+9		
Total	23	1.05262E+11			

Cuadro 12. Análisis de Varianza (ANOVA) Completamente al azar. Aflatoxinas $\mu\text{g/kg}$ a 20 días de almacenamiento ($\alpha=0.05$).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F cal.	F 0.05
Tratamientos	7	358486	51212.3	14.08	2.66
Error	16	58207.7	3637.98		
Total	23	416694			

Para determinar a cual o cuales tratamientos se debe esta diferencia significativa, se realizó prueba de comparación de medias de rango múltiple de Tukey, en el cual se formaron dos grupos y uno de ellos es el blanco sin tratamiento y el segundo corresponde a todos los tratamientos evaluados y al control positivo de daconil los cuales manifiestan protección a la infección y en la producción de aflatoxinas.

En el análisis de los resultados obtenidos a 20 días de almacenamiento se observó que los extractos etanólicos de los frutos inmaduros y maduros de *Citrus limonia* Osbeck y las ramillas con flor de *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl., presentan actividad protectora del grano a la infección por *Aspergillus flavus* Link a los 20 días de almacén, tanto a concentración mínima fungicida como a dos veces esta cantidad y se observó que con los extractos vegetales evaluados se inhibe la producción de aflatoxinas en las condiciones de almacenamiento a 20 días de almacén (Cuadro 13).

Cuadro 13. Prueba de protección de maíz cacahuazintle a la infección por *A. flavus* Link (10 000 propágulos), 20 días de almacén a 26 °C.

Muestra	Extracto etanólico 500 mg/mL	Cantidad mg	¶ Grado de infección media de Propágulos/g	¶¶ Aflatoxinas µg/kg media
<i>Casimiroa pringlei</i>				
Ramillas con flor	2.5	1250	0 b	0 b
	5.0	2500	0 b	0 b
<i>Citrus limonia</i>				
Fruto inmaduro	1.0	500	0 b	0.33 b
	2.0	1000	0 b	1.0 b
<i>Citrus limonia</i>				
Fruto maduro	2.0	1000	0 b	0.33 b
	4.0	2000	0 b	0.66 b
Daconil (Clorotalonil 75%)	0	160	0 b	0.33 b
Blanco	0	0	170 000 a	370 a

¶ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$, Tukey=121268.8125).

¶¶ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$, Tukey=170.6355).

V. CONCLUSIONES.

Con el método de comparación visual turbidimétrico se obtienen suspensiones cuantitativas de *Aspergillus flavus* Link con resultados reproducibles.

Las rutáceas que manifestaron la mayor actividad antifúngica son: *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl., *Citrus limonia* Osbeck, *Ptelea trifoliata* L., *Helietta parvifolia* (Gray) Benth. y *Citrus aurantium* L.

Los mejores resultados de Concentración Mínima Fungicida se obtuvieron con los frutos inmaduros y maduros de *Citrus limonia* Osbeck y las ramillas con flor de *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl.

Los extractos etanólicos de frutos inmaduros y maduros de *Citrus limonia* Osbeck y las ramillas con flor de *Casimiroa pringlei* (Wats) Engl., manifiestan actividad protectora del maíz cacahuazintle a la infección por *A. flavus* Link, a los 20 días de almacenamiento por lo que inhiben la producción de Aflatoxinas.

Los resultados aquí obtenidos sugieren la posibilidad del uso de alguno de estos extractos en el control del desarrollo del hongo *A. flavus*, ya que los estudios hasta ahora muestran que la propiedad antifúngica de los metabolitos secundarios de las plantas es un fenómeno frecuente y es conveniente determinar su espectro de acción; los avances logrados permiten suponer que existen altas perspectivas para que se puedan utilizar este tipo de extractos para el control de *A. flavus*.

La rica flora mexicana es una gran fuente de estudios para conocer sustancias de importancia comercial con posibilidades de ser sintetizadas, como lo han sido los piretroides o rotenonas en los insecticidas, lo cual es de suma importancia para llegar a su utilización práctica en la agricultura, ya sea al suelo, al follaje o en las semillas almacenadas para siembra, sin olvidar los estudios de toxicidad para que puedan ser utilizados en la protección de semillas para consumo de animales domésticos y del hombre.

La aplicación de extractos vegetales es una opción de carácter ecológico y pueden ser incorporados como un componente más de un sistema de manejo integral de plagas.

VI. RECOMENDACIONES

La etapa siguiente de este trabajo será el establecimiento del grupo químico al que pertenece el principio activo responsable de la actividad fungicida y posteriormente, en forma interdisciplinaria, buscar la aplicación de estos fungicidas en la protección de granos almacenados.

VII. LITERATURA CITADA.

- Alba, F. J., C. Tovar, N. Villegas, L. Herrera y R. Silva. 1991. Estudio preliminar de la actividad antifúngica de *Beschorneria yuccoides* sobre tres dermatofitos. *In: Memorias del IV Congreso Nacional de Micología*. 14 a 18 de octubre, Tlaxcala, Tlax., México. p 46.
- Barragan R., S., M. G. Alvarez O. y A. Zavalza S. 1994. Valoración *in vitro* de la actividad antimicótica frente a hongos patógenos para el hombre de la *Larrea tridentata*. *In: Memorias del V Congreso Nacional de Micología*. 27 a 30 de noviembre, Guanajuato, Gto., México. p 17.
- Beti, J.A., T.W. Phillips and E. B. Smalloy. 1995. Effects of maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. *Journal of economic entomology* 88 (6): 1776 – 1782.
- Bonifáz, A. y A. García-Legorreta. 1990. Estudio de la actividad *in vitro* de Saperconazol (R 66 905) frente a hongos patógenos y oportunistas. *Dermatología* 38: 261 – 266.
- Cáceres, A., B. R. López, M. A. Girón y H. Logemann. 1991. Actividad antimicótica de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de Dermatofitos. *Revista Mexicana de Micología* 7: 21 - 38.
- Carvajal, M. 1994. Investigación de las micotoxinas en Latinoamérica y en México. *In: Memorias del V Congreso Nacional de Micología*. 27 - 30 de noviembre, Guanajuato, Gto., México. p s-50.
- CICOPLAFEST. 1994. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. SARH, SDS, SS y SECOFI. México, D.F. pp 14 – 42.
- Cornejo G., M. del R., E. Moreno G., L. Valle A. y A. Zavalza S. 1997. Estudio de la actividad antimicótica *in vitro* de los metabolitos secundarios aislados y caracterizados químicamente de *Larrea tridentata*. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 83 p.
- Corticchiato, M., A. Bernardini, J. Costa, Ch. Bayet, A. Saunois and B. Voirin. 1995. *Phytochemistry* 40: 115 - 120.

- Cruz, C.V. y R. Montes B. 1993. Estudio fitoquímico de plantas antifúngicas y su espectro de acción. *In*: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica 3 - 8 de octubre, Mérida, Yuc., México. p 73.
- DGSV. 1994 a. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola. Secretaría de Agricultura. México. pp 535 - 547.
- DGSV. 1994 b. Catálogo oficial de plaguicidas. Secretaría de Agricultura. pp 247.
- Domínguez, X. A. 1985. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa S.A. de C.V. México, D.F. 281 p.
- Domínguez, X. A. and A. Merijanian. 1980. Constituents of the petroleum ether extract of *Helietta parvifolia* (A. Gray). *Revista Latinoamericana de Química* 11: 115 - 116
- Domínguez, X. A., R. Franco, G. Cano, M. S. Castillo y C. Gutiérrez M. 1980 a. Terpenoides de la "escobilla" *Fraxinus greggi* (Oleaceae) y Heliettina de la raíz. *Revista Latinoamericana de Química* 11: 116 - 117.
- Domínguez, X. A., R. Franco, G. Cano C. y N. Chávez C. 1980 b. Aislamiento de 3,6,6'-trimetoxi - 5,7- dioxiflavona en el Chapuliztle (*Dodoneae viscosa*) var. *angustifolia* Jacq. familia Sapindaceae. *Revista Latinoamericana de Química* 11: 150 - 151.
- Dreyer, D. L. and B. C. Cambell. 1986. Chemical basis of Host-plant resistance to sap-feeding insect. *Revista Latinoamericana de Química* 17/3-4: 204 - 207
- Ellis, D.H. 1994. Clinical mycology. Pfizer Inc. New York. pp: 70 - 78.
- Espinosa G., F. J. y R. Vázquez B. 1994. Patrones de incidencia de hongos en semillas de arvenses a través de 253 días de permanencia en un suelo agrícola. *In*: Memorias del V Congreso Nacional de Micología. 27 a 30 de noviembre, Guanajuato, Gto., México. p 149.
- Evans, J. S., E. Pattinson and P. Morris. 1986. Antimicrobial Agents from plant cell cultures. *In*: Secondary Metabolism in plant cell cultures. Morris, P.A., H. Scragg, A. Stafford and M. W. Fowler. Cambridge University Press. pp 47 - 52.
- Ferrera-Cerrato, R., C. González Ch., M. L. Vega S. y M. E. Sánchez. 1994. Bacterias antibióticas contra *Fusarium oxysporum* F sp *melonis*. *In*: Memorias del V Congreso Nacional de Micología. 27 a 39 de octubre, Guanajuato, Gto., México. p 90.

- Frey, D., R. Jowett O. and R. C. Briger. 1985. A colour Atlas of Phathogenic Fungi. Ed. Wolfe Medical Publications Lts. pp 59 - 60.
- García A., G. y R. Martínez F. 1991. Mohos y micotoxinas en grano de sorgo dulce. *In*: Memorias del IV Congreso Nacional de Micología. 14 - 18 de octubre, Tlaxcala, Tlax., México. p. 159.
- García A., G. y R. Martínez F. 1993. Mohos en lotes de granos de sorgo: implicaciones económicas. *In*: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica. 3 - 8 de octubre, Mérida, Yuc., México. p 104.
- García S., C., A. L. Anaya, P. Sánchez y R. Mata. 1995. Potencial aleloquímico de *Stauranthus perforatus* (Rutaceac). *In*: Memorias del XIII Congreso Mexicano de Botánica. 5 - 11 de noviembre, Cuernavaca Mor., México. p 115.
- Gómez, F. 1995. El papel del fitomejorador en Poscosecha. *In*: El sistema poscosecha de granos en el nivel rural: problemática y propuesta. (ed.) Ernesto Moreno M , Felipe Torres e Isabel Chong. Ed. Programa Universitario de alimentos (PUAL). UNAM. pp 339 - 348.
- González, A. U. 1995. El maíz y su conservación. Editorial Trillas. 399 p.
- Grauc W., B. y M. Rovalo M. 1982. Potencial alelopático y microbicida de *Helietta parvifolia*. *Biótica* 7 (3): 405 - 416.
- Huerta D., J. y J. A. Flores R. 1997. Sistema para Análisis de Experimentos. SIANEXHF.EXE. *In*: Memorias del 5 th meeting of the international biometric society Network for Central America, the Caribbean, México, Colombia and Venezuela. 3 al 9 de octubre, Xalapa Ver. pp 345 - 353.
- Hurtado, L., R. Hernández, F. Hernández, and S. Fernández. 1979. Fungi - Toxic compound in the Larrea resin. *In*: Larrea. (ed.) Campos L., E., T. J. Mabry and S. Fernández T. Ed Centro de Investigacion en Química Aplicada, (CIQA). Saltillo, Coah., México. pp 5 - 29.
- INEGI. 1995 a. Anuario estadístico del estado de San Luis Potosí. Gobierno del estado. San Luis Potosí, S.L.P. México. 52.
- INEGI. 1995 b. Boletín de Información oportuna del sector alimentario. BIOSA. 115: 15 - 21.

- Jullien, F., B. Voirin, J. Bernillon and J. F. Bonvin. 1984. Highly oxygenated flavonoids from *Mentha piperita*. *Phytochemistry* 2 (12): 2972 - 2973.
- Koneman, E. V., S. D. Allen, V. R. Dowell, W. M. Janda, H. M. Sommers y W. C. Winn. Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana S.A. México, D.F. 909 p.
- Lagunes T., A. 1994. Extractos, polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas de maíz y frijol en la agricultura de subsistencia. (ed.) Sáenz C., A. Colegio de postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 32 p.
- Lindbland, C. y L. Druben. 1981. Almacenamiento de granos, manejo, secado, silos, control de insectos y roedores. Ed. Concepto S.A. México, D.F. 331 p.
- López S., C., M. A. Rodríguez M., C. Arias C. y M. L. Villarreal O. 1993. Cultivo *in vitro* (raíces) de *Solanum chrysotrichum* para la producción de compuestos con actividad antimicótica. *In: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica*. 3 a 8 de octubre, Mérida, Yuc., México. p 151.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. 1200 p.
- Mejía, G., W. Brito y N. Novelo. 1993. Análisis Fitoquímico preliminar de las partes aéreas de *Solanum tridynamum* Dunal. *In: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica*. 3 a 8 de octubre, Mérida, Yuc., México. p 171.
- Mendieta, R. M. y S. del Amo R. 1981. Plantas medicinales del estado de Yucatán. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V.. México. pp 82, 83, 102 -105, 294, 352 y 353.
- Montes B., R. 1991. Hongos patógenos del frijol en Oaxaca y su control con extractos vegetales. *In: Memorias del IV Congreso Nacional de Micología*, 14 - 18 de octubre, Tlaxcala, Tlax., México. p 83.
- Montes B., R. 1994. Plantas antifúngicas y sus posibilidades de uso en agricultura. *In: Memorias del V Congreso Nacional de Micología*. 27 - 30 de noviembre, Guanajuato, Gto., México. p s-29.
- Montes B., R. 1996. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 16 (1): 9 - 14.

- Montes B., R. y R. Figueroa B. 1995. K. Bermúdez T. y A. Jiménez P. (ed). Biocontrol de hongos en granos almacenados. Plantas: biotecnología, agronomía, nutrición. Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas del IPN. México. pp 26 – 30.
- Montes B., R., M. Carvajal y R. Figueroa B. 1997. Polvos, extractos acuosos y hexánicos de plantas para el combate de *Aspergillus flavus* Link en maíz. Revista Mexicana de Fitopatología 15 (1).
- Moreno M., E. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Instituto de Biología. UNAM. México. 383 p.
- Moreno M., E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos almacenados. UNAM. México. 190 p.
- Moreno M., E. 1991. La investigación en postcosecha de granos y semillas. *In: Memorias de la II Reunión Nacional sobre la Problemática de Postcosecha de Granos y Semillas*, A. C. Ramírez M., M. (ed). Programa Universitario de Alimentos. UNAM. 19- 20 de octubre, Celaya, Gto., México. pp 1 - 4.
- Moreno M., E. y M. Gil G. 1991. La Biología de *Aspergillus flavus* y la Producción de Aflatoxinas. UNAM. México. 42 p.
- Moreno M., E., R. A. Rivera y F. Cruz G. 1991. Estudio sobre la fitotoxicidad de fungicidas en el tratamiento de la semillas de trigo. *In: Memorias del IV Congreso Nacional de Micología*. 14 – 18 de octubre, Tlaxcala, Tlax., México. p 81.
- Moreno M., E. 1995. Almacenamiento y Conservación de Granos en el medio Rural. *In: El sistema poscosecha de granos en el nivel rural: problemaática y propuesta*. ed. Ernesto Moreno M , Felipe Torres e Isabel Chong. Ed. Programa Universitario de alimentos (PUAL). UNAM. pp 247 – 261.
- Moreno, M., E. 1996. La humedad: su importancia en la conservación de los granos y semillas. *In: Curso teórico. Almacenamiento y conservación de granos y semillas*. Programa Universitario de Alimentos (PUAL). UNAM. pp 44 – 71.
- Moreno V., O. y V. M. Loyola V. 1993. Efecto de inductores bióticos y abióticos sobre la producción de alcaloides indólicos en raíces transformadas de *C. roseus*. *In: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica*. 3 a 8 de octubre, Mérida, Yuc., México. p 183.
- Naturaleza. 1982. Un gorgojo en lugar de hervicidas. Revista Naturaleza 3: 137 – 138 México.

- Olivares S., E. 1994. Paquete de Diseños Experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Ospina, J. E., 1995. Secado y Almacenamiento de granos en zonas rurales y centros de acopio en Colombia. *In: El sistema poscosecha de granos en el nivel rural: problemática y propuesta.* ed. Ernesto Moreno M., Felipe Torres e Isabel Chong. Ed. Programa Universitario de Alimentos (PUAL). UNAM. pp 283 - 306.
- Pardavé D., L. M. 1994. La susceptibilidad del maíz y frijol almacenados al ataque de hongos en el municipio de Jesús María, Aguascalientes. *In: Memorias de V Congreso Nacional de Micología.* 27 - 30 de noviembre, Guanajuato, Gto., México. p 85.
- Pinkas, J., D. Lavie and M. Chorin. 1968. Fungistatic constituents in citrus varieties resistant to the mal-secco disease. *Phytochemistry* 7: 169 - 171.
- Pixton, S. W. 1982. The importance of moisture and equilibrium relative humidity in stored products. *Tropical Stored Products Information.* 43: 16 - 29.
- Ramírez M., M. 1981. Insectos y almacenamiento de granos. *Naturaleza*, 12 (2). 92 - 102 México.
- Ramírez V., E. G. 1995. Aflatoxinas: metodología analítica y sus efectos en la salud. *Revista de la Sociedad de Química de México.* 1: 48 - 50.
- Reiche, C. 1963. Flora Excursoria en el Valle Central de México. Ed. Politécnica. México. p 84.
- Rodríguez, E. 1977. Sesquiterpenlactonas chemotaxonomy, biological activity and isolation. *Revista Latinoamericana de Química* 8: 56 - 62.
- Roque, N. F., T. L. Giannella, A. M. Giesbrecht and R. de C. Barbosa. 1987. Kaurene diterpenes from *Wedelia paludosa*. *Revista Latinoamericana de Química.* 18 (3): 110 - 111.
- Rosiles M., R. 1996. Aflatoxinas. *In: Memorias del curso de actualización sobre: Plaguicidas y Micotoxinas.* UNAM. 24 a 26 de junio, México, D.F. pp 1 - 37.
- Rovalo M., M. B. Graue W., M. E. González, L. González, D. B. Rojas, M. L. Covarrubias y E. Magallanes. 1983. La barreta o barreto, *Helietta parvifolia*, recurso vegetal desaprovechado del semidesierto del norte de México. Instituto Nacional de investigaciones sobre recursos bióticos. Xalapa, Ver., México. 11: 19 p.

- Sabillón, A. y M. Bustamante. 1996. Guía Fotográfica para la Identificación de Plantas con Propiedades Plaguicidas. Zamorano Academic Press. Honduras. 110 p.
- SAGAR. 1995. Reporte año agrícola 1995. Avances al 15 de diciembre.
- SARH. 1980. Principales plagas de granos almacenados. Dirección General de Sanidad Vegetal. México. 74 p.
- Schneider, K. (Ed.). 1995 a. Recomendaciones para almacenamiento (problemas y manejo). Programa Regional de Postcosecha. Cooperación Suiza al desarrollo. Managua, Nicaragua. 14 p.
- Schneider, K. (Ed.). 1995 b. Secamiento de los granos, su importancia y las prácticas comunes. Programa Regional de Postcosecha. Cooperación Suiza al desarrollo. Managua, Nicaragua. 14 p.
- Schneider, K. (Ed.). 1995 c. Microorganismos, su importancia y su control. Programa Regional de Postcosecha. Cooperación Suiza al desarrollo. Managua, Nicaragua. 13p.
- Schneider, K. (Ed.). 1995 d. Micotoxinas, peligros ocultos en los alimentos. Programa Regional de Postcosecha. Cooperación Suiza al desarrollo. Managua, Nicaragua. 8p.
- Sifuentes A., J.A. 1977. Plagas de los granos almacenados y su control. Instituto de Investigaciones Agrícolas. SARH. México. 68: 25 p.
- Sulciman, Al-K., A. Masalmeh, S. Abdalla, H. Tosa and M. Ilnuma. 1995. N-arachidylanthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. Journal of Natural products. 58 (5): 760 – 763.
- Trease, E. y E. Ch. Evans. 1987. Tratado de Farmacognosia. Ed. Interamericana. México. pp 207 - 209.
- Vargas P., O. y A. Rodríguez C. 1993. Nuevos registros de *Solanum* (Solanaceae) en Jalisco. In: Memorias del XII Congreso Mexicano de Botánica. 3 a 8 de octubre, Mérida, Yuc., México. p 262.
- Willis, T. J. 1973. A dictionary of the flowering plants and ferns. 8ª ed. Cambridge at the University Press. pp 1014 - 1015.