

DETERMINACIÓN DE LA MICROFLORA DE “*Zea mays*” EN ALMACENAMIENTO, PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE SENSIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS FRENTE A LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA DE CANELA “*cinnamomum zeylanicum*” Y CAPULLOS DE CLAVO DE OLOR “*sizygium aromaticum*”.

**JEIMMY ESNEIDER BONIVENTO RODRIGUEZ
LICET MERLANO MONTENEGRO
EGLET SUSANA TRESPALACIOS AGUAS**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SINCELEJO
2008**

DETERMINACIÓN DE LA MICROFLORA DE “*Zea mays*” EN ALMACENAMIENTO, PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE SENSIBILIDAD DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS FRENTE A LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA DE CANELA “*cinnamomum zeylanicum*” Y CAPULLOS DE CLAVO DE OLOR “*sizygium aromaticum*”.

JEIMMY ESNEIDER BONIVENTO RODRIGUEZ

LICET MERLANO MONTENEGRO

EGLET SUSANA TRESPALACIOS AGUAS

Trabajo presentado como requisito para optar el título de Biólogo con Énfasis en Biotecnología

Directora

RITA LUZ MÁRQUEZ VIZCAÍNO

MsC. Biología con énfasis en Fitoquímica

Codirector

CARLOS GÓMEZ SANTIZ

Microbiólogo.

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA

SINCELEJO

2008

Nota de Aceptacion

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Sincelejo, Mayo 15 de 2008.

Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y las conclusiones anotadas son de única y exclusiva responsabilidad de los autores y no comprometen en nada a la Universidad de Sucre (artículo 12 del reglamento de trabajo de grado).

DEDICATORIA

- *A DIOS fuente de toda sabiduría e inteligencia, a El sea toda gloria, alabanza, poder y honra, por haberme dado la oportunidad de ver mis sueños hechos realidad.*
- *A mi madre, Zaida Leonor Rodríguez Hernández, por ser el soporte material, espiritual y moral en todo tiempo.*
- *A mis hermanas Libnazaret y Jerusalen Betancourt Rodríguez, las cuales fueron para mí La inspiración de no estar sola.*
- *A mi familia, quienes me motivaron a seguir siempre adelante.*

JEIMMY ESNEIDER BONIVENTO RODRÍGUEZ

DEDICATORIA

- *A DIOS que es mi máxima guía.*
- *A mis padres Bertha Montenegro y Raymundo Merlano por toda sus enseñanzas y buenos consejos.*
 - *A mis hermanos LÍbia, Raymundo, Lorena, Francisco y Sandra.*
- *A mi esposo, Alejandro Mendoza y mis hijos Maria y Carlos por haberme ayudado y tenido paciencia durante este tiempo.*
- *Una dedicat3ria muy especial a Hernán Pérez ya fallecido, por haberme alentado en momentos de debilidad, ayudarme a entrar en La Universidad de Sucre, motivarme siempre, desde donde este le estar3 siempre agradecida por creer en m3.*

LICET MERLANO MONTENEGRO

DEDICATORIA

- *A DIOS por ser mi guía y alimento espiritual, así como por regalarme vida, salud, la oportunidad de estudiar y alcanzar los logros de este trabajo.*
- *A mis padres Carmen Aguas y Héctor Trespalacios, porque gracias a ellos existo, así como por su cariño y educación que me han dado con mucho esfuerzo y esmero.*
- *A mi hermana Carmen por ser mi soporte económico durante toda la carrera.*
 - *A mis demás hermanas Sandra, Vilma y Yudis por apoyarme y aconsejarme.*
- *A mis sobrinos Hector Javier y Andrés Miguel de Jesus por abrir un nuevo episodio en mi vida "ser tia".*

EGLÉT SUSANA TRESPALACIOS AGUAS

AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta investigación expresamos de esta forma nuestros más sinceros agradecimientos al haber cumplido con las metas propuestas, a:

Dios ser supremo que rige nuestras vidas, guía y alimento espiritual, por darnos la oportunidad de estudiar y realizar este trabajo.

Nuestros padres por ser los primeros profesores en la escuela de la vida y demás familiares por su apoyo y confianza depositada.

La Universidad de Sucre nuestra alma "**mater**" por acogernos y brindarnos la oportunidad de cumplir nuestro anhelo de ser profesionales.

Todos los profesores que nos impartieron sus conocimientos durante todas las etapas de la vida estudiantil.

Nuestra directora de Tesis, **Dra. Rita Luz Márquez Vizcaíno** por aportarnos los conocimientos, guía, así como sus consejos y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

Nuestro codirector de tesis Microbiólogo **Carlos Gómez Santiz**, por los conocimientos aportados, su excelente personalidad y su apoyo incondicional para llevar a cabo este estudio.

Ingeniero **Antonio Tovar Ortega**, Jefe del centro de Laboratorios de la Universidad de Sucre durante el tiempo de investigación, por brindarnos la disponibilidad de trabajar en el laboratorio de Microbiología.

Arturo Doncel Mestra, Técnico de laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sucre, por su valiosísima colaboración para llevar a cabo este trabajo, así como por su generosidad y grata personalidad.

Los biólogos **Giovanny Montes y Danys Mendoza** por la colaboración prestada en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad de Sucre.

La bióloga **Iris Rocío Payares Díaz**, y los **Drs. Antonio Maria Pérez Herazo**, y **Javier Darío Beltrán Herrera** por su Colaboración en la toma de fotografías necesarias para esta investigación.

Profesor **Santiago Ruiz Pérez**, ex-jefe del Departamento de Biología, por su colaboración en lo necesario durante su jefatura.

Magíster **Juan Manuel Díaz Soto**, actual jefe del departamento de Biología por su colaboración en lo necesario.

Zootecnista **Kevin González Martínez** y profesor **Pedro Martínez**, por su ayuda y asesoría en los análisis estadísticos.

Ingeniero agrícola **Said Márquez Oñate** y la instrumentadora **Saray Romero Romero**, técnicos de laboratorio quienes colaboraron en algunos momentos con la investigación.

Dra. Bárbara Arroyo, Magistra en Microbiología por su colaboración para llevar a cabo esta investigación.

Los profesores **Alexander Pérez Cordero** y **Erick Rauchwerger Rodríguez**, quienes, hicieron aportes valiosos en la estructura de esta investigación, convirtiéndose en la piedra angular de este trabajo.

Dr. **Dagoberto Mulet**, Agrónomo del departamento de agronomía de la Gobernación de Sucre y al Dr. **Jhonny Ebrat** Agrónomo de la Federación Nacional de Cereales. (FENALCE), por las informaciones suministradas para el enriquecimiento de este trabajo.

Nuestro compañero y amigo **Jaime Mercado Ordóñez**, por su ayuda incondicional en todo lo necesario; demás compañeros y amigos de carreras y demás personas que de una u otra forma colaboraron con este trabajo durante el transcurso de la investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
ABSTRACT	
OBJETIVOS	
INTRODUCCIÓN.....	32
2. MARCO TEORICO	35
2.1 GENERALIDADES DE LOS HONGOS	35
2.1.1 Clasificación de los hongos.....	36
2.1.1.1 Ascomycetos.....	36
2.1.1.2 Ficomycetos.....	366
2.1.1.3 Deuteromycetos.....	377
2.1.1.4 Basidiomyceto.....	37
2.1.1.5 Phylum chytridiomycota: quitridiomycetes	37
2.2 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS GÉNEROS TOXIGÉNICOS DE MAYOR PRESENCIA.....	39
2.2.1 Género " <i>Fusarium</i> ".....	39
2.2.2 Género " <i>Aspergillus</i> ".	40
2.2.3 Género " <i>Alternaria</i> ".:.....	42
2.2.4 Género " <i>Penicillium</i> ".	43
2.2.4.1 " <i>Penicillium</i> " monoverticilado	43
2.2.4.2 " <i>Penicillium</i> " biverticilado simétrico.....	44
2.2.4.3 " <i>Penicillium</i> " poliverticilado simétrico.	44
2.2.4.4 " <i>Penicillium</i> " asimétrico.....	44
2.3 CULTIVOS DE HONGOS.	45
2.4 ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN ALMACENAMIENTO	46
2.5 MICOTÓXINAS.....	49
2.5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS MICOTOXINAS MÁS COMUNES	50
2.5.1.1 Ocratoxinas inmunosupresiva	50
2.5.1.2 Fumonisina	50

	Pág.
2.5.1.3 Zearalenona.....	50
2.5.1.4 Tricótesenos	51
2.5.1.5 Vomitoxinas.....	51
2.5.1.6 Aflatoxinas.	51
2.5.2 PRUEBAS PARA DETECTAR MICOTOXINAS.....	52
2.5.2.1 Detección por luz ultravioleta.	52
2.5.2.2 Uso de microcolumnas.....	52
2.5.2.3 Inmunoensayos.....	53
2.5.2.4 Columna de inmutofinidat	53
2.6 ESTUDIOS DE MICOTOXINAS.....	54
2.7 METODOS DE CONTROL DE HONGOS Y SUS TOXINAS.	57
2.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE MICROORGANISMOS FRENTE A COMPUESTOS DETERMINADOS.	60
2.8.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR	60
2.8.1.1 Ensayo mediante cilindro	61
2.8.1.2 Ensayo mediante perforaciones.....	61
2.8.1.3 Ensayo mediante disquitos (sensidisco).	62
2.8.1.4 Método Neo Sensitabs.....	62
2.8.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR	62
2.8.2.1 Ensayo mediante soluciones seriadas	62
2.8.2.2 Ensayo turbidimétrico.....	63
2.8.3 ANTIMICÓTICOS MÁS USADOS A NIVEL COMERCIAL.....	63
2.8.3.1 Anfotericina B y nistatina.....	63
2.8.3.2 Ketoconazol	63
2.8.3.3 Fluconazol.....	64
2.8.3.4 Imidazoles y tiazoles.	64
2.8.3.5 Fluorocitosinas.....	64
2.8.3.6 Griseofulvina.	64
2.8.3.7 Pentamidina	64
2.8.4 FUNGICIDAS DE USO AGRÍCOLA.....	64

	Pág.
2.8.4.1 Benomilo.....	64
2.8.4.2 Bromuro de metilo.....	65
2.8.4.3 Carbendazima.....	65
2.8.4.4 Cloroneb	65
2.8.4.5 Formalina.....	65
2.8.4.6 Miciobutani.....	65
2.8.4.7 Procloraz.....	66
2.8.4.8 Tebuconazol.	66
2.9 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA CANELA (" <i>Cinnamomun zeylanicum</i> "). ...	66
2.9.1 TAXONOMIA	66
2.10 USOS Y APLICACIONES DE LA CANELA (" <i>Cinnamomun zeylanicum</i> "). ..	67
2.10.1 Usos alimenticios.	67
2.10.2 Usos medicinales.....	67
2.10.3 Otros usos de la canela	67
2.11 PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA CANELA (" <i>Cinnamomun zeylanicum</i> ")	68
2.12 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CLAVO DE OLOR (<i>Syzygium aromaticum</i>) / (<i>Eugenia aromática</i>).....	699
2.12.1. Taxonomía.....	69
2.13 USOS Y APLICACIONES DEL CLAVO DE OLOR.....	69
2.13.1 Usos alimenticios	69
2.13.2 Usos medicinales.....	70
2.13.3 OTROS USOS DEL CLAVO DE OLOR.....	70
2.14 PRINCIPIOS ACTIVOS DEL CLAVO DE (OLOR " <i>Syzygium aromaticum</i> ")..	70
2.15 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL MAÍZ (" <i>Zea mays</i> ").....	71
2.15.1 Taxonomía.....	71
2.16 USOS Y APLICACIONES DEL MAIZ (" <i>Zea mays</i> ")	71
2.16.1 Usos alimenticios.	72
2.16.2 Usos medicinales.....	72
2.16.3 Otros usos.....	72
2.17 COMPOSICION QUIMICA DE LAS PARTES DEL GRANO DE DE MAIZ ..	72

	Pág.
2.18 ALGUNAS DE LAS ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN EL MAÍZ (" <i>Zea mays</i> ").	73
2.18.1 Fusariosis	73
2.18.2 Mohos en maíz almacenados	73
2.18.3 Pudrición de semillas y caída de planta	73
2.19 ALGUNAS DE LAS PLAGAS MÁS COMUNES DEL MAÍZ	74
2.19.1 Insectos de los granos en el campo y en el almacenamiento	74
2.19.2 Plagas que atacan semillas en germinación y plántulas:	75
2.19.3 Insectos de la panoja y la mazorca	75
2.19.4 Otros insectos perjudiciales de " <i>Zea mays</i> "	76
3. METODOLOGÍA	77
3.1 SITIO DE MUESTREO O MICROLOCALIZACION.	77
3.2 RECOLECCION, PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE " <i>Zea mays</i> ", EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE RECUENTO EN PLACA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS.	77
3.2.1 Cultivo aislamiento y purificación de hongos	78
3.3 DETECCIÓN DE LAS AFLATOXINAS PRESENTES EN MUESTRAS DE " <i>Zea mays</i> " BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOENSAYO (ELISA).	79
3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR REFLUJO	81
3.4.1. Extracto de la corteza de canela con ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol.	81
3.4.2 Screen Fitoquímico	83
3.4.2.1 Prueba para determinar presencia de alcaloides	83
3.4.2.2 Prueba para determinar presencia de quinonas	83
3.4.2.3 Presencia de Flavonoides	83
3.4.2.4 Presencia de fenoles	84
3.4.2.5 Presencia de taninos	84
3.4.2.6 Presencia de terpenos	84
3.4.2.7 Presencia de Saponinas	84
3.5 Evaluación de la actividad biológica de los extractos en ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol de la corteza de canela y los capullos de clavo de olor a diferentes concentraciones.	84

	Pág.
4 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	93
4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS SEGÚN LA PERSECCIÓN ORGANOLÉPTICA	93
4.2 PRUEBA CHI CUADRADO.....	95
4.3 ANALISIS ESTADISTICO.....	143
5 CONCLUSIONES	15959
6. RECOMENDACIONES	188
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A	171
Anexo B	175
Anexo C	176
Anexo D	179
Anexo E	182
Anexo F	187

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura N° 1 Estructuras microscópicas de los hongos del género "Fusarium sp."	40
Figura N° 2 Estructuras microscópicas de los hongos del género <i>Aspergillus</i>	41
Figura N° 3 "Alternaria arborescens"	42
Figura N° 4 Estructuras microscópicas de los miembros de género "Penicillium sp."	44
Figura N° 5. Clasificación de los " <i>Penicillium sp.</i> " según el número de Verticilos	45
Figura N° 6. Estructura química del aldehído cinámico (3-fenilpropenal), también llamado (3-fenil-acroleína) principal componente de la Canela " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> "	68
Figura N° 7. Estructura del eugenol, uno de los principales compuestos químicos del clavo de olor y canela	70
Figura N° 8. Metodología utilizada para el aislamiento e identificación de hongos presentes en " <i>Zea mays</i> ", a si como el recuento en placa	79
Figura N° 9. (1-9). Detección de las aflatoxinas presentes en " <i>Zea mays</i> " por la técnica de inmunoensayo (ELISA)	81
Figura N°10. Diagrama de obtención de extractos de " <i>C.</i> <i>zeylanicum</i> " y " <i>S. aromaticum</i> "	82
Figura N° 11 a. Forma de aplicación de los extractos de " <i>C.zeylanicum</i> " y " <i>S. aromaticum</i> " (diluciones I, II y control negativo (DMSO) en cajas de petri	86
Figura N°11B. Forma de aplicación de " <i>C. zeylanicum</i> " y " <i>S. aromaticum</i> ". (Diluciones III Y IV) en cajas de petri	86
Figura N°11c. Forma de aplicación del control positivo Griseofulvina en cajas de petri	87
Figura N° 12. Porcentaje de aparición de los hongos de " <i>Zea mays</i> " con respecto a las 39 muestras analizadas	99
Figura N° 13 (a) frecuencia de muestras de " <i>Zea mays</i> " según niveles de aflatoxinas en condiciones normales	116
Figura N° 13 (b) frecuencia de muestras de " <i>Zea mays</i> " según niveles de aflatoxinas en condiciones de humedad	117

	Pág.
Figura N° 14. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ", al 3 día de tratamiento con los diferentes extractos de canela " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> "	129
Figura N° 15. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ", al 3 día de tratamiento con los diferentes extractos de clavo de olor " <i>Sizygium aromaticum</i> ".	129
Figura N° 16. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " al 5 día de tratamiento con los diferentes extractos de canela " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> "	132
Figura N° 17. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " al 5 día de tratamiento con los diferentes extractos de clavo de olor " <i>Sizygium aromaticum</i> "	132
Figura N° 18. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " al 7 día de tratamiento con los diferentes extractos de canela " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ".	135
Figura N° 19. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " al 7 día de tratamiento con los diferentes extractos de " <i>Sizygium aromaticum</i> "	135
Figura N° 20. Comportamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " con los extractos de " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> " y " <i>Sizygium aromaticum</i> " a concentración 30mg/mL; controles (positivo y negativo)	142
Figura N° 21. Medias de inhibición (mm) para canela y clavo de olor con respecto a su utilización como tratamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ". ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	152
Figura N° 22. Medias de inhibición de las soluciones (extractos) utilizadas como tratamientos de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	154
Figura N° 23. Medias de inhibición de las diferentes concentraciones utilizadas como tratamiento de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ". ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	156
Figura N° 24. Medias de inhibición de los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ", al tercer día de tratamiento ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	157

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1 . Cantidades en mg de extracto, volúmenes de DMSO y de extractos requeridos para preparar soluciones Stock y las diluciones de Canela " <i>Cinnamomun zeylamicum</i> "	90
Tabla N° 2. Cantidades en mg de extracto, volúmenes de DMSO y de Extractos requeridos para preparar las soluciones	91
Tabla N° 3. Unidades formadoras de colonias por gramos (ufc/g) encontradas en muestras de maíz en tiendas	94
Tabla N° 4. Unidades formadoras de colonias por gramos (ufc/g) encontradas en muestras de maíz en graneros	94
Tabla N° 5a. CONCENTRACIÓN DE DATOS	95
Tabla N° 5b. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS	97
Tabla N° 5c. ESTADÍSTICOS DE PRUEBA	97
Tabla N° 6. Frecuencias de aparición de hongos encontrados en " <i>Zea mays</i> ".	98
Tabla N° 7. Clasificación taxonómica de los géneros de hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " en almacenamiento	102
Tabla N° 8. Prueba de aflatoxinas en muestras de " <i>Zea mays</i> "	116
Tabla N° 9 screen fitoquímico de " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> " y " <i>Sizygium aromaticum</i> "	121
Tabla N° 10. Tratamientos de (" <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ") frente a los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " (medias de los halos de inhibición en mm al tercer día)	127
Tabla N° 11. Tratamientos de (" <i>Syzygium aromaticum</i> ") frente a los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " (medias de los halos de inhibición en mm al tercer día)	128
Tabla N° 12. Tratamientos de extractos de canela " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> " frente a los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ". (medias en milímetros al 5 día)	130
Tabla N° 13. Tratamientos con extractos de clavo de olor " <i>Sizygium aromaticum</i> " frente a los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> ", (medias en milímetros al 5 día)	131
Tabla N° 14. Medias en milímetros para los 7 hongos aislados de " <i>Zea mays</i> " tratados con los extractos de " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> " al 7 día	133

	Pág.
Tabla N° 15. Medias en milímetros de los 7 hongos aislados de “ <i>Zea mays</i> ” al 7 día de tratamiento con los extractos de clavo de olor “ <i>Sizygium aromaticum</i> ”	134
Tabla N° 16 .Halos de los 7 hongos aislados de “ <i>Zea mays</i> ” con el control positivo griseofulvina al tercer día	138
Tabla N° 17. Porcentaje de inhibición relativo de canela	139
Tabla N° 18. Porcentaje de inhibición relativo de clavo de olor “ <i>Sizygium aromaticum</i> ” a una concentración de 30mg/ml con respecto a la griseofulvina a 1000 mg/mL	140
Tabla N° 19. Diseño factorial de 2x3x4x7 para las pruebas de sensibilidad de de los hongos de <i>Zea mays</i> frente a los extractos de canela “ <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ” y clavo de olor “ <i>Sizygium Aromaticum</i> ”	144
Tabla N° 20. Análisis de la varianza para inhibición (pruebas de sensibilidad) ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	144
Tabla N° 21. Medias por mínimos cuadrados para Inhibicion con Intervalos de confianza de 95 %. ($p < 0.01$)	146
Tabla N° 22 Contraste Múltiple de Rangos para VARIABLE según PLANTA ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	147
Tabla N° 23 Contraste Múltiple de Rangos para VARIABLE según SOLUCIÓN ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	148
Tabla N° 24 Contraste múltiple de rango para VARIABLE según CONCENTRACIÓN ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	150
Tabla N° 25 Contraste múltiple de Rangos para VARIABLE según Hongos ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%	151
Tabla N° 26. Resultados de ucf/g en muestras de harinas comerciales de “ <i>Zea mays</i> ”	183
Tabla N° 27. Normas para interpretar y reportar el recuento estandar en placa	187

LISTA DE FOTOS

	Pág.
Foto N° 1 " <i>Cinnamomum zeylanicum</i> "	66
Foto N° 2 " <i>Syzygium aromaticum</i> "	69
Foto N° 3 " <i>Zea mays</i> "	71
Foto N° 4. Crecimiento de colonias fúngicas en una muestra de " <i>Zea mays</i> " (dilución 10^{-2}).	98
Foto N° 5a " <i>Aspergillus flavus</i> " (macroscópica)	103
Foto N° 5b " <i>Aspergillus flavus</i> " (microscópica)	103
Foto N° 6a " <i>Aspergillus niger</i> " (macroscópica)	103
Foto 6b " <i>Aspergillus niger</i> " (microscópica)	103
Foto N° 7a " <i>Aspergillus versicolor</i> " (macroscópica)	104
Foto N° 7b " <i>Aspergillus versicolor</i> " (microscópica)	104
Foto N° 8a " <i>Aspergillus fumigatus</i> " (macroscópica)	104
Foto N° 8b " <i>Aspergillus fumigatus</i> " (microscópica)	104
Foto N° 9a " <i>Aspergillus terreus</i> " (macroscópica)	105
Foto N° 9b " <i>Aspergillus terreus</i> " (microscópica)	105
Foto N° 10 a " <i>Aspergillus oryzae</i> " (macroscópica)	105
Foto N° 10 b " <i>Aspergillus oryzae</i> " (microscópica)	105
Foto N° 11 a " <i>Aspergillus ocraceus</i> " (macroscópica)	106
Foto N° 11 b " <i>Aspergillus ocraceus</i> " (microscópica)	106
Foto 12 a " <i>Penicillium purpurogenum</i> " (macroscópica)	106
Foto N° 12 b " <i>Penicillium purpurogenum</i> " (microscópica)	106

	Pág.
Foto N° 13 a “ <i>Penicillium sp.</i> (1*)” (macroscópica)	107
Foto N° 13 b “ <i>Penicillium sp.</i> (1*)” (microscópica)	107
Foto N° 14 a “ <i>Penicillium sp.</i> (2*)” (macroscópica)	107
Foto N° 14 b “ <i>Penicillium sp.</i> (2*)” (microscópica)	107
Foto N° 15 a “ <i>Penicillium sp.</i> (3*)” (macroscópica)	108
Foto N° 15 b “ <i>Penicillium sp.</i> (3*)” (microscópica)	108
Foto N° 16 a “ <i>Penicillium sp.</i> (4*)” (macroscópica)	108
Foto N° 16 b “ <i>Penicillium sp.</i> (4*)” (microscópica)	108
Foto N° 17 a “ <i>Penicillium sp.</i> (5*)” (macroscópica)	109
Foto 17 b “ <i>Penicillium sp.</i> (5*)” (microscópica)	109
Foto N° 18 a “ <i>Mucor sp.</i> (1*)” (macroscópica)	109
Foto N° N° 18 b “ <i>Mucor sp.</i> (1*)” (microscópica)	109
Foto 19 a “ <i>Mucor sp.</i> (2*)” (macroscópica)	110
Foto N° 19 b “ <i>Mucor sp.</i> (2*)” (microscópica)	110
Foto N° 20 a “ <i>Geotrichum sp.</i> (1*)” (macroscópica)	110
Foto N° 20 b “ <i>Geotrichum sp.</i> (1*)” (microscópica)	110
Foto N° 21 a “ <i>Geotrichun sp.</i> (2*)” (macroscópica)	111
Foto N° 21 b “ <i>Geotrichum sp.</i> (2*)” (microscópica)	111
Foto N° 22 a “ <i>Fusarium sp.</i> (1*)” (macroscópica)	111
Foto N° 22 b “ <i>Fusarium sp.</i> ” (microscópica)	111
Foto N° 23 a “ <i>Botrytis sp.</i> ” (macroscópica)	112
Foto N° 23 b “ <i>Botrytis sp.</i> ” (microscópica)	112
Foto N° 24 a “ <i>Paecylomices sp.</i> ” (macroscópica)	112

	Pág.
Foto N° 24 b “ <i>Paecylomices sp.</i> ” (microscópica)	112
Foto N° 25 a “ <i>Cladosporium sp.</i> ” (macroscópica)	113
Foto N° 25 b “ <i>Cladosporium sp.</i> ” (microscópica)	113
Foto N° 26 a “ <i>Aureobasidium sp.</i> ” (macroscópica)	113
Foto N° 26 b “ <i>Aureobasidium sp.</i> ” (microscópica)	113
Foto N° 27 a “ <i>Alternaria sp.</i> ” (macroscópica)	114
Foto N° 27 b “ <i>Alternaria sp.</i> ” (microscópica)	114
Foto N° 28 a Resultado positivo para prueba de aflatoxinas	114
Foto N° 28 b Resultado negativo para prueba de aflatoxinas	115
Foto N° 28 c Prueba de aflatoxinas igual al control (20ppb)	115
Foto N° 29 a Halos de inhibicion obtenidos con el extracto en ciclohexano de “ <i>Cinnamomum Zeylanicum</i> ” para “ <i>Aspergillus flavus</i> ” a las concentraciones 30 mg/ ml (halo N° 1), 20 mg/ ml (halo °2) y DMSO (centro).	123
Foto N° 29 b . Halos de inhibicion de “ <i>Aspergillus flavus</i> ” a concentraciones 10 mg/ml y 2 mg/ ml.	124
Foto N° 30. Halos de inhibicion para “ <i>A. flavus</i> ” con griseofulvina a concentracion a 1000 mg/ ml.	124
Foto N° 31 a. “ <i>Paecylomices sp.</i> ” sin tratamiento	125
Foto N° 31 b. “ <i>Paecylomices sp.</i> ” con tratamiento (Extracto de canela con cloroformo).	125
Foto N° 32 Extracto en ciclohexano Canela 30mg/mL	171
Foto N° 33 Extracto en ciclohexano Canela 10mg/mL	172
Foto N° 34 Extracto en ciclohexano Canela dilución 10 ² , concentración mg/mL.	172
Foto N° 35 Extracto en cloroformo de Canela a 30mg/mL	173
Foto N° 36 Extracto en cloroformo de Canela a 10mg/mL	173

	Pág.
Foto N° 37 Extracto en cloroformo de Canela a 30mg/mL, dilución 10^{-2} sobre maíces molidos.	174
Foto N° 38 Extracto en cicloroformo a 10 mg/mL a dilución 10^{-2} .	174
Foto N° 39a Colonias crecidas en una muestra de harina de "Zea mays" a dilución 10^{-2}	183
Foto N° 39b Colonias crecidas en una muestra de harina de "Zea mays" a dilución 10^{-3}	183
Foto N° 40 Colonias de "A. flavus" y "Mucor sp. (2*)" crecidas en harinas de "Zea mays".	184
Foto N° 41 Colonia de "Mucor sp. (2*)" en mayor tamaño	184
Foto N° 42 Colonias crecidas de "Aspergillus Ocraceus" y "Aspergillus fumigatus" en una muestra de harina de maíz.	185
Foto N° 43 Colonias crecidas de "Alternaria sp." en una muestra de harina de maíz.	185
Foto N° 44a Colonias crecidas de "Aureobasidium sp." en una muestra de harina de maíz.	186
Foto N° 44b Colonias crecidas de "Aureobasidium sp." en una muestra de harina de maíz.	186

AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta investigación expresamos de esta forma nuestros más sinceros agradecimientos al haber cumplido con las metas propuestas, a:

Dios ser supremo que rige nuestras vidas, guía y alimento espiritual, por darnos la oportunidad de estudiar y realizar este trabajo.

Nuestros padres por ser los primeros profesores en la escuela de la vida y demás familiares por su apoyo y confianza depositada.

La Universidad de Sucre nuestra alma "**mater**" por acogernos y brindarnos la oportunidad de cumplir nuestro anhelo de ser profesionales.

Todos los profesores que nos impartieron sus conocimientos durante todas las etapas de la vida estudiantil.

Nuestra directora de Tesis, **Dra. Rita Luz Márquez Vizcaíno** por aportarnos los conocimientos, guía, así como sus consejos y apoyo para llevar a cabo este proyecto.

Nuestro codirector de tesis Microbiólogo **Carlos Gómez Santiz**, por los conocimientos aportados, su excelente personalidad y su apoyo incondicional para llevar a cabo este estudio.

Ingeniero **Antonio Tovar Ortega**, Jefe del centro de Laboratorios de la Universidad de Sucre durante el tiempo de investigación, por brindarnos la disponibilidad de trabajar en el laboratorio de Microbiología.

Arturo Doncel Mestra, Técnico de laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sucre, por su valiosísima colaboración para llevar a cabo este trabajo, así como por su generosidad y grata personalidad.

Los biólogos **Giovanny Montes y Danys Mendoza** por la colaboración prestada en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad de Sucre.

La bióloga **Iris Rocío Payares Díaz**, y los **Drs. Antonio Maria Pérez Herazo**, y **Javier Darío Beltrán Herrera** por su Colaboración en la toma de fotografías necesarias para esta investigación.

Profesor **Santiago Ruiz Pérez**, ex-jefe del Departamento de Biología, por su colaboración en lo necesario durante su jefatura.

Magíster **Juan Manuel Díaz Soto**, actual jefe del departamento de Biología por su colaboración en lo necesario.

Zootecnista **Kevin González Martínez** y profesor **Pedro Martínez**, por su ayuda y asesoría en los análisis estadísticos.

Ingeniero agrícola **Said Márquez Oñate** y la instrumentadora **Saray Romero Romero**, técnicos de laboratorio quienes colaboraron en algunos momentos con la investigación.

Dra. Bárbara Arroyo, Magistra en Microbiología por su colaboración para llevar a cabo esta investigación.

Los profesores **Alexander Pérez Cordero** y **Erick Rauchwerger Rodríguez**, quienes, hicieron aportes valiosos en la estructura de esta investigación, convirtiéndose en la piedra angular de este trabajo.

Dr. **Dagoberto Mulet**, Agrónomo del departamento de agronomía de la Gobernación de Sucre y al Dr. **Jhonny Ebrat** Agrónomo de la Federación Nacional de Cereales. (FENALCE), por las informaciones suministradas para el enriquecimiento de este trabajo.

Nuestro compañero y amigo **Jaime Mercado Ordóñez**, por su ayuda incondicional en todo lo necesario; demás compañeros y amigos de carreras y demás personas que de una u otra forma colaboraron con este trabajo durante el transcurso de la investigación.

RESUMEN

Se analizaron muestras de "Zea mays" en almacenamiento en tiendas y graneros de Sincelejo encontrándose unidades formadoras de colonia (ufc/g) inferiores a 10^5 ufc/g indicando niveles aptos para el consumo alimenticio.

En el estudio de la micoflora presente en "Zea mays" bajo condiciones de almacenamiento en 32 tiendas y 7 graneros del municipio de Sincelejo se aislaron e identificaron 23 especies de hongos los cuales fueron: "*Aspergillus flavus*", "*Fusarium sp.*", "*Aspergillus ochraceus*", "*Paecylomyces sp.*", "*Mucor sp. (1*)*", "*Aspergillus terreus*", "*Penicillium sp. (2*)*", "*Penicillium sp. (5*)*", "*Penicillium sp. (4*)*", "*Aspergillus versicolor*", "*Mucor sp. (2*)*", "*Penicillium sp. (1*)*", "*Penicillium sp. (3*)*", "*Aspergillus oryzae*", "*Aspergillus niger*", "*Aspergillus fumigatus*", "*Alternaria sp.*", "*Aureobasidium sp.*", "*Botrytis sp.*", "*Penicillium purpurogenum*", "*Penicillium sp. (6*)*", "*Geotrichum sp. (1*)*", "*Cladosporium sp.*". Siendo la más frecuente en un 19% "*Aspergillus flavus*".

Los extractos en ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol de la corteza de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y los capullos de clavo de olor "*Sizygium aromaticum*" se aplicaron en las concentraciones: 30 mg/ mL, 20 mg/ mL, 10 mg/ mL, 2 mg/ mL a 7 de los hongos aislados: "*Aspergillus flavus*", "*Mucor sp. (1*)*", "*Aspergillus niger*", "*Fusarium sp.*", "*Penicillium purpurogenum*", "*Penicillium sp. (1*)*", "*Paecylomyces sp.*". Usando Griseofulvina como control positivo y como control negativo dimetilsulfóxido puro (DMSO). Los extractos en cloroformo de clavo y canela presentaron mayor efectividad a la concentración de 30 mg/ mL sobre el hongo "*Penicillium purpurogenum*".

La presencia de aflatoxinas en este cereal bajo condiciones normales fueron inferiores a 20 ppb, percibiéndose por una coloración azul en el inmunoensayo y otras sometidas a condiciones de humedad mediante la técnica de (ELISA),

mostraron una concentración de aflatoxinas superior a 20 ppb, percibiéndose por una coloración rosada en el micropozo; seis de las muestras sometidas a condiciones de humedad, mostraron un resultado positivo, comprobando así que la humedad y la cantidad de agua disponible es clave en la proliferación de hongos y producción de micotoxinas.

ABSTRACT

Samples of "*Zea mays*" were analyzed in the storage of grocery stores and granaries from Sincelejo and units creator of colonies (ufc/ g) were found they were lower than 10^5 , indicating suitable levels for the nourishing consumption.

In the study of the micoflora present s in the "*Zea mays*" under conditions of storage in 32 grocery stores and 7 granaries in Sincelejo town were isolated and identified 23 species of fungus which were: "*Aspergillus flavus*", "*Fusarium sp.*", "*Aspergillum ochraceus*", "*Paecylomices sp.*", "*Mucor sp. (1*)*", "*Aspergillus terreus*", "*Penicillium sp. (2*)*", "*Penicillium sp. (5*)*", "*Penicillium sp. (4*)*", "*Aspergillus versicolor*", "*Mucor sp. (2*)*", "*Penicillium sp. (1*)*", "*Penicillium sp. (3*)*", "*Aspergillus oryzae*", "*Aspergillus niger*", "*Aspergillus fumigatus*", "*Alternaria sp.*", "*Aurobasidium sp.*", "*Botrytis sp.*", "*Penicillium purpurogenum*", "*Penicillium sp. (6*)*", "*Geotrichum sp. (1*)*", "*Cladosporium sp.*". Being the most frequent in a 19% "*Aspergillus flavus*".

The extract in cyclohexane, chloroform, acetone and methanol of bark Cinnamon "*Cinnamomum zeylanicum*" and the buds of aromatic cloves "*Syzygium aromaticum*" were applied in the concentrations: 30 mg/ mL, 20 mg/ mL, 10 mg/ mL, 2 mg/mL to 7 of the isolated fungus: "*Aspergillus flavus*", "*Mucor sp. (1*)*", "*Aspergillus niger*", "*Fusarium sp.*", "*Penicillium purpurogenum*".

"*Penicillium sp. (1*)*", "*Paecylomices sp.*". Using Griseofulvin like positive control and like negative control pure dimethylsulfoxide (DMSO) .The extracts in chloroform of clove and Cinnamon presented great effectiveness to the concentration of 30 mg/ mL over the fungus "*Penicillium purpurogenum*".

The presence of aflatoxins in this cereal under normal conditions were lower to 20 ppb showing a blue color and others put to conditions of humidity using the technique of inmunotest (ELISA), showed a concentrations of aflatoxins superior to 20 ppb, perceived by a pink colorations of humidity and the quantity of water available contributes in the proliferations of fungus and the productions of mycotoxins.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la micoflora de "*Zea mays*" en almacenamiento y la presencia de aflatoxinas. Evaluación del grado de sensibilidad de la micoflora de "*Zea mays*" en almacenamiento frente a los extractos de la corteza de canela "*Cinnamomum Zeylanicum*" y capullos de clavo de olor "*Sizygium aromaticum*".

ESPECÍFICOS

- Evaluar el grado de contaminación fúngica presente en muestras de "*Zea mays*" en almacenamiento mediante la técnica de recuento en placa.
- Identificar los géneros de hongos aislados de las muestras de "*Zea mays*" en almacenamiento.
- Identificar la presencia de aflatoxinas en muestras de "*Zea mays*" en condiciones normales y sometidas a condiciones de humedad.
- Comparar la efectividad de "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Sizygium aromaticum*", como también de cada extracto y sus respectivas concentraciones como tratamientos frente a algunas especies fúngicas aisladas de "*Zea mays*".

INTRODUCCIÓN

“*Zea mays*” al igual que otros granos y forrajes puede ser atacado por hongos los cuales se adquieren en campo o en almacenamiento (Fulgueira y Borghi, 2000). Estos hongos al crecer sobre un determinado sustrato bajo determinadas condiciones de humedad y temperatura producen ciertos compuestos tóxicos denominados micotoxinas capaces de alterar las funciones biológicas de los seres vivos, las más conocidas y abundantes son las aflatoxinas (Goachin, 1983; Osuna, 1992; Arango y Marín, 1999).

Existen por lo menos 500.000 especies de hongos y entre ellas 300 tienen efectos perjudiciales para los humanos y animales; los hongos: “*Fusarium sp.*”, “*Alternaria sp.*”, “*Cladosporium sp.*”, “*Claviceps sp.*”, y otros tienden a infectar los cultivos en el campo durante su crecimiento, mientras que en almacenamiento la contaminación se da por: “*Aspergillus sp.*” y “*Penicillium sp.*” (Fulgueira y Borghi, 2000).

Debido al problema que representan los hongos y sus toxinas se han desarrollado muchos métodos de control; se recomienda la rotación de cultivos, la selección apropiada de semillas, el desarrollo de híbridos de resistencia mediante modificación genética, existen métodos de interferencia química en la producción de micotoxinas, también se utiliza control biológico utilizando microorganismos que han mostrado actividad contra ciertos tipos de hongos, productores de micotoxinas por ejemplo: “*Aspergillus parasíticus*”, “*Aspergillus fumigatus*” y “*Rhizopus sp.*”.

Entre los métodos de control biológico también se encuentran la utilización de extractos naturales de plantas tales como Margosa “*Azadirachta indica*” contra “*Aspergillus flavus*” (Fulgueira y Borghi, 2000), también se han ensayado extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*” y clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” contra ciertos tipos de hongos como “*Aspergillus niger*” (Pawar y Thaker, 2006), “*Fusarium graminearum*” (Velluti *et.al*, 2004); “*Aspergillus flavus*”, “*Penicillium*

roqueforti”, *“Mucor plumbeus”* y *“Eurotium sp.”* (Matan *et.al*, 2006) y contra otros tipos de hongos como *“Colletotrichum sp.”* (Ranashinge *et.al*, 2002) así como otros microorganismo de tipo bacteriano *“Bacillus cereus”*, *“Trichodephytum”*, *“Salmonella”*, en otros (Padrón *et.al*, 2003).

“Zea mays” es cultivado en el Departamento de Sucre, principalmente en el municipio de Oveja se cultiva el maíz tradicional, el cual en sus últimos tres años se han sembrado aproximadamente 2675 Ha, seguido del municipio de San Onofre donde se han sembrado 630 Ha.

El maíz asociado se siembra principalmente en Sincelejo con un promedio de 1790 Ha, seguido por Betulia con 1626 Ha, Corozal con 1032 Ha, este maíz también es muy cultivado en Sampués y Palmitos.

En el Departamento de Sucre se cultiva principalmente el maíz amarillo tecnificado, el cual durante los últimos tres años se han sembrado aproximadamente 15321 Ha y el maíz tradicional del cual se han sembrado 7557 Ha. (Gobernación, 2007).

Dado los diversos usos que presenta el maíz tales como alimenticios tanto humano como animales, usos medicinales e industriales como la fabricación de pañales, las industrias de cosméticos y de pintura, así como en la fabricación de combustibles, han convertido al maíz en un sustento económico de agricultores, campesinos y comerciantes de esta región.

Debido a la importancia que representa el cultivo de maíz para el Departamento de Sucre, se han buscado alternativas para aumentar la producción y favorecer la economía de dicho Departamento, tales como el implemento de nuevas tecnologías que incluyen genotipos mejorados e híbridos de maíz; se han creado algunos proyectos para favorecer a los cultivadores y comerciantes en Sucre, como lo es el establecimiento y agroindustrialización del cultivo de maíz tecnificado por lo cual se ha establecido el cultivo de 2626 Ha, adecuación del

centro de acopio de Tolú Viejo, adecuación de bodegas y pista de secado a nivel comunitario, establecimiento de una planta productora de harina precocida, organización de empresas. (Fenalce, 2007).

Estas estrategias han conseguido aumentar el rendimiento de este cereal el cual durante los dos últimos años han pasado de 3 a 3.2 toneladas de maíz, obteniéndose una ganancia de 200 toneladas por Ha. El rendimiento del maíz durante los dos últimos años ha sido bueno debido a que se han presentado pocos ataques de plagas tales como hongos, insectos y otros. (Fenalce. 2007).

Debido a los beneficios del maíz y a lo que representa este producto para el Departamento de Sucre, es necesario cada día buscar estrategias que contribuyan a su mejoramiento y producción, entre las alternativas pueden destacarse los métodos de control de hongos contaminantes del maíz los cuales pueden bajar la calidad del producto, es importante ensayar métodos de control biológico.

Pensando en una alternativa que aporte conocimientos sobre la problemática que representa la contaminación fúngica en "*Zea mays*" y la consecuente producción de toxinas nocivas para la salud, surgió este estudio con el fin de contribuir en el mejoramiento de las condiciones de almacenamiento que permitan un producto higiénicamente sano; ya que parte de la contaminación por hongos esta relacionada con formas y condiciones incorrectas de almacenaje, debido a la falta de conocimiento de dicho problema.

2. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos que pueden presentar dos tipos de morfologías básicas una forma multicelular que se denomina filamentosa y una forma unicelular denominada levaduriforme. Los filamentosos representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos y son aeróbicos y los levaduriformes anaeróbicos facultativos. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2-9 y temperaturas entre 10 y 40 °C. Al microscopio óptico, los hongos filamentosos presentan unas estructuras tubulares formadas por múltiples células que se denominan hifas, el conjunto de hifas recibe el nombre de micelio. (Bial y Aristegui, 2002).

Los hongos que tienen crecimiento levaduriforme generalmente dan lugar a colonias lisas parecidas a las de las bacterias. Dichas colonias están formadas por agregados de células individuales denominadas levaduras. (Bial y Aristegui, 2002).

Los hongos son organismos sin clorofila por lo que no pueden sintetizar sus propios alimentos, obteniéndolo en forma directa o indirecta, almacenando sustancias nutritivas (Saenzpeña, 2004). Ellos son eucariotas típicos y su número cromosómico puede variar; *Candida albicans* tiene 7, mientras que "*Aspergillus nidulans*" 8, y 16 en "*Sacharomyces cereviceae*" ellos presentan ribosomas 80S. Una característica de las membranas citoplasmáticas de los hongos es la presencia de ergosterol, su pared celular esta conformada fundamentalmente por polisacáridos y por diversas proteínas, los polisacáridos más importantes son la quitina (polímero de n-acetilglucosamina), el manano (polímero de manosa) y el glucano (polímero de glucosa). (Bial y Aristegui, 2002).

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos (se han descrito aproximadamente 500.000 pero se estima que pueden existir entre 1 y 1,5

millones de especies) que presentan una amplia distribución en la naturaleza contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos. Un pequeño número son patógenos de animales y plantas (Bial Aristegui, 2002).

2.1.1 Clasificación de los hongos. En el sistema de clasificación los hongos se encuentran clasificados en el reino fungí, que se dividen en cuatro phylum: Ascomycota (el más extenso que comprende el 50% de los hongos conocidos y aproximadamente el 80% de los hongos patógenos; Basydiomycota, zygomycota y chytridiomycota, encontrándose en los tres primeros los hongos patógenos humanos (Bial y Aristegui, 2002).

2.1.1.1 Ascomycetos. Son de gran utilidad en la industria y en la medicina, están repartidos por diversos medios como el agua, el suelo, vegetales y animales en descomposición, en sustancias azucaradas en el que llevan una vida parasita causando serias enfermedades de plantas cultivadas. Este tipo de hongos también pueden ser saprofitos, los cuales tienen muchas aplicaciones de gran valor, son utilizados en la fabricación de quesos, para ciertas fermentaciones y los del genero "Penicillium sp." son utilizados para producir antibióticos (Saenzpeña, 2004) los hongos ascomycetos tienen hifas septadas. Estos pueden producir esporas sexuales o esporas asexuales. La fase de la espora sexual de un ascomyceto se conoce como teleomorfo; las fases asexuales son los anamorfos. Estos hongos pueden tener mas de una fase anamorfica, pero solamente una teleomorfica .Solamente las fases asexuales han sido descritas en los hongos imperfectos.

2.1.1.2 Ficomicetos. son los hongos llamados mohos del pan y de las frutas y en algunos casos son parásitos del repollo. Se caracterizan por poseer micelio continuo (no tabicado) el cual es comparable a una sola célula polinucleada; las hifas no presentan tabiques, pero cada núcleo gobierna una porción de protoplasma, se produce así una separación invisible, o sea que se forma un tabicamiento fisiológico, los esporos asexuados se los halla dentro de los

esporangios los cuales son órganos de fructificación cerrados de aspecto globoso o piriforme.

2.1.1.3 Deuteromycetos. Presentan fases conidiales, no se conoce reproducción sexual, debido a esta condición también se les llama hongos imperfectos, estos solo producen una fase de anamorfo que es la fase asexual.

2.1.1.4 Basidiomyceto. Son los populares hongos de sombrerito y oreja de palo (que son los que aparecen en los troncos de los árboles, los hongos de sombrerito son de un gran valor económico, ya que son comestibles, pero existen algunas especies que son altamente venenosas (Saenzpeña, 2004). Los hongos de esta clase presentan micelios tabicados y poseen esporos externos de origen sexual (basidiosporos) que se forman sobre órganos especiales llamados basides. Los basides sostienen el esterigma y en el ápice de cada esterigma se sitúan uno o varios basidiosporos.

2.1.1.5 Phylum chytridiomycota: quitridiomycetes. El talo de estos hongos es cenocítico y pueden formar esporas o esporangios de resistencia. Las paredes celulares de las hifas están principalmente formadas de quitina y celulosa. Algunos afectan la producción agrícola y son causantes de enfermedades.

Hay considerables diferencias dentro de los quitridiomycetes con respecto a su estructura y su reproducción sexual y asexual. Las formas morfológicamente más simples son aquellas endobióticas, es decir, aquellas que viven enteramente dentro de las células de su hospedador. Algunas especies son unicelulares, otros son pluricelulares.

Este grupo es considerado el más primitivo dentro de los hongos, existen cerca de 1000 especies de este fylum, la mayoría son acuáticas, algunas especies de este fylum provocan muertes de anfibios en larga escala, este fylum comprende una única clase y 5 ordenes, los cuales son: Blastocladales, chytridiales, monoblepharidales, neocallimastigales y spizellomycetales. (Taylor *et.al*, 1994).

De las especies de hongos que existen se estima que 300 tienen efectos perjudiciales para los humanos y los animales; los hongos: "*Fusarium sp.*", "*Alternaria sp.*", "*Cladosporium sp.*", "*Claviceps sp.*" y otros hongos tienden a infectar los cultivos en el campo durante su crecimiento, mientras que en el almacenamiento la contaminación del material se da especialmente por: "*Aspergillus sp.*" y "*Penicillium sp.*", por lo general los hongos toxigénicos se incluyen en estas dos categorías: hongos de campo y de almacenamiento, sin embargo ambos conceptos no son formas representativas porque la presencia de especies puede darse en ambos hábitat (Fulgueira y Borghi, 2000).

Los cereales tienden a ser altamente susceptibles a la contaminación por hongos y sus micotoxinas, tanto cuando crecen en el campo como cuando están almacenados y procesados (Watnwright, 1992). Los hongos pueden invadir los granos durante la formación en la planta, durante su cosecha, transporte, acondicionamiento y almacenamiento. Ellos se consideran quizá el agente deteriorante más común de todo tipo de alimentos dada su capacidad ubicuista y su gran resistencia (Ocampo *et. al*, 2004). Estos agentes fúngicos son difíciles de controlar porque tienen una amplia gama de sustratos como fuente de carbono, de nitrógeno y energía, se considera que un previo secado de los granos almacenados destruye fácilmente bacterias pero no los hongos (Del Valle, 2004).

La presencia de estos microorganismos está regulada por la combinación de tensión de oxígeno, el contenido de humedad del grano (actividad acuosa) en equilibrio con la humedad relativa del ambiente y el tipo de producto agrícola, por ejemplo en granos con alto contenido de almidón (trigo "*Triticum sativum*", cebada "*Hordeum sativum*", avena "*Avena spp.*", arroz "*Oryza sativa*" centeno "*Sécale cereale L*", maíz "*Zea mays*" etc.), humedad relativa de 65-70 % (contenido de humedad de 13-14 %) y tensiones de oxígeno cercanas a la atmósfera solamente podrán encontrarse "*Aspergillus holophilicus*", con un pequeño incremento de la humedad relativa 71-75 %, (contenido de humedad de 14,5-15%) otras tres especies de hongo germinarán "*Aspergillus restrictus*", "*Aspergillus glaucus*" y "*Wallemia sebi*", a humedad relativa de 75-80% (contenido de humedad 15,5-16%

) "*Aspergillus flavus*" y "*Penicillium spp.*". Si la tensión de oxígeno decrece, estos hongos filamentosos de almacén no se desarrollaran y en su lugar predominaran las levaduras (Vásquez, 2001).

2.2 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS GÉNEROS TOXIGÉNICOS DE MAYOR PRESENCIA.

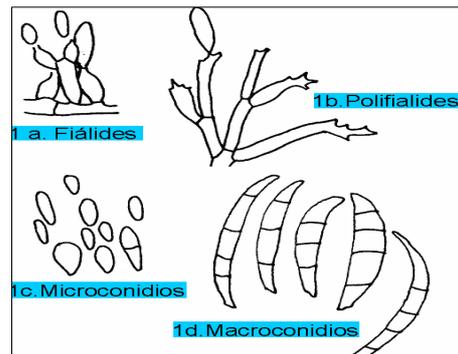
2.2.1 Género "*Fusarium sp.*". Se encuentra principalmente en zonas templadas (Fulgueira y Borghi, 2000) pertenece a la clase fungí imperfecta, estas especies pueden desarrollarse en el maíz "*Zea mays*" y en otras plantas hasta la maduración en campo, pero solo puede crecer ligeramente en granos una vez secados y almacenados (Arango y Marín, 1999). Las colonias de los distintos "*Fusarium sp.*" que crecen moderada o profusamente tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia. Las especies de "*Fusarium sp.*" se encuentran en los vegetales antes de la cosecha. Como persisten en los productos almacenados, si la actividad del agua lo permite crecerán causando alteraciones y a veces produciendo toxinas, salvo "*F. culmorum*". Los "*Fusarium sp.*" no compiten bien con las especies de "*Aspergillus sp.*" y "*Penicillium sp.*" (Carrillo, 2003).

Los "*Fusarium sp.*" especialmente "*F. moniliforme*" causan enfermedades conocidas como pudrición del tallo y mazorca, produciendo un grupo de micotoxinas llamadas fumonisinas (Mazzani, 2000). Y otras especies, vomitoxinas (Orellana *et.al*, 2005).

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los "*Fusarium sp.*". Los macroconidios son curvados, pluriceptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, las monofialides producen conidios desde una sola apertura y en las polifialides surgen las esporas desde

mas de una apertura en la misma célula (Carrillo, 2003). En la figura N° 1 se muestran las estructuras microscópicas de los hongos del genero “*Fusarium sp.*”, nótese la figura puntiaguda en los macroconidios y los septos que se observan en el interior de ellos (Fig. 1d), las características elipsoidales típicas de los microconidios (Fig. 1c).

Figura N° 1. Estructuras microscópicas de los hongos del género “*Fusarium sp.*”.



2.2.2 Género “*Aspergillus*”. A este género pertenecen los hongos de depósito que atacan a los cereales y semillas oleaginosas. Ellos están adaptados a un género de vida exento de agua. Una de las especies mas importantes es “*Aspergillus flavus*”, puesto que se considera el principal productor de aflatoxinas, este hongo tiene una difusión ubiquitaria y se desarrolla con una tasa de humedad en los cereales del 13-18% (Fulgueira y Borghi, 2000). Los mohos del género “*Aspergillus sp.*” causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos tanto para el hombre como para otros animales, también producen la inhibición de la germinación junto con cambios de colores; calentamiento, amohosado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies por ejemplo: “*Aspergillus niger*” y “*Aspergillus oryzae*” son de interés industrial o se emplean en la fermentación en ciertas regiones (Carrillo, 2003).

El color es la principal característica microscópica para la identificación de los grupos de "*Aspergillus sp.*" los cuales poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro (Carrillo. *Op.cit*).

El "*Aspergillus sp.*" es un hongo filamentososo del grupo Deuteromycetos u hongos imperfectos, el aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras reproductoras llamadas cabezas conidiales las cuales están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas. Se conocen unas 900 especies del género "*Aspergillus sp.*"; basándose en su aspecto microscópico y en las características morfológicas de los conidióforos y fiálides, ellos se han clasificado en 18 grupos de los cuales 12 se relacionan con enfermedades humanas siendo las especies más importantes: "*Aspergillus fumigatus*" (85%), "*Aspergillus flavus*" (5-10 %) y "*Aspergillus niger*" (2-3 %) (Saenzpeña, 2004). La figura N°2 muestra las estructuras microscópicas correspondientes al género "*Aspergillus sp.*", cada una de ellas aparece indicada por una flecha, se observa la vesícula correspondiente a una estructura globosa, esférica o piriforme, el conidióforo el cual aparece como una estructura alargada ,por encima de la vesícula se pueden notar unas estructuras en forma de botellas las cuales se encuentran a su alrededor y por encima de estas las fiálides, sobre estas se pueden preciar pequeñas estructuras esféricas correspondientes a los conidios las cuales son esporas.

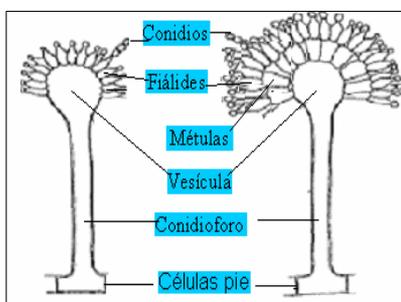


Figura N° 2. Estructuras microscópicas de los hongos del género "*Aspergillus sp.*"

2.2.3 Género “*Alternaria*”. Los hongos de este género pueden sintetizar (benzalpirano) el alternariol y el alternueno (Kouznetsov, 1998). Cuando el secado de los granos en el campo esta demorado por la lluvia y la humedad alta, las infecciones con “*Alternaria sp.*” pueden ser bastante extensas como para producir metabolitos secundarios (Carrillo, 2003).

Los hongos del género “*Alternaria sp.*” pertenecen a los hongos de campo, después de la cosecha al igual que otros como “*Cladosporium sp.*”, “*Fusarium sp.*”, “*Epiccocum sp.*” y “*Verticillium sp.*”. Estos hongos pueden mantenerse sobre frutas, hortalizas y cereales almacenados y presentan la característica de impedir el crecimiento de “*Aspergillus sp.*” y “*Penicillium sp.*” (Carrillo, 2003).

“*Alternaria sp.*” es después de las especies de “*Cladosporium sp.*” el moho cuyas esporas se encuentran suspendidas con mayor frecuencia en el aire (Carrillo. *Op.cit.*), este género contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Ellos reducen el rendimiento de las cosechas, afectan los vegetales almacenados.

Las características del crecimiento constituyen uno de los criterios para la clasificación de los miembros de este género. Los miembros del género “*Alternaria sp.*” tienen septos transversales y longitudinales que se les conocen como dictiosporas las cuales son pardas y picudas. (Carrillo, 2003). La figura N°3 corresponde a una de las especies del género “*Alternaria sp.*”.

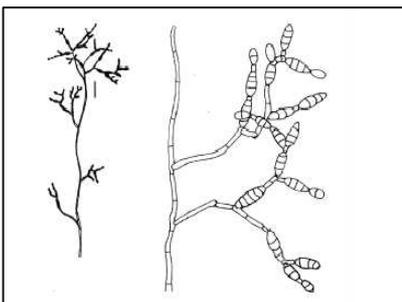


Figura N° 3. “*Alternaria arborescens*”

2.2.4. Género “*Penicillium sp.*”. Contiene muchas especies tóxicas (aproximadamente 100) y el rango de micotoxinas es más amplio que el de cualquier otro género (Fulgueira y Borghi, 2000). Los “*Penicillium sp.*” son mohos comunes que se desarrollan sobre los más diversos sustratos: granos, pajas, cueros, frutas, etc, crecen sobre los alimentos preparados o sus materias primas, ya sean de origen vegetal o animal, si hallan la actividad de agua y los nutrientes necesarios. Los granos de cereales pueden contener especies como “*Penicillium auranhogriseum*”, aun antes de la cosecha, especialmente en las épocas húmedas, pero la mayor contaminación ocurre en los depósitos donde se mantienen las esporas. (Carrillo, 2003).

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada que termina en células conidiógenas llamadas fiálides, existen varios tipos de conidióforos del género “*Penicillium sp.*” cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. (Carrillo. *Op.cit.*).

En los “*Penicillium sp.*” el órgano en forma de pincel es el encargado de producir los conidiosporos y esta formado por una célula pie o célula basal poco diferenciada de la cual nace el conidióforo y sobre el se implantan células llamadas ramas de las cuales nacen células llamadas métulas en forma de u o v que sostienen una fila de esterigmas de los cuales se forman los conidiosporos, esta morfología no todos los “*Penicillium sp.*” la presentan ya que existen muchas diferencias entre ellos lo cual hace que se les clasifiquen en cuatro grupos (Saenzpeña, 2004).

2.2.4.1. “*Penicillium*” monoverticilado. Tiene un solo verticilo de esterigmas que nacen directamente del conidióforo, no presenta rama ni métula. (Ejemplo: “*Penicillium javanicum*”.), ver figura (5.a).

2.2.4.2. “*Penicillium*” biverticilado simétrico. Tiene dos verticilos: métula y esterigma. No presenta rama (Ejemplo: “*Penicillium Purpurogenum*”), ver figura (5.b).

2.2.4.3. “*Penicillium*” poliverticilado simétrico. Tiene tres verticilos: ramas, métulas y esterigmas (Ejemplo: “*Penicillium albicans*”).

2.2.4.4. “*Penicillium*” asimétrico. El conidióforo se ramifica una o dos veces quebrando la simetría que se observa en los grupos anteriores. La mayoría de los “*Penicillium* sp.” se encuentran en este grupo (Ejemplo: “*Penicillium chrysogenum*”) (Saenzpeña, 2004), en la figura (5.c) se observa un “*Penicillium* sp.” terverticilado asimétrico, nótese la presencia de tres verticilos y la ramificación que le da la característica de asimétrico. La figura N° 1 corresponde a las estructuras microscópicas del género “*Penicillium* sp.”, cada una de ellas aparece indicada por una flecha, nótese la estructura alargada que corresponde al conidióforo el cual termina en una vesícula, sobre esta se encuentra la metula formada por estructuras en forma de botella y sobre esta se observan los conidios.

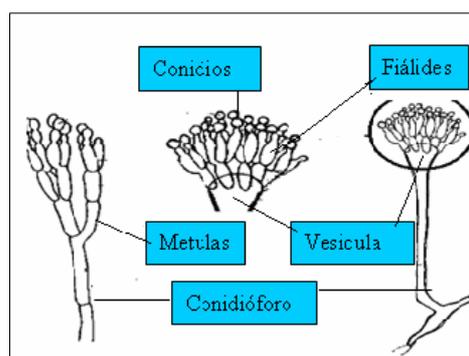


Figura N° 4. Estructuras microscópicas de los miembros de género “*Penicillium* sp.”.

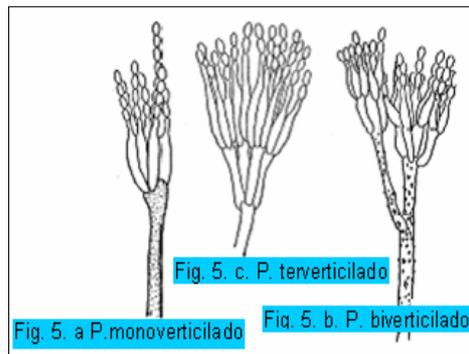


Figura Nº 5. Clasificación de los “*Penicillium sp.*” según el número de verticilos.

2.3. CULTIVOS DE HONGOS

El cultivo de mohos a partir de piensos y alimentos se realiza tras preparar series de diluciones en medios especiales (agar dextrosa de sabouraud, agar de Czapek, agar extracto de malta, agar heces de cerveza.) (Fiesen *et.al*, 1991).

Para el caso de “*Aspergillus flavus*” y la mayoría de las especies crecen sobre Czapek-levadura a temperatura de incubación corriente de 25 °C, pero para algunos miembros es conveniente 37 °C; para el aislamiento se usan medios selectivos (Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-diclorán) con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberantemente grande. Si solamente interesa determinar la presencia de “*Aspergillus flavus*” y “*Aspergillus parasíticus*” se suele sembrar sobre el medio AFAP, malta-glucosa, Czapek-levadura, Czapek-Glicerol o Czapek-20% sacarosa incubando a 25 y 37 °C registrando las características macro y micro morfológicas para acceder a la clave (Carrillo, 2003).

Las cepas de “*Penicillium sp.*” son sembradas en medios como Czapek-levadura, malta-glucosa o Czapek-Glicerol sin embargo hay variabilidad aunque mínima, según la fuente del agar, agua o extracto de levadura así como con el volumen de medio vaciado en las placas.

Los medios como malta-sacarosa, creatina-sacarosa, creatina-dicloran y sacarosa-dicloran permiten aislar y diferenciar "*Penicillium sp.*" incubando a 25 °C durante una semana, el agregado de 0,5% de ácido acético glacial favorece el aislamiento de "*Penicillium roquefortii*". Algunas especies son tolerantes a 100 µg de cicloheximida / mL de malta-glucosa por ejemplo "*Penicillium glabrum*", "*Penicillium brevicompactum*", "*Penicillium griseofulvum*", "*Penicillium olsonii*" y "*Penicillium aurantiogriseum*". (Carrillo. *Op.cit.*).

Para aislar el hongo que se encuentra dentro de los vegetales hay que desinfectar la superficie sumergiendo el material durante 5 minutos en lavandina concentrada comercial diluida 1/10. También se suele emplear agua oxigenada 10 volúmenes o etanol 75%. Luego se corta el tejido con un instrumento estéril y se toma con una aguja o gancho un trocito del interior del mismo para depositarlo sobre un medio selectivo (pectona-diclorán, papa-glucosa-diclorán o papa-sacarosa). A las 48 horas de incubación a 25 °C hay suficiente desarrollo como para hacer un repique (Carrillo, 2003).

Para la obtención directa de las especies de "*Fusarium sp.*" en los cereales, se depositan los granos con la superficie desinfectada sobre placas del medio papa-glucosa-diclorán, papa-sacarosa o malta-glucosa y se incuban 7 días a 25 °C bajo luz diurna indirecta o artificial. Los medios más usados para el cultivo de "*Alternaria sp.*" son czapek-levadura, malta-glucosa, czapek-glicerol. (Carrillo, *op.cit.*).

2.4 ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN ALMACENAMIENTO

(Ocampo *et.al*,2004) realizaron un estudio de la micoflora presente en granos de cebada recolectada en la comunidad Tlanalapa

perteneciente al municipio de Tepeapulco en el estado de Hidalgo, los cuales se utilizan como forraje para ganado y en la elaboración de malta cervecera. Se analizaron 10 muestras de granos obtenidas de 10 productores locales de cebadas recolectadas en tres estadios distintos; un mes previo a la cosecha, durante la cosecha y después de tres meses de almacenamiento. En total aislaron doce géneros de mohos presentes en las muestras, en un rango de 10^3 a 10^5 $\mu\text{fc/g}$ de las cuales cuatro contienen especies potencialmente micotoxigénicas: "*Aspergillus sp.*", "*Fusarium sp.*", "*Penicillium sp.*" y "*Alternaria sp.*". El género "*Cladosporium sp.*" fue aislado del 100% de las muestras analizadas.

En un trabajo realizado por (Mazzani *et.al*, 2000) estudiaron veinte híbridos experimentales y comerciales de maíz blanco y amarillo en el Sombrero estado de Guarico, Venezuela con el fin de estudiar la incidencia de "*Fusarium moniliforme*", "*Fumonisin*" y "*Aspergillus flavus*" en sus resultados encontraron que la incidencia de "*Fusarium moniliforme*" fue intermedia en 15 materiales y alta en los restantes; no encontraron diferencias significativas entre híbridos de maíz para el contenido de "*Fusarium sp.*" y el rango de contaminación entre híbridos fue estrecho, aunque todos resultaron contaminados, los contenidos de "*Fusarium sp.*" fueron bajos.

(Comerón *et.al*,2003) estudiaron 42 muestras de granos de "*Zea mays*" en el estado de Guarico (Venezuela) con el fin de estudiar la micoflora interna, el porcentaje de granos colonizados por el total de hongos y por cada especie de hongos identificada, fueron "*Aspergillus candidus*", "*Aspergillus flaviceps*", "*Aspergillus flavus*", "*Aspergillus niger*", "*Aspergillus terreus*", "*Cladosporium sp.*", "*Curvularia lunata*", "*Eurotium cheveti*", "*Fusarium oxysporum*", "*Penicillium citrinum*"; el % promedio de granos colonizados estuvo entre 32,71 y 75,73% .

(Orellana *et.al*, 2005) estudiaron la prevalencia de hongos en la harina de "*Lepidium Peruvianum*" "maca" en un total de 60 muestras procedentes de los mercados de Anda Huaylas, ICA las muestras fueron procesadas mediante el método de diluciones sucesivas y sembradas en superficie en agar papa dextrosa (PDA). En sus resultados encontraron que en el 96.7% del total de muestras estaban contaminadas. Identificándose 9 géneros y un total de 14 especies de mohos filamentosos incluyendo uno clasificado "*Mycelia stenlia*". Los géneros con mayor incidencia fueron "*Penicillium sp.*" y "*Fusarium sp.*".

(Ackerman, 1998) Estudió la incidencia y la naturaleza de la contaminación fúngica en la cebada y la malta Sudafricana durante la recogida de la cosecha, el almacenamiento y a lo largo del proceso malteado y se compararon con muestras de maltas procedentes de otros países. "*Alternaria sp.*" fue la especie de hongo detectada de forma predominante durante la recogida de la cosecha. Las condiciones climáticas parecen jugar un papel importante en el nivel de contaminación por los hongos ambientales, encontró que los recuentos de hongos en la cebada y malta sudafricana era apreciablemente inferior a la encontrada en cebada y malta procedente de otros países. La esperada disminución de los hongos de campo se produjo de forma concomitante con el aumento de los recuentos correspondientes a los hongos habituales en el almacenamiento ("*Aspergillus spp.*").

(Kedera *et.al*, 1999)Evaluaron la incidencia de especies de *Fusarium* y niveles de la toxina fumonisina B1 en maíces de Kenya, las especies de "*Fusarium sp.*" encontradas fueron: "*F. moniliforme*", "*F. subglutinan*", "*F. graminearum*", "*F. oxysporum*", "*F. solana*" y otras especies. "*Fusarium moniliforme*" fue la más encontrada y se le

atribuyó de acuerdo a los resultados inhabilidad de producción de fumonisina B1.

(Cabrales, 1992) quien estudió la contaminación por hongos e insectos en los granos de mayor consumo en Santamarta, se muestrearon 9 sitios encontrándose que los granos en estudio presentaron una humedad por encima de lo normal, alta incidencia de daños mecánicos por insectos y por hongos, encontrándose que el fríjol ("*Phaseolus vulgaris*") cabeza negra, el maíz ("*Zea mays*") amarillo y el fríjol ("*Phaseolus vulgaris*") rojo resultaron los mas afectados mientras que la lenteja ("*Lens culinaris*") y el arroz ("*Oryza sativa*") fueron los menos afectados.

2.5 MICOTÓXINAS

Los hongos contaminantes especialmente los filamentosos producen una variedad de micotoxinas (Orellana *et.al*, 2005). Son compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos como metabolitos secundarios de hongos toxigénicos de diversos géneros y especies que infectan las cosechas en el campo o durante el almacenamiento (Arango y Marín, 1998). Los animales y el hombre tienen susceptibilidad a estas toxinas las cuales tienen efectos patológicos afectando sistemas específicos del organismo pero generalmente dañan el hígado o los riñones por lo que alteran los procesos metabólicos del animal produciendo condiciones que llevan a efectos como hígado pálido agrandado, inflamación de riñones, lesiones orales, disminución de la respuesta inmune, mala absorción de nutrientes, reducción del crecimiento, alteración de la fertilidad. El grado de daño depende de las micotoxinas involucradas, del nivel de contaminación del alimento y del tiempo en que se ha consumido, también pueden producir reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos (Orellana *et.al*, 2005). Entre

las enfermedades producidas por estas toxinas en los animales tenemos el ergotismo, la enfermedad x de los pavos y cáncer hepático (Arango y Marín, 1998).

En la actualidad se conocen cerca de 500 micotoxinas (Arango y Marín, 1999). Dentro de los principales géneros productores se encuentran. "*Aspergillus sp.*", "*Fusarium sp.*", "*Alternaria sp.*", "*Penicillium sp.*" y "*Claviceps sp.*". (Koutnetsov, 1998).

2.5.1 Descripción de las micotoxinas más comunes.

2.5.1.1 Ocratoxinas. Se consideran metabolitos secundarios de cepas de "*Aspergillus sp.*" y "*Penicillium sp.*" encontradas en cereales, café y pan; como también en toda clase de alimento de origen animal en muchos países. La más frecuente es la ocratoxina. A la cual ha mostrado ser nefrotóxica, inmunosupresiva, carcinogénica y teratogénica en todos los experimentos realizados con animales. (Peraica et.al, 1999).

2.5.1.2 Fumonisina. Estas micotoxinas han sido encontradas en granos enteros de "*Zea mays*" o en residuos de criba (maíz seleccionado) estas son producidas por "*Fusarium moniliforme*" y "*Fusarium proliferatum*". Las fumonisinas afectan al hombre, pero parece no tener efectos fitotóxicos (Osuna, 1992). Las fumonisinas a diferencia de otras micotoxinas se encuentran en climas tropicales, se ha reportado que la fumonisina B1 y B2 tienen una toxicidad significativa mientras que otras fumonisinas como la (113, BY y AZ) ocurren en muy bajas concentraciones (Peraica et.al, 1999).

2.5.1.3 Zearalenona. Esta toxina es producida por diferentes especies de "*Fusarium sp.*" especialmente "*Fusarium culmarum*" y "*Fusarium graminearum*" ("*Fusarium roseum*"), además producidas por "*F. moniliforme*", "*F. triantum*" y "*F. oxysporum*". (Goachin, 1983,

Arango y Marín, 1999). Estas especies son contaminantes de cereales como el maíz, el trigo, la cebada, el sorgo y la avena, la mayoría de las veces asociada al maíz en concentraciones que varían entre unos pocos miligramos y 3000 ppb.

La zearalenona es una lactona derivada del ácido β -resorcílico y se considera un estrógeno (Goachin, 1983; Arango y Marín, 1999).

2.5.1.4 Tricótesenos. Son micotoxinas producidas por muchos miembros del género "*Fusarium sp.*" aunque también otros géneros "*Trichoderma sp.*", "*Trichothedum sp.*", "*Mirothesium sp.*" y "*Stachybotrys sp.*" son también conocidas por producir estos compuestos (Peraica et.al, 1999).

2.5.1.5 Vomitoxinas. Es una toxina similar al dioxivalenol (DON) o factor de rechazo de los animales, esta toxina tiene efecto inmunosupresor y es considerada como una de las más poderosas toxinas que alteran no solo la inmunidad natural o primera línea de defensa (linfocitos, macrófagos), si no que además modifica sustancialmente la síntesis y liberación de las citoquinas linfocíticas las cuales son primordiales para el normal desarrollo del proceso inmunitario (De luca, 2003).

2.5.1.6 Aflatoxinas. se encuentra en cereales, nueces, frutas y semillas oleaginosas. El consumo agudo puede producir emesis, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa y necrosis hepática, el consumo crónico de bajas cantidades guarda relación con carcinoma hepatocelular en humanos, puede afectar también el sistema inmune, las células T son más susceptibles que las células B y el efecto desaparece al suspenderse el consumo de la aflatoxina; también puede encontrarse anemia, alteración de la coagulación, el tiempo de protrombina y el tiempo de recalcificación del plasma.

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos que se forman en los conidios de los hongos excretadas en un 90% y asociadas a enfermedades como aflatoxicosis en ganado, en animales domésticos y en humanos en todo el mundo.

“Aspergillus flavus”, algunas cepas de *“Aspergillus niger”*, *“Aspergillus ruber”*, *“Penicillium citrinum”*, *“Penicillium frequentans”*, *“Penicillium variable”* y *“Penicillium poberulum”*. Son los principales productores de aflatoxina, estas toxinas han sido las más estudiadas hasta el momento (Arango y Marín, 1998). Ellas fueron inicialmente aisladas e identificadas en 1966 en la enfermedad X de los pavos como responsables de una necrosis hepática. (Goachin, 1983; Gimeno, 2003).

Entre las diferentes aflatoxinas existen variaciones en la intensidad de la toxicidad por ejemplo: la AFB1 es la más tóxica tanto en las aflatoxicosis agudas como crónicas, mientras que la AFM1 es hepatotóxica aguda como la anterior pero no tan carcinógena (Gimeno, *op.cit.*). De este grupo se conocen 18 tipos pero las más conocidas son la AFB1 y AFB2, AFG1 y AFG2, AFB2a, AFG2a, junto a estas también se encuentran la AFM1 y AFM2 que se segregan del organismo animal. (Goachin, 1983).

2.5.2 Pruebas para detectar micotoxinas.

2.5.2.1 Detección por luz ultravioleta. Con la ayuda de la luz ultravioleta, se detectan metabolitos fluorescentes de *“Aspergillus flavus”* (Fiesen *et.al*, 1991).

2.5.2.2 Uso de microcolumnas. Otro método relativamente sencillo y barato consiste en utilizar una pequeña microcolumna de vidrio no descartable llena de materiales absorbentes para concentrar micotoxinas fluorescentes, tales como aflatoxinas y ocratoxina A. (Fiesen, *et, al* 1991).

2.5.2.3 Inmunoensayos. La capacidad de los anticuerpos para reconocer un antígeno determinado puede ser utilizada para detectar tanto los microorganismos como sus metabolitos por ejemplo las micotoxinas. Los anticuerpos monoclonales pueden ser unidos fácilmente a enzimas o a sustancias colectadas que pueden ser rápidamente manipuladas para revelar la presencia de microorganismos o de sus productos a través de un simple cambio de color. En la técnica de ensayo de la enzima unida a inmunoabsorbente (ELISA) se permite que las proteínas extraídas (antígenos) de la muestra investigada se absorban sobre la superficie de plástico de pequeños pocillos en una placa micro-Elisa normalizada de poliestireno. Se añaden diferentes tipos de anticuerpos, pero solamente aquellos que reconocen el antígeno se unirán, a continuación se añade un segundo anticuerpo que reconoce el primero. Este anticuerpo está unido a una enzima que puede cambiar el color de un colorante. El colorante se añade a continuación del segundo complejo de anticuerpos, y la cantidad de antígeno se revela por el cambio del color resultante. Los ELISAS han sido utilizados para detectar micotoxinas como aflatoxina y ocratoxina A. Este sistema tiene la ventaja de que es tanto específico como capaz de detectar cantidades trazas de micotoxinas. Incidentalmente las técnicas ELISAS están siendo desarrolladas para detectar "*Rhizoctonia Solana*", "*trichoderma solana*", "*trichoderma viridae*" y otros hongos de importancia comercial (Watnwright, 1992).

2.5.2.4 Columna de inmunoafinidad. Uso de una columna de inmunoafinidad previo a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para detectar aflatoxinas como la B1; para esto la muestra es extraída con una solución de acetona/ agua (85 + 15). El extracto es filtrado y diluido con agua o con una solución salina buffer fosfato (pH: 7,4). Una alícuota de la disolución anterior es introducida en la columna de inmunoafinidad que contiene un anticuerpo monoclonal específico para la aflatoxina B1, la columna es lavada con agua y posteriormente la aflatoxina B1 es extraída con metanol y cuantificada por medio de cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de fase reversa y una pos columna de derivatización (PBPB) y detector de fluorescencia. El límite

de cuantificación del método resulta ser mejor que 0.5 microgramo de aflatoxina B1/ Kg. (Gimeno, 2003).

2.6 ESTUDIOS DE MICOTOXINAS

(Bayman y Col. 2002) determinaron la producción de ocratoxinas por "*Aspergillus ocraceus*" y "*Aspergillus alliaceus*", dentro de sus propósitos estuvieron conocer cuales especies produce ocratoxinas constantemente y cuales especies producen ocratoxinas durante la contaminación de los cultivos, para esto se aislaron los grupos de hongos "*Aspergillus ocraceus*" y "*Aspergillus alliaceus*" de nueces "*Jumglans regia*" e higos "*Picus carica*" en California, encontrando en sus resultados a "*Aspergillus alliaceus*" como el principal productor de ocratoxinas el cual producía mas de 30 µg/mL, en comparación con la otra especie analizada y que la especie "*A. alliaceus*" es el responsable de la contaminación por ocratoxina observada en los higos "*Picus carica*" de California.

(Robledo *et.al*, 2001) estudiaron la contaminación natural con micotoxinas en ("*Zea mays*") forrajero y granos de café "*Coffea s.p.*" verde en el estado de Nayarit (México), el objetivo de este estudio residió en la evaluación de la contaminación por toxinas de "*Fusarium sp.*" (zearalenona, fumonisina B1, toxina T-2 y diacetoxiscirpenol en ("*Zea mays*") forrajero procedente del mercado mayorista, así como la contaminación por ocratoxina A de granos de "*Zea mays*" analizadas presentaron contaminación por fumonisina B1 con una concentración promedio de 2541 µg/Kg, un 15% de las muestras contenían zearalenona con un promedio de 1610 µg/Kg, de los Tricótesenos estudiados sólo una muestra presentó contaminación por toxina T-2 (7 µg/Kg),no habiéndose detectado diacetoxiscirpenol en ninguna de las muestras. En un 67% de las muestras de ("*coffea s.p.*") verde analizadas se encontró contaminación por ocratoxina A, con un promedio de 30,1µg/Kg.

(Kedera, *et.al*, 1999) evaluaron la incidencia de especies de "*Fusarium sp.*" y niveles de fumonisinas B1 en maíces de Kenya. Las especies de "*Fusarium sp.*"

encontradas fueron: "*F. moniliforme*", "*F. subglutinan*", "*F. graminearum*", "*F. oxysporum*", "*F. solana*" y otras especies de "*Fusarium sp.*". De las 197 muestras de ("*Zea mays*") analizadas, 47% contenían fumonisina B1 siendo los niveles en su mayoría de 100 ng/g y sólo el 5% tuvieron niveles de 1000 ng /g muchas de las muestras analizadas que presentaban alta incidencia o visibilidad de enfermedad mostraron poca o nada de fumonisina B1 siendo la especie "*F. moniliforme*" la más encontrada, se le atribuyó de acuerdo a los resultados inhabilidad de producción de fumonisina B1.

(Kim y Lee, 1994) encontraron una micotoxina poco conocida (sambutoxina) producida por "*Fusarium sp.*" obtenidas de papas ("*Patata*") podridas, estos investigadores aislaron 99 especies de "*Fusarium sp.*" en Corea, de estos aislados 80 fueron identificados entre los cuales tenemos a "*F. oxysporum*", "*F. solana*", y "*F. sambucino*". La cepa aislada de "*F. oxysporum*", producía moniliforminina. De nueve a quince aislados producían tricotexeno y moniliformina, fusarochromanose, fumonisina B1 o wortmannin, "*F. sambucinum*", produce una toxina no reportada hasta el momento la cual llamaron sambutoxina.

(Horn y Porner, 1999) Estudiaron sobre la diferencia regional en la producción en la aflatoxina B1 y ácido cyclopiazónico producido por "*Aspergillus flavus*" aislados de suelos en un transecto a lo largo de Estados Unidos; los aislados de "*Aspergillus flavus*" se tomaron de suelos donde se cultiva solo maní ("*Arachis hypogaea*") y suelo de campo con otros cultivos, fueron aisladas dos cepas de "*Aspergillus flavus*"; una cepa produce solamente aflatoxina B1 y otra cepa codificada como L, en la que la producción de aflatoxina B1 fue más variable, al igual que el ácido cyclopiazónico, las diferencias en la producción de aflatoxina B1 y ácido cyclopiazónico por la cepa L también fue detectadas entre regiones.

(Izquierdo *et.al*, 1996) Estudiaron la presencia de aflatoxina en algunos alimentos, la detección de aflatoxina se realizó en 10 muestras "*Arachis hypogaea*", ajonjolí ("*Sesamun indicum*"), algodón ("*Gossypium sp.*"), sorgo ("*Sorghum vulgare*"), "*Zea mays*", "*Oriza sativa*", soya ("*Glycine max l*"), alimentos concentrados, yuca

("Manihot esculenta") y trigo ("Triticum aestivum"), los resultados indicaron que el 80% de las muestras analizadas contenían aflatoxina, la aflatoxina B2 fue la de mayor incidencia, mientras que la aflatoxina G2 fue la de menor incidencia, la muestra de ("Arachis hypogaea") y alimentos concentrados presentaron todas las aflatoxinas analizadas, en la yuca ("Manihot esculenta") y en el trigo ("Triticum aestivum") no se detectó la presencia de aflatoxina.

(Beomont, 2004) Analizó la micoflora de 46 granos de "Zea mays" para estudiar la frecuencia e incidencia de diferentes especies fúngicas a si como la capacidad aflatoxigénica de las cepas de "A. flavus" aisladas. Durante el estudio de las especies con mayor frecuencia encontrada "F. moniliforme" 100 % y "A. flavus" 89 %, de 24 cepas de "A. flavus" aisladas 91, 67 %, producen aflatoxinas en concentraciones de 1 a 1000 ppb.

(Moreno *et al*, 2000) analizaron 50 muestras de cereales utilizando TLC, para determinar los niveles de la toxina deoxinivalenol (DON) la cual es producida por algunas especies de "Fusarium", realizaron también un análisis de la micoflora externa e interna, y los niveles de "Fusarium sp.", el mayor grado de infección lo encontraron en trigo, los niveles mayores de "Fusarium sp." fueron detectados en maíz blanco, las muestras de trigo en invierno presentaron los niveles mayores de (DON).

En la ciudad de Manizales (Arango y Marín, 1999) estudiaron la presencia de la micotoxina zearalenona en muestras de ("Zea mays"), en este trabajo se tomaron muestras de ("Zea mays") obtenidas de graneros mayoristas de la plaza de mercado de la ciudad de Manizales, para el análisis se utilizó la prueba ELISA de competencia directa y se encontró menos de 200 ppb de zearalenona en la totalidad de las muestras analizadas.

2.7 METODOS DE CONTROL DE HONGOS Y SUS TOXINAS

Debido al problema que representan los hongos y sus toxinas se han ensayado muchos métodos de control; a nivel de cultivos se recomienda la rotación de cultivos, la selección de una apropiada semilla, el desarrollo de híbridos de resistencia mediante modificación genética para proveer cereales con defensas contra la invasión de hongos toxigénicos y su subsecuente producción de micotoxinas. Durante la cosecha y almacenamiento una vez se ha dado la maduración fisiológica del grano debe ser separado de materiales foráneos y granos rotos y secos. (Fulgueira y Borghi; 2000).

Durante la cosecha es indispensable para la prevención de micotóxicas el procedimiento de recogida de los granos con limpieza y posteriormente el secado que se considera la parte esencial en la conservación. (García, 2002). Durante el almacenamiento, transporte y distribución es importante el control de insectos, humedad, temperatura, limpieza de instalaciones con utilización de agentes antifúngicos cuando existe un riesgo previsible. El ácido propiónico inhibe el desarrollo, mediante la baja de pH y la disminución de la formación de ATP, por la vía de transporte de electrones, el cloruro de sodio disminuye la presión osmótica de las células, disminuyendo la cantidad de agua libre; el amoníaco destruye la microflora global aunque de manera temporal (García, *op .cit*).

A nivel de fábrica se debe iniciar la limpieza y mantenimiento de los silos, revisar el equipo de limpieza y secamiento de los granos para su adecuado funcionamiento. El laboratorio de control de calidad debe tener facilidad para medir la humedad del grano, porcentaje de impureza, porcentaje de granos partidos y algunas micotóxicas de rutina. Debe analizarse un programa de control de roedores e insectos (Osuna, 1999).

Entre los métodos físicos se incluye la selección y eliminación de granos contaminados, el lavado con agua o con carbonato de sodio permite reducir la concentración de toxinas de hongos como "*Fusarium sp.*" en el maíz, la

inactivación térmica a altas temperaturas, la irradiación por rayos UV, rayos X, rayos gamma, o microondas permite reducir la concentración de toxinas (García, 2002). Entre los métodos químicos se incluyen una variedad de sustancias tales como los ácidos, bases (amoníaco, sosa), los agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono), los agentes reductores (bisulfito), los agentes clorados; son utilizados para degradar o biotransformar las micotóxicas y más concretamente las aflatoxinas (García, 2002). También se ha descrito el papel de algunos antioxidantes (Selenio, Vitamina A, C, E y Etoxiquin) y aditivos alimentarios.

Entre los métodos microbiológicos se encuentran la utilización de algunas bacterias lácticas, la "*propionilbacterias*" y las "*bífidobacterias*" poseen estructuras capaces de unirse a las micotóxicas, "*flavobacterium aurantracum*", puede fijar la AFB1 y volverla inactiva. Algunos microorganismos pueden igualmente metabolizar las micotóxicas ("*Corynebacterium rabrum*") o bioconvertirla ("*Rhizopus*", "*Eurotium*") (García 2002). De todas formas este fenómeno es en general lento y poco eficaz.

Entre los métodos de control biológico también se encuentra la utilización de los extractos volátiles de margosa "*Azadirachta Indica*" contra "*Aspergillus flavus*" (Fulgueira y Borghi, 2000), también se han utilizado extractos de Canela "*Cinnamomun zeylanicum*" y clavo de olor "*Sizygium aromaticum*". Se considera que los principales compuestos activos en canela y clavo de olor son los aldehídos cinámicos y los fenoles como eugenol. (Ranasigne *et.al*, 2002, Padrón *et.al*, 2003).

(Pawar y Thaker, 2006), estudiaron los efectos inhibitorios contra el hongo "*Aspergillus niger*", en estos ensayos se utilizaron 75 aceites esenciales de corteza de canela, clavo de olor y hierba de limón "*Cymbopogon citratus*", mostrando que estos extractos inhiben el crecimiento de las hifas y las esporas de este hongo.

(Velluti, *et al*, 2004), estudiaron el efecto de aceites esenciales de algunas plantas como orégano, hierba de Limón, canela y clavo de olor en el crecimiento de "*Fusarium graminearum*" y producción de zearalenona y deoxivalenol (DON),

producida por este hongo. En este trabajo se evaluaron granos de "*Zea mays*", con diferente actividad de agua entre 0.95 y 0.995 y diferentes temperaturas entre 20 y 30 grados centígrados, encontrando que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento del hongo, en los granos de maíz que tenían una actividad de agua de 0.995 (aw) y en aquellos maíces que presentaron las dos temperaturas evaluadas a 20 y 30 grados.

(Padrón, et al, 2003), ensayaron extractos etéreos, acetónicos y metanólicos de canela y clavo de olor, frente a patógenos como "*Bacillus cereus*" y "*Trichophyton ton-surans*", "*Salmonella typha*" y "*Cryptococcus neoformans*", en sus resultados encontraron que estos extractos presentan actividad antimicrobiana, pero que esta disminuye a medida que aumenta la polaridad, encontrando que la actividad biológica de estos extractos con metanol es casi nulo.

(Montes y Flores, 2001), evaluaron los efectos de aceites esenciales de canela, clavo de olor, epazote ("*Teucrium ambrosioides*"), orégano ("*Origanum vulgare lamiaceae*") y tomillo ("*Thymus vulgaris lamiaceae*"), solos y combinados entre si, así como los aceites esenciales de hierbabuena ("*Menta piperita L*", "*Lamiaceae*") y ruda ("*Ruta chalepensis*") sobre patógenos de sorgo: "*Claviceps africana*" y "*Fusarium thapsinum*" sobre su desarrollo micelial in vitro como in vivo, tratando semillas contaminadas con uno u otro, en sus resultados ellos encontraron que los aceites esenciales tuvieron un efecto fungicida, mientras que los extractos acuosos, etanolicos y polvos utilizados tuvieron un efecto fungiestático.

(Morozumi, 1978). Estudió 1300 especies de plantas en Japón, entre ellas la canela con el fin de ver sus propiedades como drogas y aceites esenciales, encontrando que de los compuestos químicos presentes en estas plantas el cinemaldehido exhibió las altas propiedades antifúngicas, de todos los microorganismos en estudio, el "*Aspergillus parasiticus*" mostró una disminución del crecimiento y la producción de aflatoxina. En este estudio también se encontró que la canela a un en concentraciones bajas de 0.02% inhibió la producción de aflatoxinas por los hongos "*A. versicolor*", "*A. Ochraceus*" y "*Fusarium solani*" como también su crecimiento.

(Matan *et.al*, 2006) utilizaron una mezcla de aceites de canela y clavo de olor contra varios microorganismos que atacan a los alimentos, su estudio fue dirigido contra cuatro especies de hongos ("*Aspergillus flavus*", "*Penicillium roqueforti*", "*Mucor plumbeus*" y "*Eurotium sp.*"), cuatro especies de levadura ("*Debaryomyces hansenii*", "*Pichia membrane faciens*", "*Zygosaccharomyces rouxii*" y "*Candida Lipolytica*") y dos especies de bacteria ("*Staphylococcus aureus*" y "*Pediococcus halophilus*"), este estudio se realizó bajo una atmósfera modificada con concentraciones de CO₂, encontrándose que el hongo "*Aspergillus flavus*" fue más resistente a la inhibición.

(Ranasinghe *et.al*, 2002). En su estudio de la actividad de aceites esenciales de canela y clavo de olor contra patógenos productores de antracnosis aislados de bananas en sus resultados encontraron que los aceites de las hojas de canela y clavo de olor, tenían efectos inhibidores contra "*Colletotrichum musae*" agente causal de la antracnosis en bananas y contra patógenos causantes de pudrición tales como "*Lasiodiplodia*", "*Theobromae*", "*C. musae*" y "*Fusarium sp.*". (Chenga *et.al*, 2005) también reportaron actividad antifúngica de los aceites esenciales de canela.

2.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE MICROORGANISMOS FRENTE A COMPUESTOS DETERMINADOS.

2.8.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR. Ha sido el método más utilizado comúnmente y se emplean las técnicas de cilindros, pocillos o pequeños discos, perforaciones (Merck, 1994).

En la técnica de difusión en agar se procede así: el medio de cultivo se siembra con la correspondiente cepa microbiana de ensayo o mediante vertido en placas sobre el medio de cultivo, en puntos adecuadamente distanciados entre sí, se colocan cantidades definidas del antibiótico a ensayar y del antibiótico estándar como patrón de comparación (Merck, 1994).

Para la aplicación de estos antibióticos se utilizan pequeños cilindros, pocillos o perforaciones practicadas en el medio de cultivo o disquitos con el antibiótico incorporado, durante la incubación se produce alrededor de los puntos de aplicación unos halos de inhibición extensos de crecimiento microbiano y cuyo diámetro constituye una medida relativa de la actividad del antibiótico en cuestión comparando el diámetro de los halos de inhibición del patrón de antibióticos con el antibiótico sometido a ensayo, puede calcularse la actividad de este último. (Merck, 1994).

A continuación se describe las técnicas mas utilizadas para la aplicación de antibióticos a los medios de cultivos.

2.8.1.1 Ensayo mediante cilindro. Se coloca en placas de petri una capa basal utilizando 14 mL del medio de cultivo sembrado. Colocar en el medio de cultivo en vías de enfriamiento los cilindros de acero inoxidable o de vidrio necesarios para la prueba, las placas listas ya para su uso. Pueden conservarse en nevera a temperatura 4 °C tras pipetear en el hueco de los cilindros las correspondientes soluciones del antibiótico, incubar durante 16-24 horas a 37 °C.

Para la interpretación se retiran los cilindros, medir el diámetro de los halos de inhibición, lo mejor es hacerlo con un aparato medidor de zonas o con un proyector de perfiles y evaluar estadísticamente las lecturas efectuadas. A partir de los resultados obtenidos con las soluciones patrón, trazar una curva patrón y leer sobre ella la actividad correspondiente a las soluciones investigadas. (Merck, 1994).

2.8.1.2 Ensayo mediante perforaciones. Mediante un sacabocados se realizan perforaciones en el medio de cultivo sembrado, en los huecos obtenidos se pipetea las soluciones de antibiótico, realizándose las operaciones restantes tal y como se ha mencionado en el ensayo mediante cilindros. (Merck, 1994).

2.8.1.3 Ensayo mediante disquitos (sensidisco). Los pequeños discos de papel de 9mm de diámetro se impregnan mediante goteo, con la correspondiente cantidad de solución de antibiótico y se sitúa estratégicamente sobre la superficie del medio de cultivo solidificado. La impregnación por goteo también puede llevarse a cabo después de haber colocado los disquitos sobre el medio de cultivo. Pueden utilizarse placas con una sola capa de medio de cultivo sembrado con un espesor de 2mm (Merck, 1994).

2.8.1.4 Método Neo Sensitabs. Este método se basa en la adaptación de la técnica en la que el antifúngico se encuentra en forma de tabletas con concentraciones fijas. Es una técnica sencilla y rápida que consiste en sembrar el inóculo estandarizado sobre un medio de cultivo sólido y posteriormente se colocan las tabletas con antifúngicos, en concentraciones fijas y predeterminadas. La difusión radial del antifúngico en el agar crea halos de inhibición concéntrica, como consecuencia del gradiente de concentración formado. La lectura de los resultados se efectúa por la medición de los halos de inhibición en milímetros dada por la difusión concéntrica del antifúngico en torno a las tabletas (Cermeño y Torres Rodríguez, 2001).

2.8.2 MÉTODO DE DILUCIÓN EN AGAR

2.8.2.1 Ensayo mediante soluciones seriadas. Se pipetea diluciones escalonadas del antibiótico sometido a ensayo, en proporciones previamente establecidas en caldo para antibióticos sembrándolas a continuación con una cantidad definida de la correspondiente cepa microbiana de ensayo. (Merck, 1994).

Interpretación: El último tubo que todavía no muestre turbidez alguna de crecimiento, contiene el antibiótico activo a una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria). (Merck, 1994).

2.8.2.2 Ensayo turbidimetrico. Este método es más exacto y más sensible que el método de diluciones seriadas. Se incuban en tubos de cultivos durante 4 horas a 37 °C en baño de maría, 1mL de solución de antibiótico y 9mL de caldo para antibióticos sembrado con el germen de referencia. Al cabo de este tiempo se añade 0,5 mL de una solución diluida de formaldehído para detener el crecimiento del germen de ensayo. Se valora fotometricamente la turbidez.

La interpretación se hace a partir del valor de extinción medido, se calcula la concentración de antibiótico mediante una curva patrón obtenido previamente en idénticas condiciones. (Merck, 1994).

La prueba de sensibilidad a antifúngicos están basadas en las pruebas de difusión y diluciones en agar, los antifúngicos se encuentran bien sea a una concentración fija o a concentraciones diferentes, determinando si el hongo es sensible, resistente o moderadamente sensible, o bien se puede conocer cuantitativamente utilizando una serie de diluciones seriadas que permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). (Merck, 1994).

2.8.3 Antimicóticos más usados a nivel comercial.

2.8.3.1 Anfotericina B y nistatina. El primero es el antibiótico más importante y se usa en el tratamiento de diversos padecimientos micóticos diseminados. Se clasifica como un polieno, destruye la membrana celular micótica a causa de su afinidad por el ergosterol (componentes de las membranas de hongos, pero no de células bacterianas ni humanas). La nistatina es otro antimicótico que debido a su toxicidad se usa tópicamente en infecciones causadas por levadura "*Candida*". (Ingrahan *et.al.*, 1998).

2.8.3.2 Ketoconazol. Es el más importante de una familia de compuestos imidazólicos con actividad antimicótica. Todos bloquean la síntesis de ergosterol. (Ingrahan *et.al.*, 1998).

2.8.3.3 Fluconazol. Es útil en el tratamiento de las infecciones por “*Candida*” y “*Criptococcus*”. (Ingrahan *et.al.*, 1998).

2.8.3.4 Imidazoles y tiazoles. Estos son una familia de antifúngicos relacionados los cuales inhiben el crecimiento de los hongos al interferir la síntesis de los esteroides de sus membranas plasmáticas. Algunos de estos agentes se utilizan de forma tópica en el tratamiento de las infecciones locales, pero otros se usan de forma sistémicos. Los más comunes son: cetoconazol, miconazol, terconazol. (Ingrahan *et.al.*, 1998).

2.8.3.5 Fluorocitosinas. Son drogas sintéticas usadas en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas, muchas especies son resistentes por naturaleza a su acción. (Ingrahan *et.al.*, 1998).

2.8.3.6 Griseofulvina. Esta sustancia fue aislada por primera vez en los años 30 a partir del hongo “*Penicillium griseofulvum*”, es un agente fúngico muy efectivo, inhibe el crecimiento de las células fúngicas porque interfiere en la división celular, los únicos hongos sensibles son los dermatófitos que invaden las células de la queratina de la piel, el pelo, las uñas, estos hongos producen infecciones que se denominan comúnmente tiñas, esta droga es efectiva contra esta clase de infecciones. (Ingrahan *et.al.*, 1998).

2.8.3.7 Pentamidina. Es activa contra hongos y protozoarios, se usa ampliamente en tratamiento de la neumonía provocada por “*Pneumocystis carinii*”. (Warren y Jawetz, 1998).

2.8.4 Fungicidas de uso agrícola.

2.8.4.1 Benomilo. Fungicida sistémico con movilidad local de la familia bencimidazol, recomendado por el control de numerosas micosis foliares y de los frutos producidas por ascomycetos y hongos imperfectos por ejemplo: “*Rhizoctonia solani*”, “*Penicillium spp.*”, “*Venturia spp.*”, “*Monilia spp.*”, “*Botrytis sp.*”, “*Sclerotia spp.*”, “*Cercospora sp.*”, “*Fusarium spp.*”, “*Verticillium spp.*” (Latorre,

1994). En un estudio realizado por (Rojas y Rondón, 1995), encontraron que el hongo "*Fusarium decemcellolare Brick*" el cual causa las agallas del mango es altamente sensible al agroquímico benomil, ya que este patógeno mostró inhibición de su crecimiento y la mezcla de los fungicidas cicloeximida y benomil también lograron una buena inhibición de este hongo.

2.8.4.2 Bromuro de metilo. Tiene acción biocida generalizada. Se utiliza en la esterilización del suelo, en granos almacenados y como tratamiento cuarentenario de frutas de exportación tiene acción fungicida únicamente a altas concentraciones. Los tratamientos se deben aplicar sobre un suelo húmedo con una temperatura superior a 50 °C no utilizar a terrenos destinados al cultivo de claveles. (Latorre, 1994).

2.8.4.3 Carbendazima. Fungicida sistémico de movilidad local de la familia benamidazol recomendado para el tratamiento de numerosas micosis foliares y de los frutos producidas por hongos ascomycetos tienen un espectro de acción similar al benomilo, es utilizado además en el tratamiento de fusariosis, verticilosis, rizoctoniosis en aplicaciones a las raíces, tiene una alta probabilidad de resistencia por lo que se utiliza en mezcla con captan o mancozeb. (Latorre, 1994).

2.8.4.4 Cloroneb. Recomendado para el tratamiento de semillas y localizadamente sobre los surcos de siembra para el control de algunas enfermedades radicales o del cuello producidas por especies de los géneros "*Rhizoctonia*", "*Sclerotium*", "*Fusarium sp.*". (Latorre, 1994).

2.8.4.5 Formalina. Se usa para desinfección de recintos cerrados, desinfección del suelo de los silos de almacén. Tiene acción fungicida, bactericida, herbicida, nematocida y actúa sobre ciertos grupos de insectos. (Latorre, 1994).

2.8.4.6 Miciobutanil. Es un fungicida inhibidor del esterol recomendado para manzanos y peral, presenta un poder erradicante de 96h se utiliza como

insecticida aplicado a la semilla para la prevención de ciertas enfermedades foliares y de la espiga en el trigo y otros cereales. (Latorre, 1994).

2.8.4.7 Procloraz. Inhibidor del esterol de la familia química de los imidazoles, se recomienda para el control de enfermedades foliares del trigo y otros cereales, especialmente septoriosis, ricsporiosis y fusariosis. (Latorre, 1994).

2.8.4.8 Tebuconazol. Funguicida inhibidor de esteroides recomendado para el tratamiento de micosis foliares y de la espiga del trigo y otros cereales, tiene acción sobre septoriosis, helmintosporiosis, roya y fusariosis de los cereales. (Latorre, 1994).

2.9 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA CANELA (“*Cinnamomun zeylanicum*”)

2.9.1 Taxonomía.

REINO: Plantae
DIVISION: Magnoliophyta
CLASE: Magnoliopsida
ORDEN: Laurales
FAMILIA: Laureaceae
GENERO: *Cinnamomun*
ESPECIE: *Cinnamomun Zeylanicum*



Foto Nº 1. “*Cinnamomun Zeylanicum*”

Es un árbol pequeño o arbusto perennifolio originario de Sri Lanka, también se cultiva en Brasil, Birmania, India, Indonesia, India Occidentales e Islas del Océano Pacífico. Puede alcanzar hasta 10m de altura en su estado silvestre, pero se poda en árboles más pequeños y densos para facilitar su cultivo; sus ramas crecen erguidas y recubiertas de numerosas hojas verdes brillantes siendo rojizos los nervios que la recorren, sus hojas son perennes casi opuestas con tres venas prominentes, simples, largas y aromáticas, sus flores son en panículas y hermafroditas, se encuentran agrupadas y originan frutas de color morado. La especia es la corteza interna que se extrae pelando y frotando las ramas que una vez desprendida es separada y vuelta a pelar (Wales, 2001).

2.10 USOS Y APLICACIONES DE LA CANELA (“*Cinnamomun zeylanicum*”)

La canela es una planta a la cual se le han atribuido muchas utilidades para el hombre, por su aroma y buen sabor es un ingrediente que hace parte de la culinaria, se le han otorgado beneficios en el tratamiento y cura de muchas enfermedades por lo que se le considera medicinal, se le atribuye uso industrial puesto que es útil en la elaboración de muchos productos.

2.10.1 Usos alimenticios. La canela es una de las especies conocidas desde la antigüedad, su aroma especial la hace imprescindible en pastelería, los árabes la utilizaban para aromatizar carnes ya que la canela tiene un aceite esencial rico en fenol que inhibe las bacterias responsables de la putrefacción de la carne, se le considera afrodisíaca tanto para platos dulces como salados. (Wales, 2001).

2.10.2 Usos medicinales. La canela se utiliza para tratamientos de infertilidad, también para inducir el parto y remedio para producir más leche materna, para tratar cólicos, dolor de estómago, diarrea, disentería, problemas de la bilis y vómito, malestares del hígado, tos, y neuralgias, es estimulante del apetito, espasmolítico, antidismenorreico, para tratar colitis, gastritis, bronquitis, asma, amenorrea, dermatomicosis, otitis, vulvovaginitis,. (Wales, 2001), la canela estimula la circulación, fortalece el corazón y los pulmones, sudorífica, analgésico, tonifica el bazo y los intestinos, controla secreciones antiinfecciosas, se usa como antídoto, es antihelmíntico, para combatir piojos, gusanos intestinales, picaduras ponzoñosas. (Jaramillo, 2005).

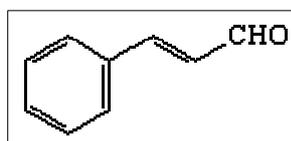
Según (Mang *et.al*, 2006) reportaron que los extractos de canela son utilizados para tratamiento de diabetes mellitus tipo 2, en su estudio encontraron que tenía un efecto positivo en el control de la glicemia y lípidos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

2.10.3 Otros usos de la canela. Se utiliza para aromatizar licores, jabones y dentríficos, también se emplea en la fabricación de almohadillas perfumadas. (Wales, 2001) según (Zhu *et.al*, 2006) los aceites esenciales de la canela tienen

actividad larvica y repelente contra algunas especies de mosquitos entre estas especies se encuentran “*Aedes albopictus*”, “*Aedes aegypti*” y “*Culex pipens pallens*”.

2.11 PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA CANELA (“*Cinnamomun zeylanicum*”)

El principal componente es el aldehído cinámico (3-fenil-acroleina) en un 65-75%, y en un 5-10% se halla presente el eugenol (4-(1-propeno-3-al) o 2-metoxi-fenol), también se encuentran trazas de carburos terpénicos (pineno, cineol, felandreno, linalol, 4-dimetilamilcetona, glucidos mucílagos, taninos, están presentes los fenilpropanoides (safrol, ésteres del ácido cinámico, mono y sesquiterpenos). Otro componente relevante para su calidad es la 2-heptona (metil-n-amil-cetona). El contenido de limo de la corteza es bastante baja (3%). De la hoja de la canela se puede obtener (1%) de otro aceite esencial que puede usarse como sustituyente del clavo de olor, este aceite esta constituido por eugenol (70-95%) y cantidades pequeñas de aldehído cinámico (1-5%) benzoato de bencilo linalol y β -(cariofileno). (Wales, 2001).



3-fenilpropenal
(Aldehído cinámico)

Figura Nº 6. Estructura química del aldehído cinámico (3-fenilpropenal), también llamado (3-fenil-acroleina) principal componente de la Canela “*Cinnamomum zeylanicum*”.

2.12 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CLAVO DE OLOR (*Syzygium aromaticum*) / (*Eugenia aromática*).

2.12.1. Taxonomía

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Myrtaceae*

Género: *Syzygium*

Espécie: *Syzygium aromaticum*

Sinónimos: *Garifallo, Garifano, Pimienta de Castilla, Abanga.*



Foto Nº 2. “*Syzygium aromaticum*”

Es un árbol de la familia de las mirtáceas que tarda unos 20 años en desarrollarse, con una altura entre 12 y 15 metros, este árbol puede seguir produciendo fruto hasta 50 años. Sus hojas se parecen bastante a las del Laurel, las flores tienen pétalos amarillos. En Indonesia se produce la mayor cosecha de clavo de olor, le siguen Madagascar, Tanzania, Sri Lanka, Malasia y la Isla de Granada. El clavo de olor posee un aroma fuerte, este árbol da un fruto de color rojizo o amarillo. (Arpides, 2006).

2.13 USOS Y APLICACIONES DEL CLAVO DE OLOR

El clavo al igual que la canela, es una planta de gran utilidad para el hombre, forma también parte de la preparación de comidas, es medicinal por sus propiedades benéficas en el tratamiento de muchas enfermedades y es considerada de uso industrial.

2.13.1 Usos alimenticios. Se usa en la preparación de comidas debido a que es un agente que proporciona fragancia y sabor, acompaña muy bien a los platos dulces y los salados, en preparaciones de pollos, guisados de conejo, arenques, jamón glaseado, plátanos asados y se usa en pastelería, en la preparación de arroz y vinos. (Arpide, 2006).

2.13.2 Usos medicinales. Para el mal aliento y dolor de muela, el aceite en combinación con pasta de óxido de zinc es eficaz para la alveolitis seca, los estudios en animales indican que puede reducir la fiebre, sirve para el dolor abdominal, alergias, arteriosclerosis, es antihistamínico, antioxidante, antimutagénico, para intoxicaciones inducidas por arseniato (prevención), para el tratamiento de asma, pie de atleta, (Wales, 2001; Arpides, 2006). Los sesquiterpenos del clavo de olor tienen propiedades anticancerígenas, experimentos demostrados en ratas evaluando la infusión de brotes reduce el cáncer de pulmón, el deshidroeuugenol y el trans-coniferilaldehído son eficaces contra algunos agentes mutagénicos que participan en el desarrollo de cáncer. (García González y Vázquez, 2006).

2.13.3 Otros usos del clavo de olor. En la industria farmacéutica y de cosméticos, es antibacterial, antihongos, para larvas o parásitos, es repelente de mosquitos (tópico), el eugenol es un constituyente del clavo de olor, en pasta o mezclado como cemento dental se usa como relleno y material de restauración, el aceite de esta planta se usa en el ganado para impedir la fermentación bacteriana. (Wales, 2001).

2.14 PRINCIPIOS ACTIVOS DEL CLAVO DE OLOR (“*Syzygium aromaticum*”)

Está compuesto de eugenol en un 72-90%, de taninos en un 10-13%, de varios ácidos, ésteres triterpénicos, sitosterol, estigmasterol, carinprestrol y trans-coniferilaldehído.

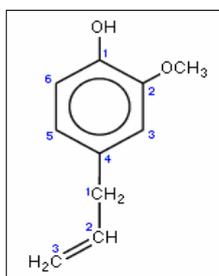


Figura Nº 7. Estructura del eugenol, uno de los principales compuestos químicos del clavo de olor y canela.

2.15 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL MAÍZ (“*Zea mays*”)

2.15.1. Taxonomía

Reino: Plantae

Clase:

Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae o gramíneas

Genero: *Zea*

Especie: *Zea mays*

Sinónimos: borona, cotufa.



Foto N° 3. “*Zea mays*”

El Maíz (“*Zea mays*”) es una gramínea originaria de América actualmente es el cereal mas plantado en el mundo en volumen de producción superando el trigo y el arroz (Wales, 2001). Los principales productores son EE.UU., China, Unión Europea, Brasil y México, en Colombia las mayores producciones están en la región del Caribe y en la región Andina, la cual es de gran importancia en la producción de maíz, también se cultiva en los llanos orientales y en la región Pacífica, requiere una temperatura entre 25- 30 °C, alta incidencia de luz solar y exige una cantidad de agua de 5mm al día. (Salgar, 2004). Tiene flores masculinas que se encuentran en verticilos terminales y las femeninas en espigas axilares, ambas flores se encuentran en una misma planta por lo cual se considera monoica; es anual y de rápido crecimiento el cual le permite alcanzar hasta los 2,5m de altura con un tallo erguido, rígido y sólido, hojas largas y puntiagudas. (Wales. *Op.cit*).

2.16 USOS Y APLICACIONES DEL MAIZ (“*Zea mays*”)

El Maíz es un cereal muy cultivado a nivel mundial, su importancia radica en sus numerosas utilidades alimenticias tanto humana como animal, lo que hace de él un producto altamente comercializado, se le atribuyen algunos usos medicinales

para el tratamiento de algunas enfermedades, esto sumado a sus propiedades de uso industrial.

2.16.1 Usos alimenticios. Es un alimento rico en nutrientes, puede cocinarse entero o desgranado en sopas, ensaladas, coladas, y otras comidas, en la fabricación de arepas, tamales, harinas, papas fritas, fermentación alcohólica para la fabricación de chichas, el aceite es uno de los mas usados para freír alimentos (Wales, 2001).

2.16.2 Usos medicinales. La cabellera del maíz tiene propiedades diuréticas con acción eficaz, se usa para tratar enfermedades del sistema urinario tales como cistitis, uretritis, prostatitis, oligurias, nefritis, incontinencia nocturna, (Wales, 2001; Jaramillo 2005; Restrepo *et al*, 2005).

Se usa para tratar otras enfermedades tales como arteriosclerosis, gota, obesidad, hipertensión arterial, colesterol alto, artritis, inflamación infecciosas de encías y boca, diarreas, afecciones digestivas, la decocción del capacho de maíz se usa para detener hemorragias menstruales y la estimulación de la glándula tiroides (Jaramillo, 2005; Restrepo *et al*, 2005).

2.16.3 Otros usos. A partir de los granos se obtiene alcohol que mezclado con gasolina se emplea como carburante; se ha extraído un polímero que puede ser sustituyente del petróleo; la amilopéctina se utiliza en la fabricación de pañales desechables ya que es súper adsorbente (Plaza y James, 1994; Wales2001, Jaramillo, 2005, Restrepo *et al*, 2005).

2.17 COMPOSICION QUIMICA DE LAS PARTES DEL GRANO DE DE MAIZ

La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a la vez esta formada por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%). El endospermo contiene en cambio un elevado nivel de almidón (87%), aproximadamente 8% de proteínas y un

contenido de grasa cruda relativamente bajo. Por último el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas (33%) y un elevado nivel de proteína (20%). El maíz contiene alrededor del 10% de sustancia nitrogenada y un 60- 70% de almidón y azúcares del 4 al 8% de materias grasas, el resto hasta las 100 partes es agua, celulosa y sustancias minerales.

Entre las materias nitrogenadas se encuentran la zeína, la edestina, (una globulina), la maizina (en tres formas a, b, g), 60 partes de fécula, otras 20 se hallan convertidas en dextrina y la porción restante en glucosa y sacarosa casi a partes iguales (Wales, 2001).

2.18 ALGUNAS DE LAS ENFERMEDADES MÁS COMUNES EN EL MAÍZ (“*Zea mays*”).

2.18.1 Fusariosis. Produce pudrición del pie, es producida por “*Fusarium moniliforme*” y “*Fusarium graminearum*”, los síntomas son pudrición blanda y rojiza de los internodos, las bases del tallo presentan una coloración rojiza o púrpura, marchites y maduración anticipada con la total desecación de la parte aérea mucho antes de lo normal. En zonas con veranos cálidos y lluviosos ocurre una importante pudrición parcial o generalizada de las mazorcas. (La Torre, 1999).

2.18.2 Mohos en maíz almacenados. Los hongos más comunes durante el almacenamiento son los “*Aspergillus spp.*”, “*Penicillium spp.*”, “*Rhizopus spp.*”, “*Mucor spp.*”, “*Alternaria spp.*”. En las semillas se presenta un moho superficial con una coloración variable de acuerdo con el agente causal predominante, estos granos almacenados presentan un aumento de la temperatura y aparecen olores a fermentación bastante penetrantes, son frecuentes al almacenar semillas con contenidos de humedad relativamente altos, sobre 15% y temperaturas entre 21 y 30 °C (La Torre, 1999).

2.18.3 Pudrición de semillas y caída de planta. Los agentes más comunes que causan estas patologías son: “*Fusarium spp.*”, “*Pythium spp.*”, “*Rhizoctonia spp.*”, “*Exserohilum spp.*”, “*Pedicellatum spp.*”, “*Helminthosporium spp.*”, y sus síntomas

son clorosis, marchites, tendidura y muerte de plantas recién emergidas. (La Torre, 1999).

2.19 ALGUNAS DE LAS PLAGAS MÁS COMUNES DEL MAÍZ

Es importante mencionar las plagas mas comunes de este cereal, puesto que ellas son un factor influyente en la contaminación de los granos con hongos de los cuales muchos son toxigénicos, esta influencia ejercida por dichas plagas se debe a que ellas pueden romper el grano o causar deterioros que facilitan la entrada de los agentes micóticos o también porque tienden a volverse más susceptibles al deterioro de los granos, los insectos del maíz también hacen parte de la diseminación y son fuentes de inóculo de los hongos ya que los conidios del hongo pueden ser llevados en el cuerpo del insecto, algunos mohos como "*A. flavus*" esporulan sobre el cuerpo de insectos muertos. Así mismo coleópteros de la familia "*Nitidulidae*" llevan interna y externamente conidios de "*A. flavus*" los cuales adquieren bien sea de desechos orgánicos de maíz ("*Zea mays*") en el suelo o de mazorcas con daños primarios. (Mazzani *et.al.*, 2004; Aragón y flores, 2005).

2.19.1 Insectos de los granos en el campo y en el almacenamiento. Hay 13 especies de insectos que están bien adaptados para vivir en los granos del maíz almacenados y que son responsables por la mayor parte del daño que sufren, tanto en el campo como en las condiciones de almacenamiento comercial. Estos insectos son considerados peste de primera importancia porque pueden atacar granos enteros y sanos. Además hay 175 especies de insectos y ácaros consideradas secundarias pero que pueden ser dañinas, cuando son abundantes bajo condiciones ambientales especiales como falta de higiene, alto contenido de humedad del grano, altas temperaturas y granos no debidamente procesados, pueden convertirse en enemigos importantes, entre ellos se encuentran los escarabajos ("*Coleóptero*") tales como el gorgojo grande del arroz "*Sithophilus Zea mays*", el gorgojo pequeño del arroz "*Sithophilus granarius*", barrenador pequeño de los granos "*Rhyzoperhta dominica*", barrenador grande de los granos

“*Prostephanus truncatus*”, tribolio confuso de la harina “*Tribolium castaneum*”, escarabajo chato de los granos “*Cryptolestes pusillus*”, escarabajo ferruginoso de los granos “*Cryptolestes ferrugineus*” y polillas tales como “*Sitotroga cerealella*”, “*Plodia interpunctella*”, “*Ephestia kuehniella*”. (Lepidópteros). (Granados, 2001).

2.19.2 Plagas que atacan semillas en germinación y plántulas. Estas plagas se consideran dañinas, ya que aquellas que atacan la semilla pueden impedir la germinación, o las que logran germinar pueden generar plantas enfermas; las plagas que atacan alguna parte de las plantas, bien sea las hojas, tallos o raíces pueden enfermar las plantas causando síntomas como retardo del crecimiento, marchites, volcamiento de la planta, infertilidad y muchas veces la muerte. (Bartolini, 1990), (Granados, 2001).

Entre las plagas mas representativas se encuentran: “*Hylemia sp.*”, conocida como larva de la semilla de maíz, escarabajos tales como “*Chaetocnema pulicaria*”, “*Melaheimer*”, “*Chaetocnema spp.*”, “*Chrysomalidae*”, la larva en espiral del maíz en la que se destacan especies como “*Euxesta mazorca steyskal*”, “*Euxerta stigmatica*”, “*Euxerta spp.*”, moscas de los brotes del maíz entre las que se encuentran “*Athengona soccata*”, “*Athengona paquii steyskal*”; también se destacan los elateridos mas conocidos como alfileretes o gusanos de alambre (Bartolini, 1990; Granados, 2001).

2.19.3 Insectos de la panoja y la mazorca. Estos insectos pueden causar daños como marchitamiento y amarillamiento en los tejidos afectados, muchos de ellos contribuyen al ataque del maíz por otros insectos aun más dañinos, o bien contribuir al ataque de aquellos insectos que favorecen las infecciones fúngicas de “*Zea mays*”; muchas de estas plagas también son capaces de destruir semillas por completo.

Entre estos tipos de insectos que atacan la panoja y la mazorca se encuentran: Los áfidos como “*Helicoverpa Zea boddie*”, “*Rhopalosiphum maidis*”, miriápodos y ciempiés. También se pueden encontrar los picudos tales como “*Shenophorus*

maidis", "*S. aequalis*", como también los gusanos blancos, babosas y tucuras. (Bartolini, 1990; Granados, 2001).

2.19.4 Otros insectos perjudiciales de "*Zea mays*". Existen otros insectos que pueden causar daños al maíz, bien sea porque pueden reducir la producción de este cereal, algunos de ellos que producen agujeros son claves en la contaminación fúngica, otros producen la desecación de la planta y cuando el ataque es muy fuerte pueden producir la muerte (Bartolini, 1990), (Aragón y Flores, 2005).

Entre los insectos más representativos se encuentran: el parásito conocido como la "*altica*" del maíz, este al igual que el taladro producen la muerte, la araña roja "*Tetranychus urticae*", la rosquilla negra, la cual se considera muy peligrosa porque puede destruir grandes hectáreas de cultivo en una sola noche (Bartolini, 1990), (Aragón y Flores, 2005).

3. METODOLOGÍA

3.1 SITIO DE MUESTREO O MICROLOCALIZACION

Las muestras de "*Zea mays*" fueron recolectadas en tiendas y graneros de la cabecera municipal de Sincelejo (Sucre), la cual se encuentra localizada a los 09° 18' 17" de latitud norte y 75° 23' 52" de longitud oeste, con una altura de 200 m sobre el nivel del mar, sus tierras están comprendidas en el piso térmico calido, presenta una temperatura media de 27°C y una precipitación media anual de 1214 mm, el área municipal es de 292 Km², limita por el norte con Tolúviejo y Morroa, por el este con Morroa y Corozal, por el sur con Sampués y el Departamento de Córdoba y por el oeste con Palmito y Tolú. En el territorio se distinguen dos áreas orográficas, al occidente una faja plana y la otra ondulada y más extensa que comprende las estribaciones de la serranía de San Jacinto, localmente conocida como montes de María donde se levanta la ciudad de Sincelejo (Rabal Y Zuzagua, 1996).

3.2 RECOLECCION, PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE "*Zea mays*", EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE RECuento EN PLACA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS.

Se recolectaron 39 muestras, en un período comprendido entre abril de 2005 y agosto de 2006, se muestrearon un total de 32 tiendas en 8 barrios de la cabecera municipal de Sincelejo, en cada barrio se escogieron al azar 4 tiendas, en cada una de ellas se tomó una libra de maíz y en 7 graneros del mercado público "El Papayo" se tomó una muestra de maíz de una libra. Cada una de estas muestras se les observaron sus características organolépticas (granos dañados, maíces partidos, presencia de insectos), se prepararon 135 mL de agua peptonada estéril al 0.1%(ver anexo 2.3 sobre preparación de este reactivo), de éste volumen se adicionaron en cuatro tubos de ensayo 9 mL en cada uno y 99 mL en un beaker que contenía 11g de "*Zea mays*", molidos, dejándose por media hora, transcurrido

este tiempo se agitó manualmente para homogenizar la mezcla, posteriormente se procedió a preparar diluciones seriadas 10^{-2} y 10^{-3} del homogenizado (con los tubos replica se aplicó el mismo procedimiento).

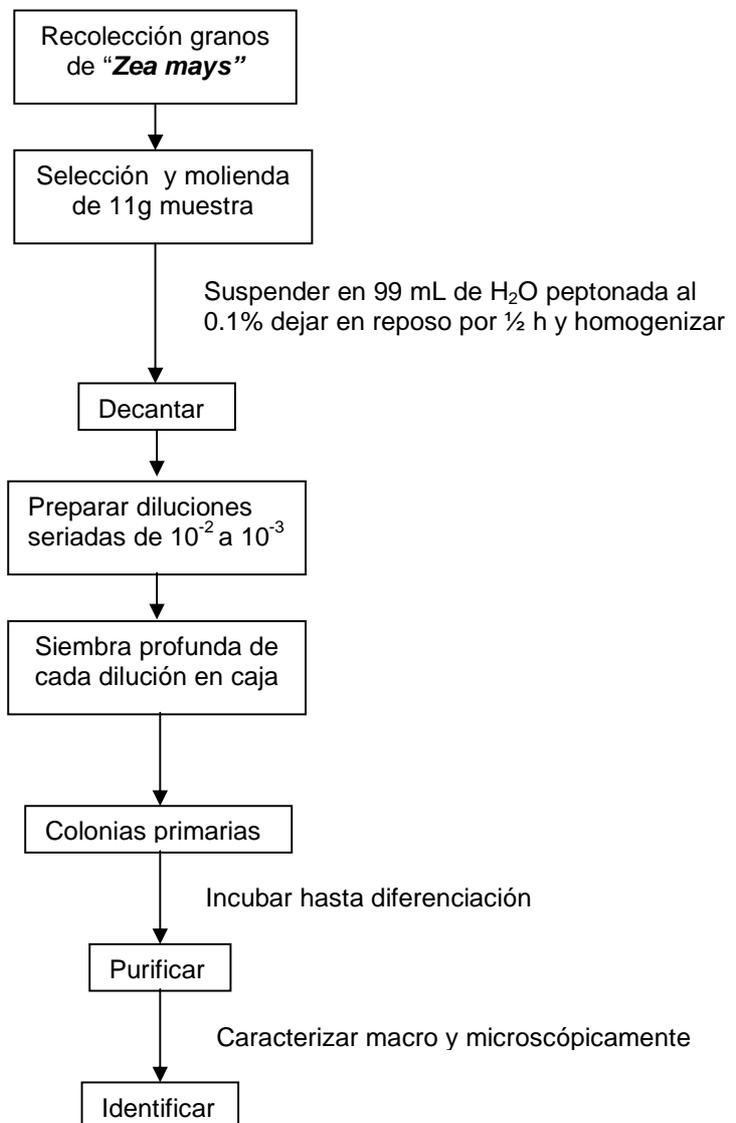
3.2.1 Cultivo aislamiento y purificación de hongos. De cada dilución seriada se tomo 1mL adicionándose en cajas de petri estéril, más 20 mL de medio YGC tibio (técnica de siembra profunda) (ver preparación de este reactivo en anexo 2.2), luego fueron rotuladas, selladas con papel cristaflex, y llevadas a la incubadora por 3 días a una temperatura promedio de 35 °C, cumplido este tiempo se procedió al recuento en placa. (Madigan *et.al*, 2004). (ver anexo 6, sobre normas para establecer el recuento en placa, Tabla N° 27).

También se realizó un análisis de ucf/g en cuatro marcas de harina comerciales, aplicándoseles la misma metodología para la preparación de diluciones en muestras de “*Zea mays*” molido así como también para el recuento en placa (véase la metodología en el Anexo N° 5 y en la Tabla N° 26 de dicho Anexo).

Se incubaron nuevamente a la misma temperatura hasta la diferenciación de las colonias crecidas, una vez diferenciadas visualmente se hicieron repiques sucesivos, estando totalmente aislados y purificados, se detallaron visualmente las características macroscópicas (color, textura, forma y tamaño de las colonias), posteriormente se realizaron montajes al microscopio óptico en los objetivos de 40X y 100X impregnando una cinta adhesiva con muestra fúngica tomadas de los cultivos de las cajas de petri, colocando dicha cinta a un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Detalladas todas la características macro y microscópicas se procedió a la respectiva identificación de los hongos y su respectivo genero con la ayuda del manual de (Carrillo, 2003).

En las muestras de harinas comerciales se identificaron también las especies de hongos presentes con el manual de (Carrillo, 2003), (ver Fotos N° 39 a 43 del anexo 5).

Figura N° 8. Metodología utilizada para el aislamiento e identificación de hongos presentes en “*Zea mays*”, a si como el recuento en placa.



3.3 DETECCIÓN DE LAS AFLATOXINAS PRESENTES EN MUESTRAS DE “*Zea mays*” BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOENSAYO (ELISA).

Se recolectaron 18 muestras de “*Zea mays*” (2 por cada tienda) en los barrios: El campo, El porvenir, Pioneros, Ciudadela universitaria, Villa Mady, Calle el campo, de la cabecera municipal de Sincelejo.

Se escogieron 9 muestras, de cada una de ellas se tomaron 2 onzas colocándose en vasos higiénicos desechables, a las cuales se les agregó 1 mL de agua, en un lugar fresco y con poca luz por un tiempo de 7 días, las otras 10 muestras fueron dejadas en condiciones normales, cumplido este tiempo se molieron, se colaron sucesivamente hasta obtener partículas finas y diminutas; una vez realizado esto a cada una de las muestras se les realizó el inmunoensayo mediante el protocolo del kit Agri screen para detectar aflatoxinas, el ensayo se hizo de la siguiente forma:

Se agregaron 5g de "Zea mays" molido y 20 mL de metanol al 70% a un frasco, se tapó, se agitó por 20 segundos, dejándolo reposar 3 minutos; cumplido este tiempo se tomó una jeringa filtro Neogen^R de 5 mL, el sobrenadante obtenido en la jeringa se vertió quitando el embolo en un tubo plástico colector y se procedió así:

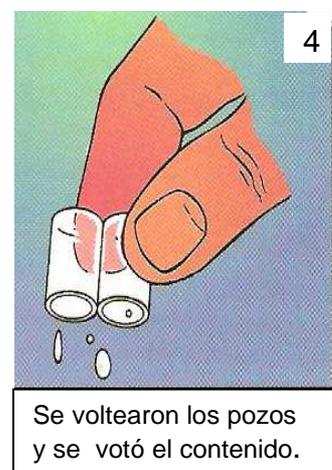
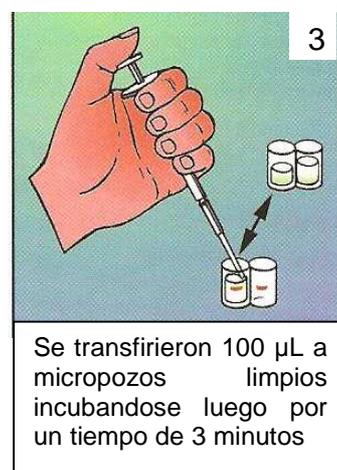
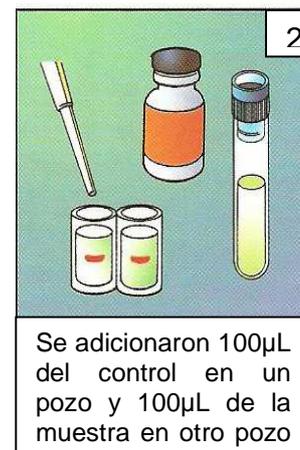
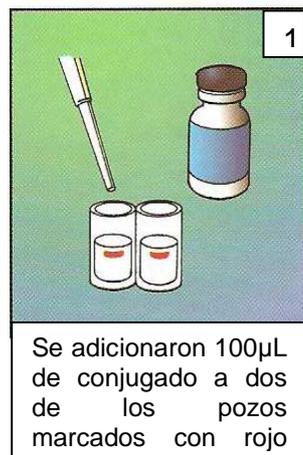




Figura N° 9. (1-9). Detección de las aflatoxinas presentes en “*Zea mays*” por la técnica de inmunoensayo (ELISA).

3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR REFLUJO

3.4.1 Extracto de la corteza de canela con ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol. Se tomaron 100 g de la corteza de canela “*Cinnamomun zeylamicum*” los cuales fueron molidos y colocados en un balón de vidrio de fondo plano, agregándosele ciclohexano hasta cubrir totalmente el material vegetal, a continuación fue llevado al baño María, por 3 horas a un rango de temperatura de

80.2 °C cumplido este tiempo se procedió a filtrar con papel filtro watman, recogiendo este filtrado en un balón de fondo redondo, fue concentrado a presión reducida en un rotavapor por un tiempo de 3 horas a la misma temperatura.

El residuo vegetal es sometido nuevamente a extracción con solvente de mayor polaridad en este caso cloroformo (Pe 61°C) procediéndose de igual forma que en el caso anterior. Para el extracto con acetona (Pe 56.5 °C) y metanol (Pe 65.4 °C) se procede de la misma manera.

Para obtener los extractos de los capullos de clavo de olor con ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol se procedió de igual forma que para obtener los de la corteza de canela. (Ver Figura N° 10).

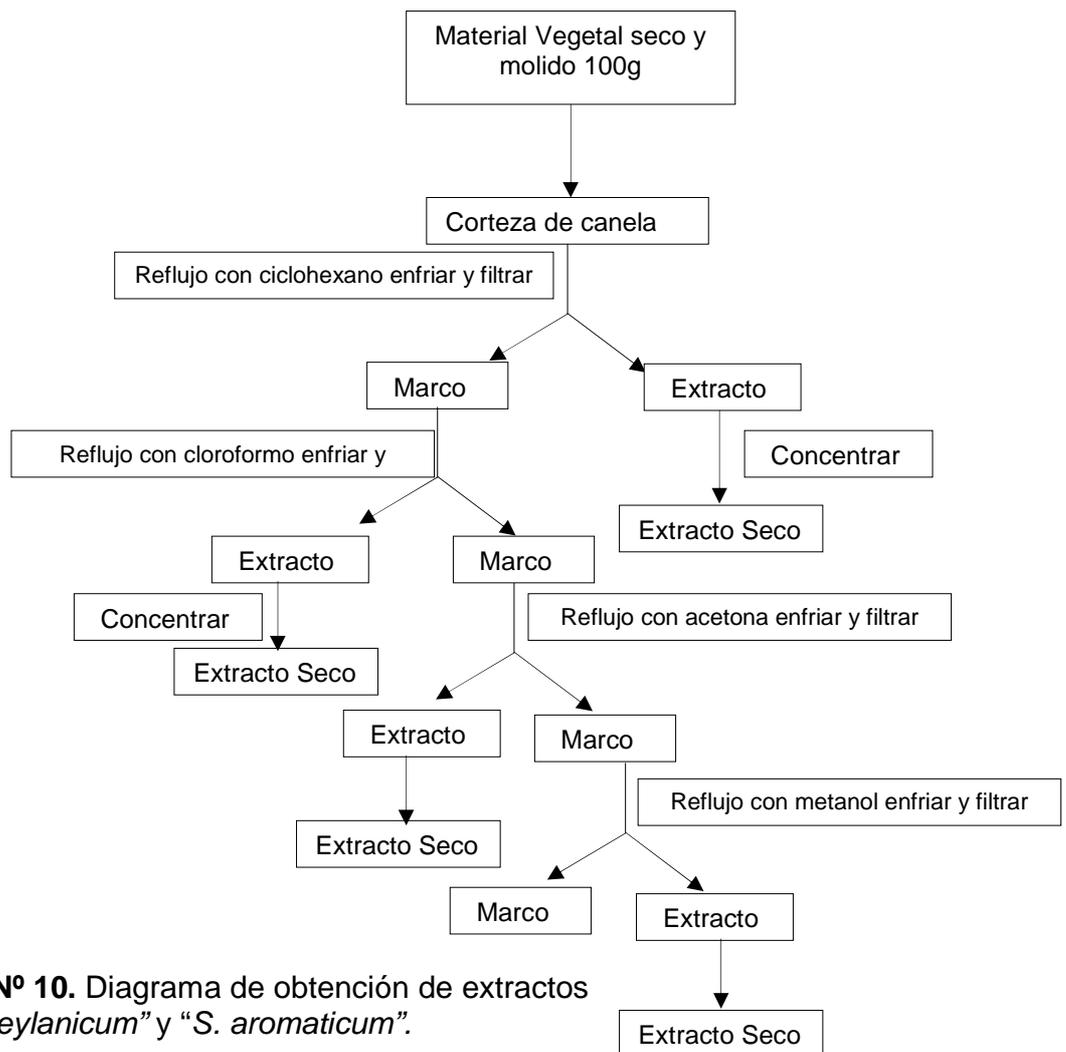


Figura N° 10. Diagrama de obtención de extractos de “*C. zeylanicum*” y “*S. aromaticum*”.

3.4.2 Screen Fotoquímico.

3.4.2.1 Prueba para determinar presencia de alcaloides. Se tomaron 10 g de canela molida ("*Cinnamomum zeylanicum*") y se agregó ácido clorhídrico al 5% hasta que la canela ("*Cinnamomum zeylanicum*") quedó totalmente impregnada y se mezcló; se llevó a una estufa hasta ebullición (de 5 -10 minutos) y se distribuyó el filtrado en 6 viales, posteriormente a cada uno se le agregó un reactivo diferente: ácido fosfotungstico (3 gotas), reactivo Erlyc (3 gotas), reactivo Hager, Dragendorff, Solución de Erban y 20 gotas de ácido sulfúrico, Wagner (3 gotas). Se considera que hay buena presencia de alcaloides si al realizar las pruebas con los 6 reactivos resulta positiva para al menos 4 de ellas.

Para realizar el resto de pruebas se tomaron 80g de canela ("*cinnamomum zeylanicum*") y se le agregó etanol hasta que quedó impregnada y se mezcló, luego se dejó con etanol por 5 días (método de percolación).

3.4.2.2 Prueba para determinar presencia de quinonas. Para esta prueba se tomó el extracto etanólico de canela ("*Cinnamomum zeylanicum*") y se disolvió con cloroformo, luego se secó por calentamiento cerca de una estufa, pero no en contacto directo con esta, una vez seco, se agregaron 5 mL de solución etanol-agua (1:7), se agregó 1 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 1 mL de solución ácido sulfúrico-agua (0,5:0,5), se llevó al baño de maría por 15 minutos; transcurrido este tiempo se agregó 5 mL de benceno y luego se llevó a un embudo de separación presentándose dos fases, de las cuales se tomó la fase bencénica y se le agregó 1 mL de solución de Hidróxido de Amonio al 2%, al cual se le adicionó Hidróxido de Potasio (KOH), una vez agregada esta solución a la fase bencénica debe presentarse una coloración rosada, para que la reacción pueda ser considerada positiva.

3.4.2.3 Presencia de Flavonoides. Se tomaron 0.2 mL de extracto etanólico de canela ("*Cinnamomum zeylanicum*"), se completó con 0.8 mL de agua destilada, se le agregó 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado y limaduras de magnesio (5 pedacitos aprox); la reacción se considera positiva si se da un cambio de la coloración inicial a naranja.

3.4.2.4 Presencia de fenoles. Se tomaron 0.2 mL de extracto etanólico de canela ("*Cinnamomum zeylanicum*"), se completó con 0.8 de agua destilada y se agregaron 3 gotas de cloruro férrico (FeCl_3), para que la reacción se considere positiva debe haber cambio de coloración.

3.4.2.5 Presencia de taninos. Esta prueba se realizó en extracto acuoso, para esto se tomaron 10g de canela molida, se le agregó agua destilada hasta estar totalmente cubierta, se calentó hasta hervir, luego se filtró y se tomaron 5 mL y se adicionaron en un vial, al que posteriormente se le agregó una solución de gelatina-sal, se considera positiva esta prueba si se observa un precipitado.

3.4.2.6 Presencia de terpenos. Se tomó el extracto etanólico de canela, se le adicionaron 5 mL de cloroformo y se llevó a un embudo de separación, formándose dos fases, la fase cloroformica se recoge en un vial al cual se le agregó 0.2 mL de ácido acético y 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4); la prueba se considera positiva si hay cambio de coloración.

3.4.2.7 Presencia de Saponinas. Se tomaron 5 mL de extracto etanólico de canela, se vertió en un tubo de ensayo, luego se sometió a una agitación manual fuerte durante un tiempo de 10 minutos, la prueba se considera positiva si las espumas formadas durante la agitación permanecen por lo menos 5 segundos .

En el tamizaje fitoquímico para el clavo de olor se procedió de la misma forma que con la canela.

3.5 Evaluación de la actividad biológica de los extractos en ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol de la corteza de canela y los capullos de clavo de olor a diferentes concentraciones.

Una vez realizado el proceso de aislamiento e identificación de los hongos presentes en las muestras de maíz "*Zea mays*" se escogieron 7 de ellos (los primeros en aislar) los cuales fueron: "*A. flavus*", "*Mucor sp. (1*)*", "*A. niger*",

“*Fusarium sp.*”, “*P. purpurogenum*”, “*Penicillium sp. (1*)*”, “*Paecylomices sp.*”, esto con el fin de realizar las pruebas de la actividad biológica. (* Esta numeración se utilizó para distinguir a las especies de un mismo genero las cuales no fueron identificadas).

La técnica utilizada fue el método de difusión en agar para lo cual se realizaron perforaciones(pozos de 6 mm de diámetro y 5 mm de profundidad) en el medio agar Sabouraud contenido en cajas de petri (ver preparación de este reactivo en el anexo 2.1), esto se hizo con la punta de un asa de Hockey, a continuación se agregó un poquito de agar Sabouraud liquido en los pozos realizados con el fin de sellar la parte inferior de estas perforaciones, para que al ser agregados los extractos no quedaran en contacto directo con el vidrio de la caja y permitir en forma correcta la difusión, una vez sólido, se agregaran en cada pozo en forma individual las 4 diluciones a diferentes concentraciones: [30 mg/mL], [20 mg/mL], [10 mg/mL] y [2 mg/mL]. De cada uno de los extractos de canela “*Cinnamomun zeylamicum*” y clavo de olor “*Sizygium aromaticum*”: en ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol, la cantidad agregada en cada pozo fue de 0.1 mL (3 gotas) los cuales se tomaron con una micropipeta de 1000 µL. Las diluciones realizadas se prepararon de la siguiente forma: cada extracto por encontrarse en estado sólido fue disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO), esto con el fin de obtener una solución madre o stock de concentraciones de [100 mg/mL], de cada una de ellas se prepararon 4 diluciones con distintas concentraciones: Dilución I [30 mg/mL], Dilución II [20 mg/mL], Dilución III [10 mg/mL] y Dilución IV [2mg/mL].

A continuación las siguientes figuras explican la ubicación de cada uno de los pozos realizados en el medio agar Sabouraud de la caja de petri y la forma como fueron aplicadas las cuatro diluciones de cada uno de los extractos mencionados.

La Figura N° 11a. muestra Las concentraciones de un respectivo extracto, se distribuyeron aplicando en una caja de petri las diluciones I [30 mg/mL] y dilución II [20 mg/mL] en los pozos de los cuadrantes superiores de una caja y en el pozo del centro Dimetilsulfoxido puro como control negativo(0.1mLI).

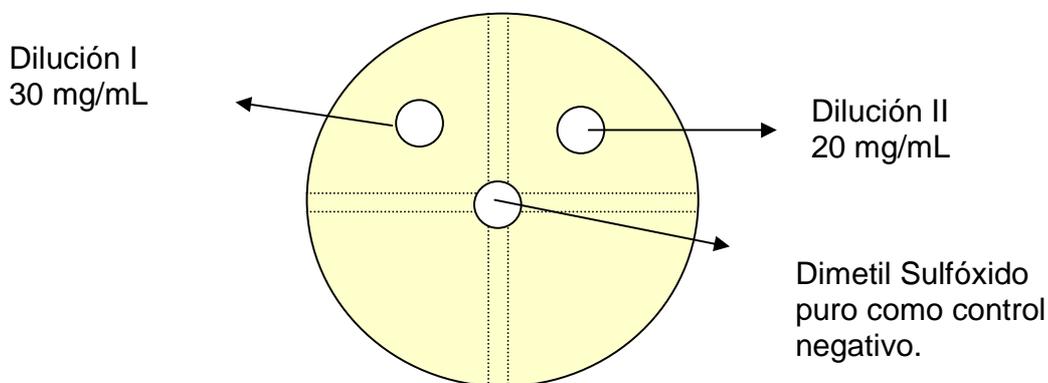


Figura N° 11 a. Forma de aplicación de los extractos de “*C.zeylanicum*” y “*S. aromaticum*” (diluciones I, II y control negativo (DMSO) en cajas de petri.

En otra caja se realizaron dos pozos donde se agregaron las diluciones III 10 mg/mL y dilución IV 2 mg/mL (ver Figura 11B).

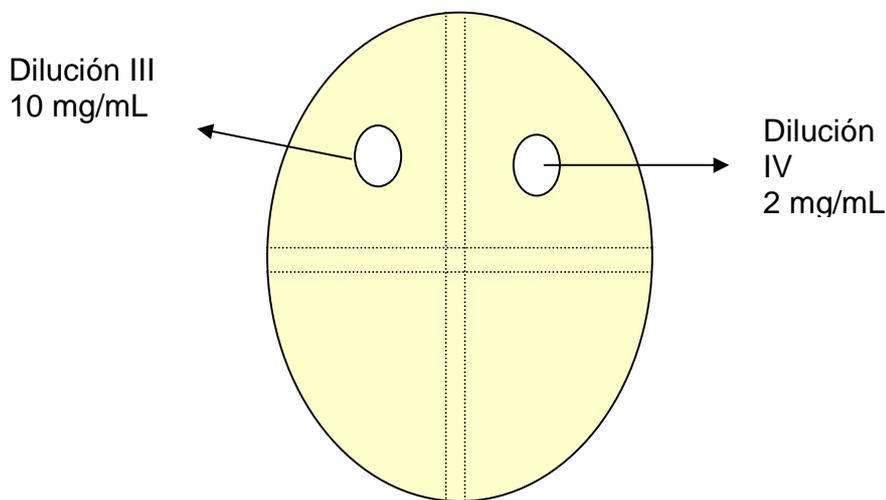
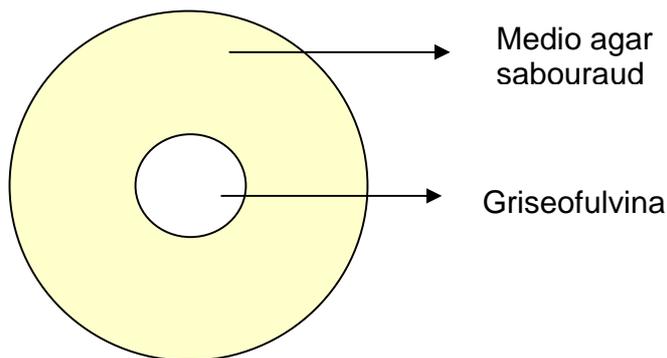


Figura N° 11B. Forma de aplicación de “*C. zeylanicum*” y “*S. aromaticum*”. (Diluciones III Y IV) en cajas de petri.

Figura N° 11C. En otra caja de petri se realizó una perforación en el centro donde se agregó el control positivo Griseofulvina (antifúngico comercial) 1000 mg/mL, este control positivo se preparó de la siguiente forma:

Figura N°11 c. Forma de aplicación del control positivo Griseofulvina en cajas de petri.



Las concentraciones trabajadas para este antifúngico fueron 0.2 mg/mL, 30 mg/mL y 1000 mg/mL, este control positivo se preparó de la siguiente forma:

Se partió de 2500 mg en 5 tabletas de 500 mg cada una, por no encontrarse totalmente puro el compuesto, se le realizó un proceso de extracción y purificación, para esto las tabletas fueron trituradas y maceradas con etanol, una vez mezcladas se les agregó más etanol, se dejó en reposo y se filtró para su posterior concentración. El concentrado se monitoreó por cromatografía en capa delgada para comprobar su pureza, cuando estuvo seco se verificó su punto de fusión, comparando el obtenido con el de la literatura para corroborar que la griseofulvina obtenida se encontraba pura, una vez verificado el punto de fusión se preparó una dilución 10 veces menor que la mínima para los extractos [2mg/mL], la cual fue de [0.2 mg/mL], otra de [30 mg/mL] y una de [1000 mg/mL]. Estos procedimientos fueron aplicados también para las cajas replica así como para cada uno de los extractos: en ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol.

Una vez agregadas las diluciones de los extractos en los pozos y el patrón Dimetil sulfóxido de cada uno de los cultivos de los respectivos hongos ("*A. flavus*", "*Mucor sp. (1*)*", "*A. niger*", "*Fusarium sp.*", "*P. purpurogenum*", "*Penicilium sp.*

(1*)", "*Paecilomyces sp.*"; (* indica una numeración asignada para distinguir aquellas especies de un mismo genero las cuales no fueron identificadas). Se tomó una muestra fúngica con una asa microbiológica y se inoculó en 10mL de caldo nutritivo (ver preparación de este reactivo en el anexo 2.4), llevándose al vortex hasta que estuvo completamente mezclado: a continuación se tomó 0.1mL del inóculo con una micropipeta de 1000mL agregándose a una caja de petri con medio agar sabouraud, el inóculo fue esparcido por toda la caja de petri con un asa de hockey, este procedimiento se realizó para todos los hongos mencionados y para las cajas replicas, las cajas fueron rotuladas, selladas con papel cristaflex e incubadas a 35 °C por 3 días, cumplido este tiempo se observó visualmente si hubo crecimiento del hongo en cada una de las cajas petri o si por el contrario se presentó inhibición de tal crecimiento (sensibilidad al extracto a una determinada concentración), esto se pudo verificar por la presencia de halos de inhibición o calvas alrededor del pozo donde se aplicó una determinada concentración de cada uno de los extractos mencionados anteriormente, mientras que los pozos donde se aplicó una determinada concentración del extracto, la cual no produjo sensibilidad, se observaron totalmente cubiertos por el micelio fúngico; en los pozos donde se presentó inhibición del crecimiento se realizaron mediciones con una regla para determinar el diámetro de estos halos, tomándose tres mediciones y promediándolas para obtener dicha medida, este procedimiento fue realizado para cada uno de los pozos con cada una de las 4 concentraciones evaluadas, para cada uno de los extractos y para cada hongo tomando estas medidas en cada uno de las cajas petri y sus respectivas replicas.

Para preparar las soluciones Stock y sus respectivas diluciones se realizaron los cálculos de volumen y concentración con base en la formula $V_1C_1= V_2C_2$.

En las siguientes tablas N° 1 y N° 2 se muestran las cantidades en mg de extracto sólido del tamizaje vegetal de la corteza "*Cinnamomun zeylamicum*" y de los capullos de clavo de olor "*Sizygium aromaticum*", de cada uno de los extractos en ciclohexano, cloroformo, acetona y metanol de los cuales se partió y los volúmenes de DMSO en mL utilizados para preparar las soluciones stock a [100

mg/mL], así como también los volúmenes en ml de extracto utilizado y de DMSO en mL para cada una de las diluciones preparadas a partir de estas soluciones madres: Dilución I [30 mg/mL], Dilución II [20 mg/mL], Dilución III [10 mg/mL] y Dilución IV [2mg/mL]. (Para ver detalladamente las formulas y sus respectivos calculos para preparar las soluciones stock y las diluciones véase los anexos 4.1 y 4.2).

Tabla Nº 2 . Cantidades en mg de extracto, volúmenes de DMSO y de extractos requeridos para preparar soluciones Stock y las diluciones de Canela "*Cinnamomun zeylamicum*".

SOLUCIONES STOCK 100 mg/mL			Dilución I 30 mg/mL		Dilución II 20 mg/mL		Dilución III 10 mg/mL		Dilución IV 2 mg/mL	
Extractos	mg. de Extracto sólido	Volumen del DMSO	Volumen del Extracto	Volumen del DMSO	Volumen del Extracto	Volumen del DMSO	Volumen del Extracto	Volumen del DMSO	Volumen del Extracto	Volumen del DMSO
Ciclohexano	500mg	5mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL	0.33 mL de dilución I	4.7 mL
Cloroformo	900mg	9mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL	0.1 mL de solución stock	4.9 mL
Acetona	2510mg	25.1 mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL	0.1 mL de solución stock	4.9 mL
metanol	4380mg	93.8 mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 ml de solución stock	4.5 mL	0.1 mL de solución stock	4.9mL

Tabla Nº 2. Cantidades en mg de extracto, volúmenes de DMSO y de extractos requeridos para preparar las soluciones.

Soluciones stock 100 mg/mL			Dilución I 30 mg/mL		Dilución II 20 mg/mL		Dilución III 10 mg/mL		Dilución IV 2 mg/mL	
Extractos	mg de Extracto sólido	Volumen del DMSO	Volumen del Extracto	Volumen de DMSO	Volumen del Extracto	Volumen de DMSO	Volumen del Extracto	Volumen de DMSO	Volumen del Extracto	Volumen de DMSO
Ciclohexano	282.2mg	2.822mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	2 mL de solución II	2 mL	0.33 mL de solución stock	4.7 mL
Cloroformo	741.4mg	7.414mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL
Acetona	957.3mg	9.573mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL	0.5 mL de dilución II	4.5 mL
metanol	2500mg	25mL	1.5mL de solución stock	3.5mL	1mL de solución stock	4mL	0.5 mL de solución stock	4.5 mL	0.5 mL de solución stock	4.5mL

Los extractos en ciclohexano, cloroformo y acetona tanto en canela como en clavo también fueron evaluados sobre semillas de maíz "*Zea mays*", agregando dichos extractos directamente sobre estas, se trabajaron esos extractos a las concentraciones 30 mg/ mL y 10 mg/mL, a la vez se evaluó la actividad biológica de los mencionados extractos sobre granos de maíz molidos a los cuales se les aplicó directamente los extractos a las concentraciones 30 mg/mL y 10 mg/mL , la metodología de estos ensayos aparecen en el anexo N° 1 y los resultados en las fotos 32 a 38 del anexo 1, estos dos ensayos no forman parte de los objetivos de este trabajo , sin embargo se tuvieron en cuenta para saber si bajo estas condiciones existía el mismo efecto inhibitorio de hongos con estos extractos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS SEGÚN LA PERSECCIÓN ORGANOLÉPTICA

Las 39 muestras de “*zea mays*” analizadas presentaron bajos porcentajes de granos dañados, siendo el promedio general de 2.94%, observándose principalmente los ocasionados por insectos, notándose la presencia de huecos en los granos y también con características similares a las ocasionadas por enfermedades percibidas por una apariencia negrusca, manchas y quemaduras. Los insectos encontrados fueron hormigas y gorgojo “*Sitophilus zea mays*” los cuales no se observaron en abundancia; en algunas muestras se percibió la presencia de tierra y polvo. Aunque escasas se presentaron algunas impurezas como presencia de otros granos como lenteja “*Lens culinaris*”, frijol “*Phaseolus vulgaris*”.

En forma general las muestras de “*Zea mays*” en almacenamiento analizadas en este estudio no mostraron alto porcentaje de daños y la mayoría de los granos se les percibió con una apariencia sana, es importante considerar que los daños ocasionados por insectos son factores influyentes en la contaminación fúngica, estos organismos pueden lesionar la cutícula del grano e inocular esporas las cuales son transportadas en su cuerpo, los adultos son capaces de inocular el hongo durante la ovoposición; el calor también influye en la inoculación de hongos ya que este aumenta la actividad de los insectos y facilita su reproducción y crecimiento de la población infectada (Osuna,1999), (Mazzani *et. al*,2004) .

En esta investigación por no ser uno de los objetivos el análisis de granos dañados se realizó en forma general, sin embargo en las fábricas y empresas de alimentos se tienen en cuenta múltiples factores tales como germen dañado, granos fisurados, daños mecánicos por choques, por secamiento, por choques térmicos, entre otros.

En las muestras de maíz (“*Zea mays*”) en almacenamiento tomadas en 32 tiendas de los barrios: 7 de Agosto, Puerta roja, El Porvenir, Ciudadela Universitaria, El Campo, Nuevo México, El Cortijo, Pioneros y 7 graneros del mercado público el Papayo del municipio de Sincelejo (Sucre), se encontraron según las reglas establecidas para el recuento en placa las siguientes unidades formadoras de colonias (ufc/g). (Ver tablas 3 y 4)

Tabla Nº 3. Unidades formadoras de colonias por gramos (ufc/g) encontradas en muestras de maíz en tiendas.

Muestras	Ufc/g	Muestras	Ufc/g	Muestras	Ufc/g	Muestras	Ufc/g
1	50x10 ²	9	12X10 ³	17	96X10 ²	25	15X10 ³
2	60x10 ²	10	76X10 ²	18	14X10 ³	26	60X10 ²
3	15x10 ³	11	83X10 ²	19	70X10 ²	27	10X10 ²
4	36X10 ²	12	51X10 ²	20	17X10 ³	28	79X10 ²
5	96X10 ²	13	60X10 ³	21	18X10 ³	29	46X10 ²
6	11X10 ³	14	45X10 ²	22	73X10 ²	30	79X10 ²
7	85X10 ²	15	18X10 ²	23	54X10 ²	31	96X10 ²
8	16X10 ³	16	48X10 ²	24	39X10 ²	32	31X10 ²

Tabla Nº 4. Unidades formadoras de colonias por gramos (ufc/g) encontradas en muestras de maíz en graneros.

Muestras	Ufc/g
1	12x10 ³
2	19x10 ³
3	14x10 ³
4	94x10 ²
5	36x10 ³
6	10x10 ³
7	17x10 ³

A estos resultados se les aplicó la prueba estadística Chi cuadrado para determinar el grado de significancia de estos, la mencionada prueba estadística permite establecer si los resultados observados se ajustan a los esperados, los resultados observados en este caso serían las Unidades formadoras de colonias (ufc/g) encontradas en las 32 tiendas, mientras que los esperados son las Unidades formadoras de colonia por gramos (ufc/g) al máximo nivel permitido para el consumo humano en granos y cereales el cual es de 10⁵.

En el ensayo comparativo de harinas comerciales de “*Zea mays*” las ufc/g encontradas estuvieron dentro de los límites permitidos ya que estos son de 1000 ufc/g según (Ramos, 1980; Meljen, 1999) y en las muestras estudiadas tres de ellas presentaron estos niveles, solamente una de ellas presentó niveles superiores los cuales fueron de 20×10^3 ufc/g, indicando que esta contaminación en esta muestra pudo haber ocurrido después de empaquetado el producto ya que en las fabricas y procesadoras de harinas se realizan tratamientos rigurosos para destruir estos microorganismos, además se seleccionan maíces en condiciones aptas antes de ser procesados. (Ver tabla N° 26 del anexo E).

4.2 PRUEBA CHI CUADRADO

Tabla N° 5a. Concentración de datos

MUESTRAS TIENDAS	OBSERVADOS	ESPERADOS	X ²
1	3,698	0,698970004	12,87
2	3,778	0,698970004	13,56
3	4,176	0,698970004	17,30
4	3,556	0,698970004	11,68
5	3,982	0,698970004	15,42
6	4,041	0,698970004	15,98
7	3,929	0,698970004	14,93
8	4,204	0,698970004	17,58
9	4,079	0,698970004	16,34
10	3,88	0,698970004	14,48
11	3,919	0,698970004	14,83
12	3,707	0,698970004	12,95
13	4,778	0,698970004	23,80
14	3,653	0,698970004	12,48
15	3,255	0,698970004	9,35
16	3,681	0,698970004	12,72
17	3,982	0,698970004	15,42
18	4,146	0,698970004	17,00
19	3,845	0,698970004	14,16
20	4,23	0,698970004	17,84
21	4,255	0,698970004	18,09
22	3,863	0,698970004	14,32
23	3,732	0,698970004	13,16
24	3,591	0,698970004	11,97
25	4,176	0,698970004	17,30
26	3,778	0,698970004	13,56
27	3,000	0,698970004	7,58

MUESTRAS TIENDAS	OBSERVADOS	ESPERADOS	X²
28	3,897	0,698970004	14,63
29	3,662	0,698970004	12,56
30	3,897	0,698970004	14,63
31	3,982	0,698970004	15,42
32	3,491	0,698970004	11,15

En la tabla N° 5a se representa la concentración de datos correspondiente al análisis Chi cuadrado de las muestras de “Zea mays” analizadas. La primera columna corresponde a las muestras de “Zea mays” en las tiendas, en la segunda columna aparecen representados los valores observados de las ufc/g encontradas en las tiendas para lo cual fue necesario expresar las potencias correspondientes como logaritmos, la tercera columna corresponde a los esperados de ufc/g, dicho valor esperado es 10^5 , el cual fue expresado logaritmicamente, dado que todas las muestras analizadas fueron comparadas con el valor 10^5 , por esta razón en la tercera columna el valor es el mismo para todas las casillas.

Comparando la segunda columna correspondiente a los valores observados con respecto a la tercera columna correspondiente a los valores esperados (el mismo para todas las muestras), se puede notar que los datos observados no se ajustan con los esperados, esto se debe a que en las muestras analizadas las ufc/g encontradas estuvieron todas en un rango entre 10^2 y 10^3 , esto quiere decir que se encuentran por debajo del nivel máximo permitido para granos y cereales el cual es de 10^5 (Frazier y Westhoff, 1993; Gagiotti *et.al*, 2001), las ufc/g encontradas en las muestras de Zea mays las cuales fueron entre 10^2 y 10^3 , significa que hasta el momento en las tiendas y graneros del municipio de Sincelejo se está ofreciendo un maíz en condiciones aptas para el consumo alimenticio, no presentándose hasta el momento ningún riesgo significativo para la salud.

Los datos correspondientes a los 7 graneros del mercado municipal no se analizaron por ser una muestra relativamente pequeña, en base a que las ufc/g

para los 7 graneros se encontraron en un nivel 10^3 , se deduce mediante esta prueba de análisis de Chi cuadrado de las muestras de las tiendas, que para los graneros con relación al valor máximo permitido (10^5) ocurre lo mismo, es decir los datos observados no se ajustan con los esperados, por las razones dichas anteriormente.

Tabla N° 5b. Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Observado	32	3,8700938	0,32475116	3,00000	4,77800
Esperado	32	0,69897000	0,000000000	0,698970	0,698970

En la tabla 5b aparece el estadístico descriptivo, en la primera columna se compara el valor observado con el esperado, la N que aparece en la segunda columna es el número de muestras o población analizada en este caso (N= 32) tanto para los valores observados como para los esperados, la tercera columna corresponde a las medias (promedios) de los 32 valores observados de la columna 2 de la tabla 5a y también aparecen las medias de los 32 valores esperados de la tercera columna de la tabla N° 5a, la cuarta columna corresponde a la desviación típica la cual indica que tanto se alejan entre si los valores observados de los esperados, las columnas quinta y sexta corresponde a los rangos de desviación típica mostrándose el rango mínimo y el rango máximo.

Tabla N° 5c. Estadísticos de prueba

Estadístico X2	465,06
Gl	31
Tabulado X2	44,985

La tabla N° 5c, Corresponde al estadístico de prueba , que permite establecer si hay o no diferencias significativas, en base e esta tabla se puede notar que el valor estadístico el cual es 465,06 es mayor que el valor tabulado 44,985, por lo tanto esto indica que hay diferencias significativas.

Se rechaza la hipótesis nula, es decir lo observado no se ajusta a lo esperado.

En la foto N° 4, se observa el crecimiento de las colonias de hongos presentes en una muestra de maíz (“*Zea mays*”) bajo condiciones de almacenamiento, después de haber realizado diluciones seriadas. La ilustrada corresponde a la dilución 10^{-2}

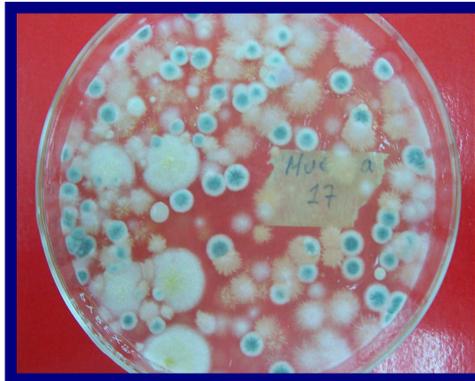


Foto N° 4. Crecimiento de colonias fungicas en muestras de “*Zea mays*” (dilucion 10^{-2})

En la tabla N° 6. Se muestran las frecuencias de aparición de cada uno de los hongos reportados en esta investigación con respecto a 39 muestras analizadas (32 muestras de “*Zea mays*”. Tomadas de las tiendas y los 7 graneros del mercado municipal de Sincelejo).

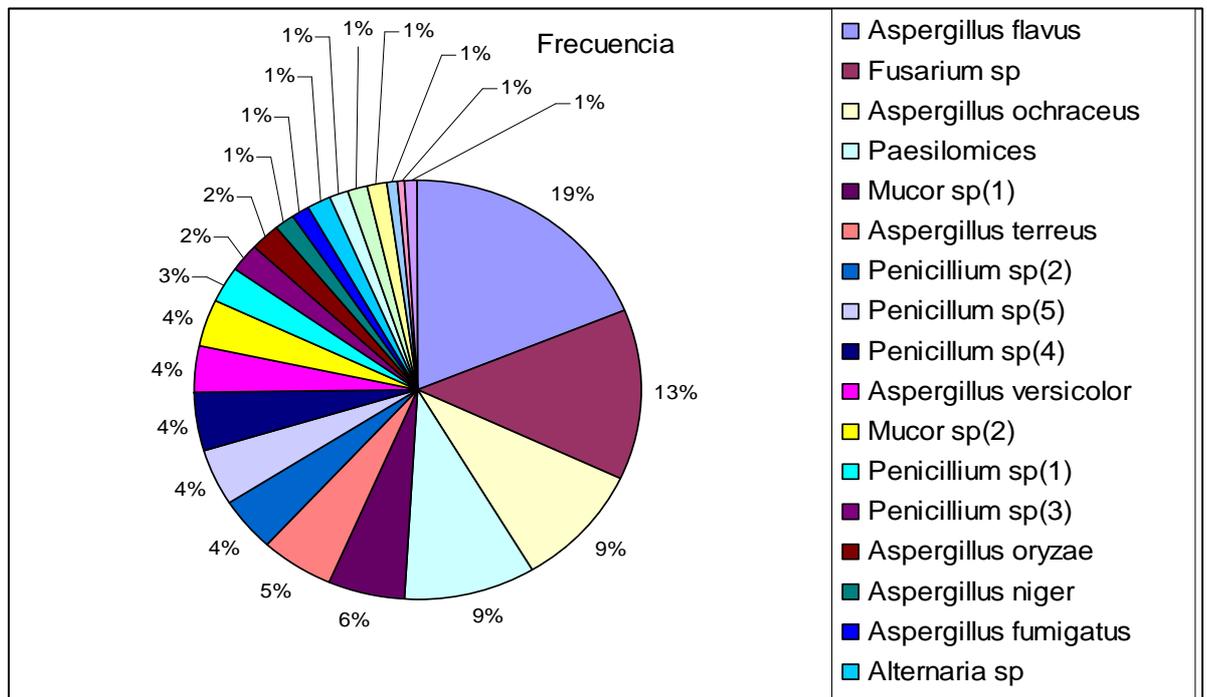
Tabla N° 6. Frecuencias de aparición de hongos encontrados en “*Zea mays*”.

Hongos	F	Hongos	F
“ <i>Aspergillus flavus</i> ”	26	“ <i>Penicillium sp. (3*)</i> ”	3
“ <i>Fusarium sp.</i> ”	18	“ <i>Aspergillus oryzae</i> ”	3
“ <i>Aspergillus ochraceus</i> ”	13	“ <i>Aspergillus niger</i> ”	2
“ <i>Paecylomices sp.</i> ”	13	“ <i>Aspergillus fumigatus</i> ”	2
“ <i>Mucor sp. (1*)</i> ”	8	“ <i>Alternaria sp.</i> ”	2
“ <i>Aspergillus terreus</i> ”	7	“ <i>Aureobasidium sp.</i> ”	2
“ <i>Penicillium sp. (2*)</i> ”	6	“ <i>Botrytis sp.</i> ”	2
“ <i>Penicillium sp. (5*)</i> ”	6	“ <i>Penicillium purpurogenum</i> ”	2
“ <i>Penicillium sp. (4*)</i> ”	6	“ <i>Geotrichum sp. (1*)</i> ”	1
“ <i>Aspergillus versicolor</i> ”	5	“ <i>Geotrichum sp. (2*)</i> ”	1
“ <i>Mucor sp. (2*)</i> ”	5	“ <i>Cladosporium sp.</i> ”	1
“ <i>Penicillium sp. (1*)</i> ”	4		

F = Frecuencia

*Los números asignados dentro del paréntesis al lado de los hongos se usó para diferenciar aquellas especies de un mismo género las cuales no fueron identificadas.

Figura N° 12. Porcentaje de aparición de los hongos de “*Zea mays*” con respecto a las 39 muestras analizadas.



Cada color representado en el gráfico de la Figura N° 12 corresponde a un hongo perteneciente a los hongos aislados de las 39 muestras de “*Zea mays*”, en la casilla que aparece al lado del gráfico se muestra el respectivo color para cada hongo, ellos aparecen clasificados de acuerdo al % de aparición, los mayores % aparecen arriba y los menores abajo. Los números que aparecen dentro del paréntesis corresponden aquellos hongos de un mismo género a los cuales no se les identificó la especie.

El moho “*Aspergillus flavus*” presentó la frecuencia de aparición más alta en las muestras de “*Zea mays*” bajo condiciones de almacenamiento con respecto a las 32 tiendas y 7 graneros (26 de 39 muestras en total), esto se debe a su capacidad ubiquitaria y cosmopolita por lo que puede colonizar una gran cantidad de sustratos, según (Gimeno, 2003) este hongo al igual que muchos otros de la flora de almacenamiento presentan amplios rangos de condiciones climáticas y temperaturas, las cuales se encuentran entre 25 y 45 °C, sin embargo “*A. flavus*” puede crecer sin problemas a temperaturas de 55 °C, lo que explica su alta

aparición en las muestras. La alta frecuencia encontrada coincide con los resultados obtenidos por (Beomont, 2004) en el estudio de la micoflora de "*Zea mays*" en Maracay (Venezuela), "*A. flavus*" se encontró en alta proporción en las muestras analizadas, al igual que "*A. ochrceus*". En otros estudio se encontraron otras especies de "*Aspergillus*" como "*A. fumigatus*" y "*A. terreus*", los cuales no mostraron una alta frecuencia al igual que "*A. niger*" coincidiendo con los resultados de (Gaggiotti *et. al*, 2001)., *A. niger* también ha sido reportado en otras investigaciones tales como (Mohammed *et .al*, 1993), también aislado de maíces en Tailandia por (Pineda y Carrasco,1997; Fontana y Gonzáles, 2000), donde lo encontraron en baja proporción.

"*Alternaria*" y "*Cladosporium sp.*", mostraron poca frecuencia lo cual puede deberse a que estos hongos tienden a infectar más que todo en campo (Fulgueira y Borghi, 2000; Gaggiotti *et .al*, 2001). Sin embargo a pesar de que "*Fusarium sp.*", encontrado en esta investigación tiende a infectar más que todo en campo, la frecuencia con que se encontró fue alta(18 de 39 muestras) cuyo resultado se observa en la tabla N° 6, esto se puede fundamentar en que las muestras de "*Zea mays*" recolectadas pudieron haber adquirido este patógeno durante el cultivo, y se mantuvo en las condiciones de almacenamiento o bien por que este hongo al igual que otros que son considerados de campo, pueden colonizar granos en almacenamiento; los hongos que atacan granos y forrajes no están restringidos únicamente a campo o almacenamiento, ya que pueden encontrarse en ambos hábitat, Según (Fulgueira y Borghi, 2000). Esto explica también la presencia de "*Alternaria* y *Cladosporium*" en las muestras de "*Zea mays*".

"*Botrytis sp.*" mostró una baja frecuencia, lo cual puede deberse a que este moho no tiende a colonizar frecuentemente los sustratos como granos y forrajes, infectan más comúnmente a frutas y hortalizas especialmente fresa "*Fragaria vesca L*", tomate "*Lycopersicom esculentum*", la vid "*Vitis vinifera*" y plantas ornamentales (Benito *et. al*, 2000; Cuellar, 2003). Por lo tanto la presencia de este hongo en 2 de las 39 muestras de "*Zea mays*" analizadas puede deberse a la colonización de estos patógenos en los frutos y hortalizas que forman parte de los

viveres que se comercializan a diario en estas tiendas y graneros, esto puede asociarse con la persección organoléptica de las muestras de "*Zea mays*", al encontrarse restos vegetales como conchas de cebolla "*Allium cepa l var*" y otros granos como Arroz "*Oryza sativa*", Frijol "*Phaseolus vulgaris*", lenteja "*Lens esculenta*", lo cual permitió deducir que algunos vendedores de estos lugares no llevan un control riguroso en los sitios donde se depositan los productos a vender (cajones de maderas, tanques plásticos, bolsas entre otros), algunos de ellos no utilizan estos sitios de almacenamiento exclusivos para un determinado producto, pudiendo ocurrir que el lugar de almacén del maíz al terminarse sea llenado con otros productos (Arroz "*Oryza sativa*", Frijol "*Phaseolus vulgaris*", esto favorece la colonización de "*Zea mays*" por hongos que infectan más frecuentemente a estos sustratos, lo que puede contribuir a la disminución de la calidad del producto.

"*Aureobasidium sp.*" y "*Geotrichum spp.*", se encontraron en baja frecuencia, según (Martins *et.al*, 2004) se han reportado en "*Zea mays*" en condiciones de campo, algunas especies del género "*Aureobasidium*" colonizan otros sustratos como camarones, carnes, frutas y hortalizas; al igual que algunas especies del género "*Geotrichum sp*" que infectan frutos cítricos y melocotones (Jay, 1994), lo que explica sus bajas apariciones. En este estudio se observaron varias especies de "*Penicillium sp*" en las muestras de "*Zea mays*", esto se fundamenta en que las especies de este hongo tiende a infectar en almacenamiento (Gaggiotti.2001, Gimeno, 2003).

En el ensayo adicional de harinas comerciales se encontraron algunas de las mismas especies encontradas de las muestras de "*Zea mays*" tomadas de las tiendas y graneros, predominando las especies "*Alternaria sp.*", "*Aspergillus flavus*", "*Mucor sp. (2*)*". Para ver los resultados del ensayo véase las FOTOS N° 39.a a la 43 del Anexo 5. (*El número dos (2) indica una identificación asignada para diferenciar las especies de hongos las cuales no fueron identificadas.

Es importante destacar que se presentaron variaciones en la población de hongos encontrados según la época de recolección y análisis de muestras, en los meses de sequía predominaron las especies de "*Aspergillus flavus*" y "*Paecylomices sp.*", mientras que en la época de lluvia predominaron las especies de "*Penicillium spp.*" y "*Aspergillus flavus*", este último predominó en ambas épocas por ser un hongo que se adapta fácilmente a cualquier ambiente por su amplio rango de condiciones climáticas y temperaturas, esto se relaciona con los resultados obtenidos por (Corrales y Subero, 1997) quienes encontraron que en la época de sequía en un cultivo de arroz "*Oryza sativa*" predominaron los hongos "*Fusarium spp.*", "*Aspergillus flavus*", "*Curvularia lunata*" y en las épocas de lluvia, "*Fusarium sp.*", "*Curvularia lunata*" y "*bipolares oryzae*" es de notar que en el estudio de estos investigadores predominaron los hongos "*Fusarium sp.*" y "*Curvularia lunata*" en ambas épocas; al igual que "*A. flavus*" en la presente investigación, Según (Carrillo, 2003) las especies de "*Penicillium*" prefieren las épocas húmedas lo que guarda relación con los resultados obtenidos.

Tabla Nº 7. Clasificación taxonómica de los géneros de hongos aislados de "*Zea mays*" en almacenamiento.

<p>"<i>Aspergillus</i>" y "<i>penicillium</i>" Dominio: Eucariótica Reino: hongo Filum: ascomycota Subfilum: pezizomycotina Clase: eurotiomycetes Orden: eurotiales Familia: trichocomaceae Géneros: <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i></p>	<p>"<i>Botrytis</i>" Dominio: eucariótica Reino: hongo Subfilum: pezizomycotina Clase: leotiomycetes Orden: helotiales Familia: sclerotinicae Género: <i>Botryotinia</i></p>	<p>"<i>Mucor</i>" Dominio: eucariótica Reino: hongo Filum: zygomycota Clase: Zygomycetes Orden: mucorales Familia: mucoraceae Género: <i>Mucor</i></p>
<p>"<i>Aureobasidium</i>" Dominio: eucariótica Reino: hongo Filum: deuteromycota Clase: hypomycetes Orden: hypomicetales Familia: monileaceae Género: <i>Aureobasidium</i></p>	<p>"<i>Cladosporium</i>" Dominio: eucariótica Reino: hongo Filum: deuteromycota Clase: deuteromycetes Orden: moniliales Familia: dermatiaceae Género: <i>Cladosporium</i></p>	<p>"<i>Alternaria</i>" Dominio: eucariótica Reino: hongo Filum: deuteromycota Clase: deuteromycetes Orden: moniliales Género: <i>Alternaria</i></p>
<p>"<i>Fusarium</i>" Dominio. Eucariota Reino. Hongo Filum: ascomycota Clase: euascomycetes Orden: hypocreales Familia: hypocraceae Género: <i>Fusarium</i></p>	<p>"<i>Paecylomices</i>" Dominio: Eucariota Reino. Hongo Filum: Ascomycota Clase: Eurotiomycetes Orden: Europtiales Familia: Trichocomaceae Género: <i>Paecylomices</i></p>	

A continuación se ilustran y se describen macroscópica y microscópicamente los géneros y algunas especies de hongos aislados e identificados con la ayuda del manual de (Carrillo, 2003) de las muestras de Maíz (“*Zea mays*”) bajo condiciones de almacenamiento.

Foto N° (5a).



Foto N° (5b).



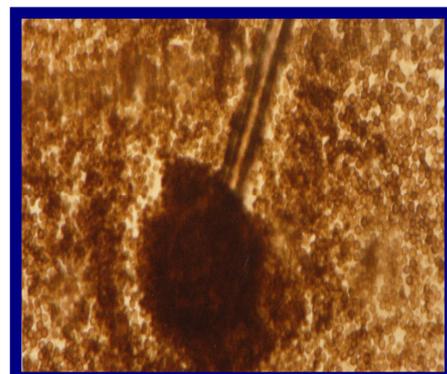
Macroscópica (5a): “*Aspergillus flavus*”. Micelio abundante y granular, blanco, amarillo, finalmente verde en medio sabouraud.

Microscópica (5b): 40X Conidióforo largo, vesícula esférica, métulas largas, fialides cortas y que rodean completamente la vesícula, conidios abundantes.

Foto N° (6a).



Foto N° (6b).



Macroscópica (6a). “*Aspergillus niger*”. Colonias granulares y abundantes blancas y finalmente negras en medio sabouraud.

Microscópica (6b). 40X Conidióforo largo, vesícula esférica, con métulas y fialides, conidios globosos y abundantes que recubren la vesícula.

Foto N° (7a).



Foto N° (7b).



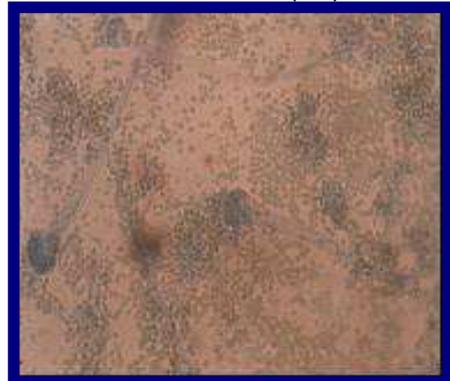
Macroscópica (7a). “*Aspergillus versicolor*”. Colonias radiales y de crecimiento moderado, granulares redondas, blancas, amarillas y finalmente marrón-negras en la parte central y blancas alrededor en medio sabouraud.

Microscópica (7b). 40X Conidióforo largo, vesícula redonda, métulas cortas, fialides largas, conídios redondos.

Foto N° (8a).



Foto N° (8b).



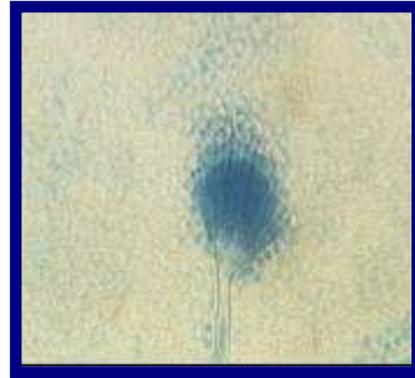
Macroscópica (8a). “*Aspergillus fumigatus*”, colonias verde-azulosas, aterciopeladas en medio sabouraud.

Microscópica (8b). 40X Conidióforo corto, vesícula piriforme, fialides unicariadas, cortas y paralelas al eje del conidióforo, conídios redondos.

Foto N° (9a)



Foto N° (9b)



Macroscópica (6a). “*Aspergillus terreus*”. Colonias de tonalidad crema - pardo, aterciopelada, achatadas y crecimiento moderado en medio sabouraud.

Microscópica (6b). **40X** Conidióforo cortó, curvo y flexible, vesícula esférica cubierta de métulas solo hasta la mitad, fiálides largas prominentes con proyecciones verticales, conidios esféricos regulares de gran tamaño.

Foto N° (10a).

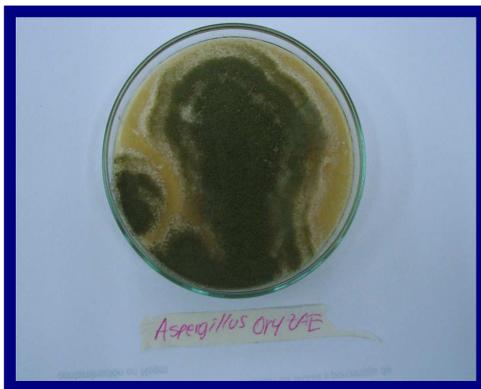


Foto N° (10b).



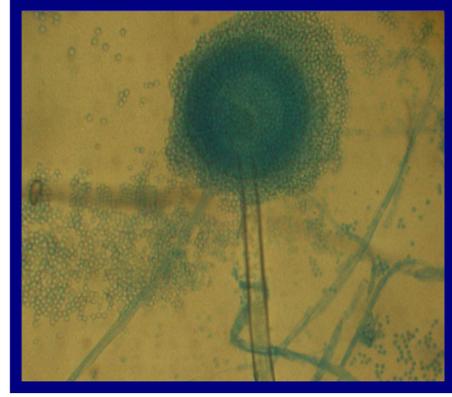
Macroscópica (10a). “*Aspergillus oryzae*”. Colonias redondas de bordes definidos, crecimiento moderado, blanco, amarillento y finalmente amarillas verdosas en medio sabouraud. Este tiene gran parecido con el “*A. flavus*” pero su crecimiento es mas moderado y el conidiòforo tiende a ser mas largo.

Microscópica (10b). **40X** Conidióforo largo, vesícula esférica o globosa, métulas cortas, fiálides largas y se agrupan en toda la periferia de la vesícula, conídios redondos y producidos en forma moderado.

Foto N° (11a).



Foto N° (11b).



Macroscópica (11a). “*Aspergillus ocraceus*”: Colonias algodonosas, circulares y de bordes regulares, crecimiento exuberante de color amarillo-naranja en medio sabouraud.**Microscópica (11b).** **40X** Conidióforo largo, vesícula redonda, métulas y fiálides cortas abundantes que rodean toda la vesícula, conidios circulares que se producen en gran cantidad.

Foto N° (12a).

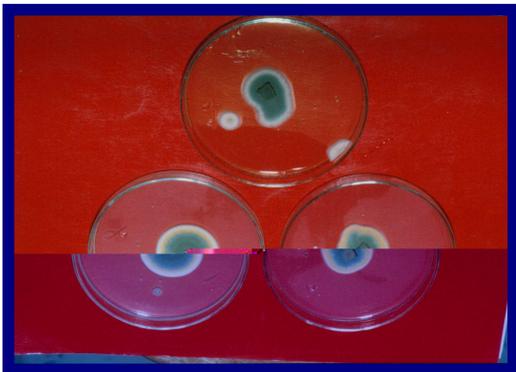
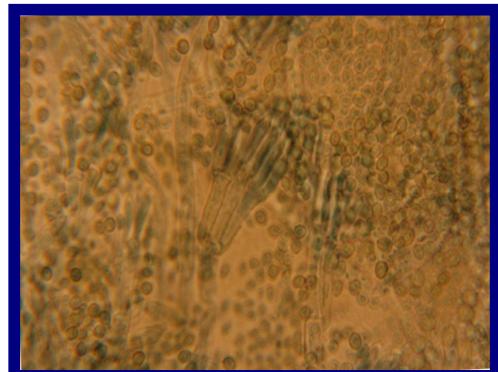


Foto N° (12b).



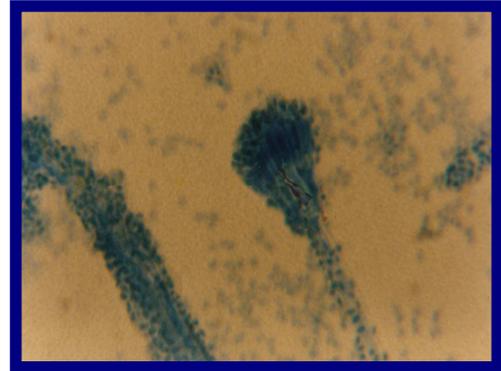
Macroscópica (12a). “*Penicillium purpurogenum*”. Colonias aterciopeladas y de crecimiento escaso, grises en el centro y naranjadas alrededor en medio sabouraud.

Microscópica (12b). **100X** biverticilado simétrico, métula y esterigma, las fiálides alcanzan la misma longitud de las métulas, conidios esféricos.

Foto N° (13a).



Foto N° (13b).



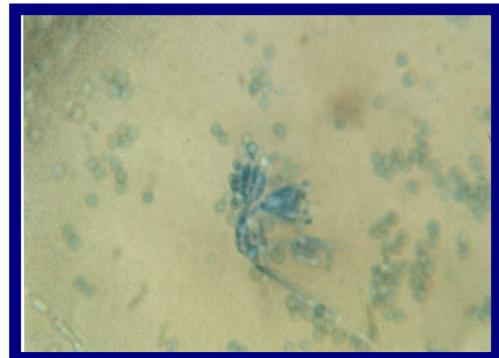
Macroscópica (13a). “*Penicillium sp. (1*)*”. Colonias aterciopeladas y crecimiento moderado, gris-azul-verdosa en medio sabouraud.

Microscópica (13b). **100X.** monoverticilado simétrico, conidióforo largo, hifas sectadas, las fiálides y las métulas tienen casi la misma longitud, conidios esféricos y abundantes.

Foto N° (14a).



Foto N° (14b).



Macroscópica (14a). “*Penicillium sp. (2*)*”. Colonias redondas, aterciopeladas, azul-grisasea, en medio sabouraud.

Microscópica (14b). **100X** Conidióforos cortos, fiálides abundantes y alargadas, conidios esféricos y en gran cantidad.

Foto N° (15a).

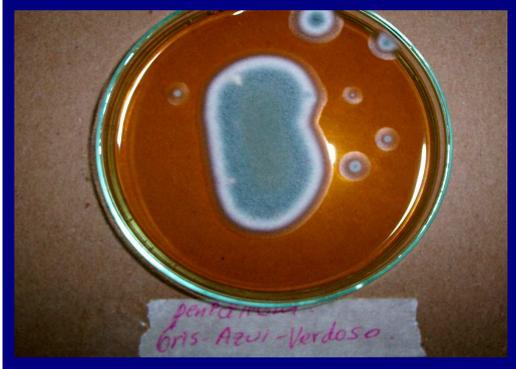


Foto N° (15b).



Macroscópica (15a). “*Penicillium sp. (3*)*”. Colonias redondas, aterciopeladas, crecimiento moderado, con tonalidades gris-azul-verdoso, rosado en el centro con bordes blancos en medio sabouraud.

Microscópica (15b). **100X** biverticilado simétrico, hifas septadas, presencia de métulas y conidias elípticas.

Foto N° (16a).

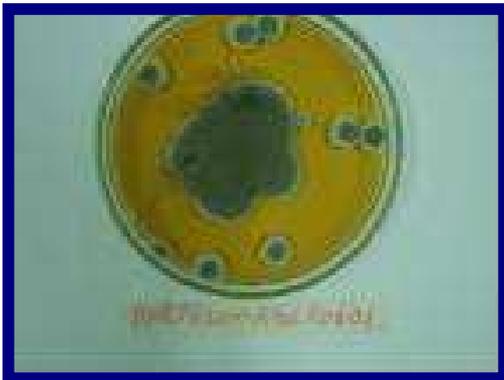
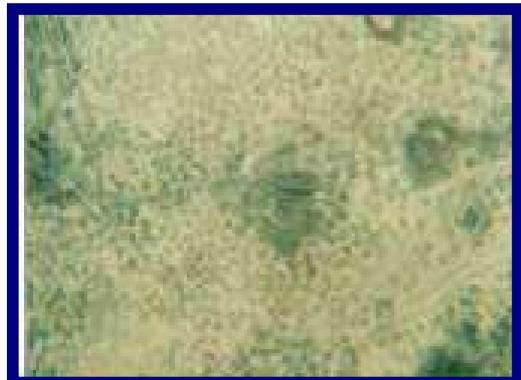


Foto N° (16b).



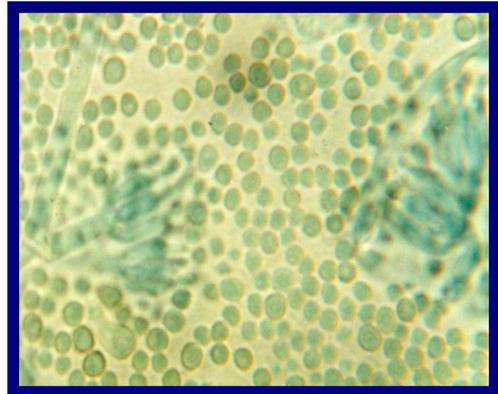
Macroscópica (16a). “*Penicillium sp. (4*)*”. Colonias radiales, con bordes rugosos, aterciopeladas, micélios azul-grisoso en medio sabouraud.

Microscópica (16b). **100X** triverticilado, hifas septadas, métulas y fiálides proporcionales, conídios abundantes, globosos, ovalados y de pared gruesa.

Foto N° (17a).



Foto N° (17b).



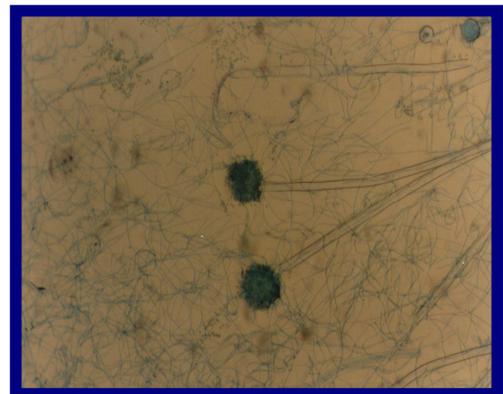
Macroscópica (17a). "*Penicillium sp.* (5*)". Colonias aterciopeladas, irregulares, micélio gris intenso en medio sabouraud.

Microscópica (17b). **100X** tetraverticilado, conidióforo corto y grueso, métulas largas y fiálides cortas, conídios abundantes y globosos.

Foto N° (18a).



Foto N° (18b).



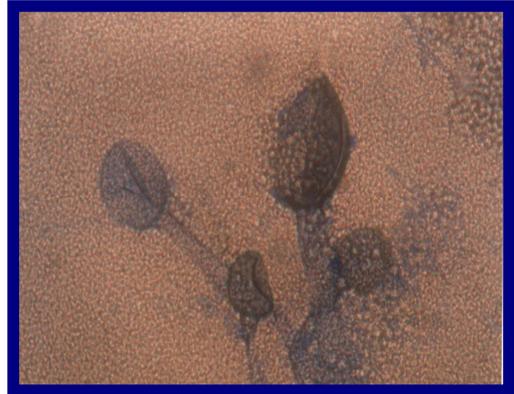
Macroscópica (18a). "*Mucor sp.* (1*)". Colonias blancas, algodonosas, crecimiento exuberante que invade rápidamente la caja en medio sabouraud.

Microscópica (18b). **40X** Columelas redondas con proyecciones irregulares, conidióforo largo.

Foto N° (19a).



Foto N° (19b).



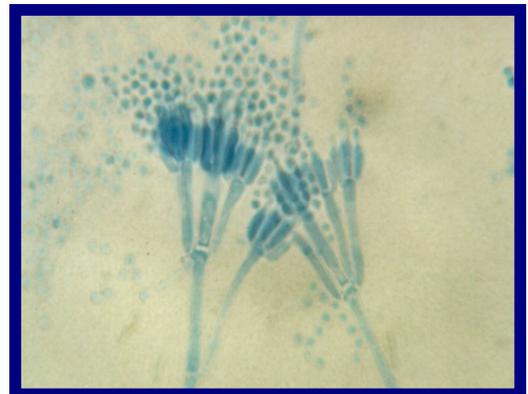
Macroscópica (19a). “*Mucor sp. (2*)*”. Colonias algodonosas y crecimiento moderado, de color gris oscuro en medio sabouraud.

Microscópica (19b). **40X** Columelas lisas y redondas sin proyecciones, conidióforos largos y esporas abundantes.

Foto N° (20a).



Foto N° (20b).



Macroscópica (20a). “*Penicillium sp. (6*)*”. Colonias aterciopeladas, crecimiento abundante con pliegues en los bordes, micelio gris en medio sabouraud.

Microscópica (20b). **100X** hifas septadas, conidióforos triverticilado y tetraverticilado, métulas largas y fiálides abundantes más cortas que estas, conidios característicos en cadenas, circulares y de gran tamaño.

Foto N° (21a).

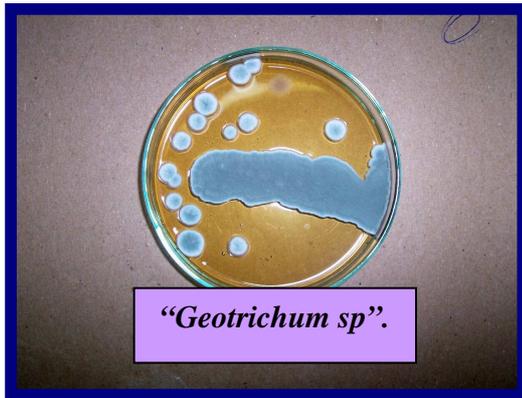
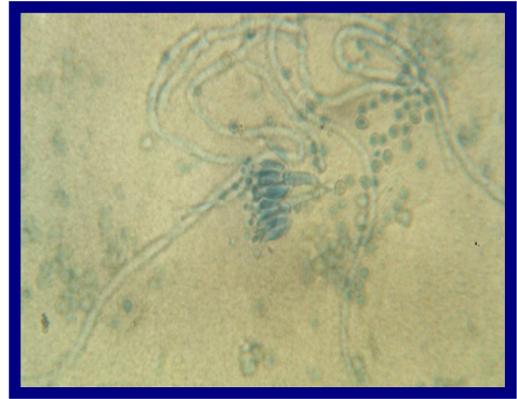


Foto N° (21b).



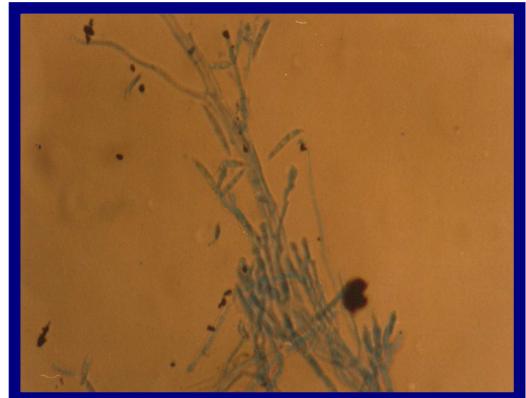
Macroscópica (21a). "*Geotrichum sp.* (1*)". Colonias aterciopeladas, crecimiento abundante, micelio de color gris en medio sabouraud.

Microscópica (21b). 100X hifas septadas, hongo biverticilado, conidióforos cortos, méticas cortas y gruesas, conidios abundante.

Foto N° (22a).



Foto N° (22b).



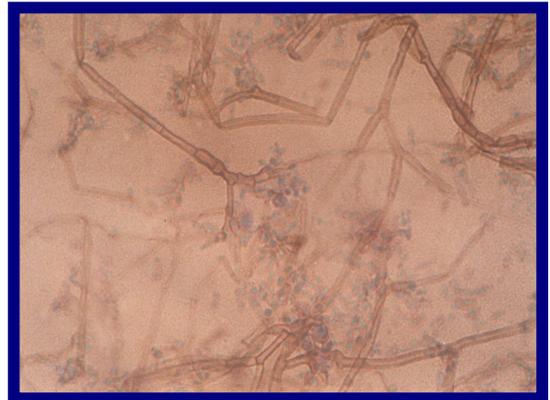
Macroscópica (22a). "*Fusarium sp.*". Colonias no totalmente redondas, algodonosas, crecimiento moderado, rosadas claras en medio sabouraud.

Microscópica (22b). 100X hifas septadas con presencia de clamidosporas y macroconidias con septos transversales, ausencia de microconidias, presencia de monofialides cortas y robustas.

Foto N° (23a).



Foto N° (23b).



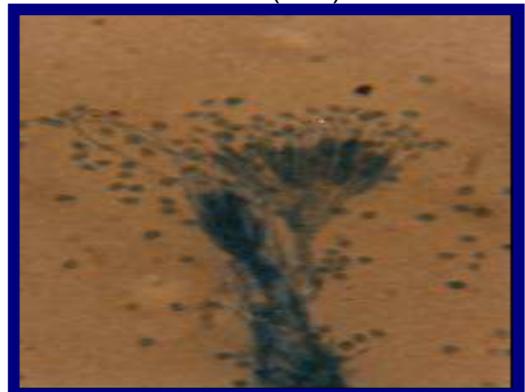
Macroscópica (23a). "*Botrytis sp*". Colonias aterciopeladas, bordes rugosos, micelio gris y tiende a ser más claro en la parte externa en medio sabouraud

Microscópica (23b). 100X conidioforo largos ramificados, hifas septadas, conidios que nacen pleomorficos , ovalados , hialinos, abundantes.

Foto N° (24a).



Foto N° (24b).



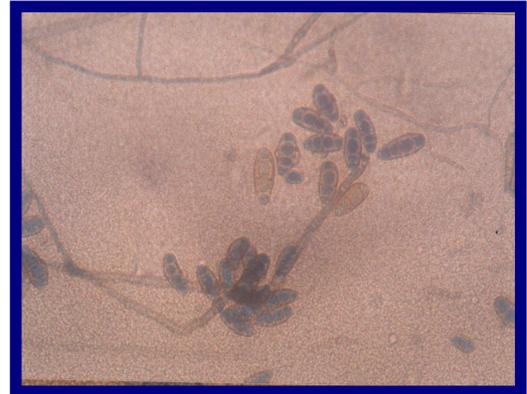
Macroscópica (24a). "*Paecylomices sp*". Colónias redondas, aterciopeladas, crecimiento moderado em médio sabouraud.

Microscópica (24b). 100X conidióforos cortos, fialides alargadas y abundantes con ápices puntiformes, conídios esféricos y abundantes.

Foto N° (25a).



Foto N° (25b).



Macroscópica (25a). "*Cladosporium sp.*". Colonias algodonosas, crecimiento moderado, de color gris al inicio y finalmente negras.

Microscópica (25b). 100X Conidióforos de tamaño variable, con cuatro septos transversales, reproducción sexual por clamidosporas, conidios elipsoidales.

Foto N° (26a).



Foto N° (26b).



Macroscópica (26a). "*Aureobasidium sp.*". Colonias aterciopeladas, redondas de bordes regulares, crecimiento escaso, consistencia pastosa, micélio de color gris-negro.

Microscópica (26b). 100X Crecimiento miceliar abundante con basidiósporas sucesivas. (Esta foto corresponde a las estructuras asexuales de este hongo, durante la experimentación se pudieron apreciar también las estructuras sexuales)

las cuales aparecen en las fotos 44 a y 44 b Del anexo 5, donde aparecen también las estructuras asexuales de este hongo).

Foto N° (27a).



Foto N° (27b).

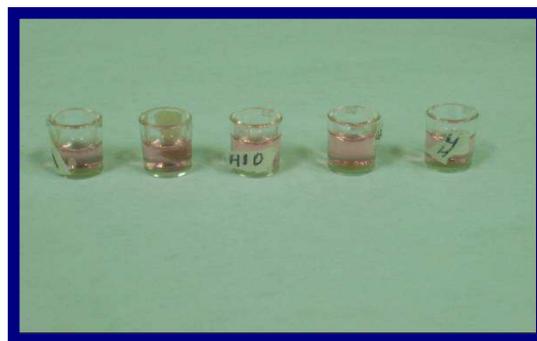


Macroscópica (27a). “*Alternaria sp.*”. Colonias gris aterciopeladas de crecimiento moderado.

Microscópica (27b). 100X Conidióforos cortos, hifas septadas, conidias en cadenas ramificadas apicales, ovaladas, irregulares.

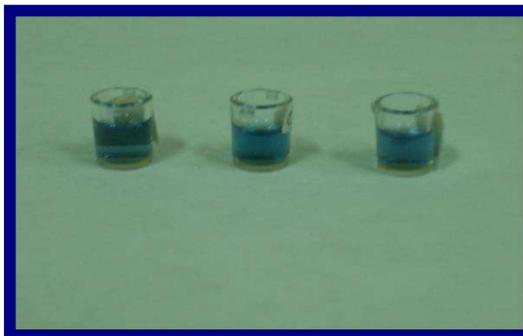
Las siguientes fotos ilustran los resultados obtenidos en la prueba de detección de aflatoxinas mediante la técnica de inmunoensayo (ELISA).

Foto N° (28a). Resultado positivo para prueba de aflatoxinas



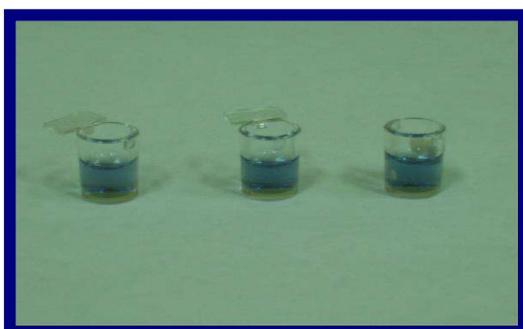
La coloración rosada observada en los micropozos indica un resultado positivo en la prueba de detección de aflatoxinas, indicando que presenta una concentración superior a 20 ppb lo cual indica un nivel no apto para el consumo alimenticio.

Foto N° (28 b). Resultado negativo para prueba de aflatoxinas



La coloración azul indicada en los micropozos corresponde a un resultado negativo en la prueba de aflatoxinas, el cual indica una concentración inferior a 20 ppb, apta para el consumo alimenticio.

Foto N° (28 c). Prueba de aflatoxinas igual al control (20 ppb)



La coloración morada que se observa indica una concentración igual a 20 ppb, el cual es el nivel máximo permitido para el consumo. Los micropozos 1 y 2 corresponden a muestras analizadas; mientras que el micropozo 3 es el control.

La tabla N° 8, muestra el resultado de la prueba de aflatoxinas realizada para las 18 muestras de maíz (9 muestras sometidas a condiciones de humedad y 9 en condiciones normales) tomadas de las tiendas en 4 barrios de la cabecera municipal de Sincelejo; en las columnas tres y cuatro se indican los resultados de las pruebas de aflatoxinas en las muestras analizadas en condiciones normales y de humedad respectivamente, en la parte debajo de la tabla N° 8 están los signos correspondientes al resultado de la prueba (+, =, -), los cuales se establecieron

con relación a la coloración de los micropozos de ELISA (ver fotos N° 28 a, 28 b y 28 c , observese que para la columna la mayoría de las muestras fueron negativas, indicadas por el signo menos(-), mientras que en la columna cuatro la mayoría fueron positivas, indicadas por el signo más (+).

Tabla N° 8. Prueba de aflatoxinas en muestras de “*Zea mays*”

Barrios	tiendas	Condiciones normales	Condiciones de humedad
Ciudadela	1	-	+
Ciudadela	2	+	+
Pioneros	3	-	+
Pioneros	4	=	+
Calle el campo	5	-	-
Calle el campo	6	-	+
Porvenir	7	-	-
Porvenir	8	-	-
Villa mady	9	-	+

+ (Positivo, el cual dió una coloración rosada, > 20 ppb)

- (negativo, el cual dió una coloración azul, <20 ppb)

= (igual al control, el cual dió una coloración morada, =20 pp)

En las gráficas aparecen las frecuencias obtenidas en las muestras de “*Zea mays*” en cuanto niveles de aflatoxinas presentes en la prueba de inmunoensayo.

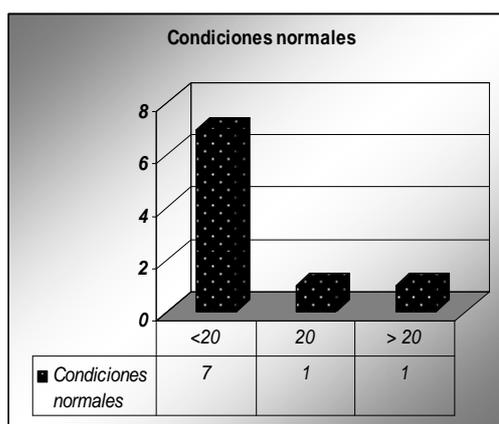


Figura N° 13 (a) frecuencia de muestras de “*Zea mays*” según niveles de aflatoxinas en condiciones normales.

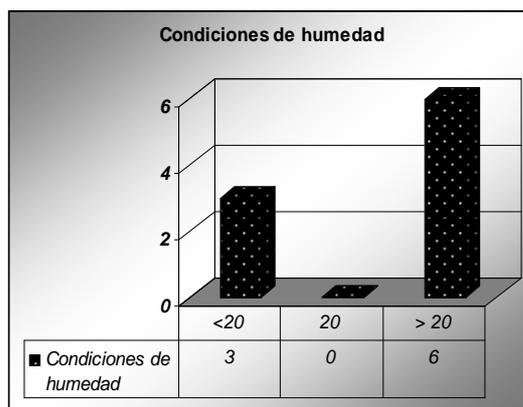


Figura N° 13 (b) frecuencia de muestras de “*Zea mays*” según niveles de aflatoxinas en condiciones de humedad.

En la figura N° 13(a) se observan tres barras correspondientes al análisis de aflatoxinas en muestras de “*Zea mays*” en condiciones normales, la barra más alta ubicada corresponde a las 7 muestras que presentaron niveles de aflatoxinas inferiores a 20 ppb (<20 ppb), obsérvese también la tabla N° 8, donde aparecen indicadas con el signo menos (-) las muestras que fueron negativas para esta prueba, comprobado por el color azul en los micropozos de ELISA, la barra de baja altura ubicada al lado de la barra alta (hacia la derecha) indica la muestra que presentó nivel de aflatoxinas igual al control comprobado por un color morado en el micropozo de ELISA, y la otra barra de baja altura ubicada al lado de esta barra (hacia la derecha) representa la muestra que tuvo niveles de aflatoxinas superiores a 20 ppb (>20 ppb), comprobado por el color rosado en el micropozo.

En la figura N° 13(b) las tres barras representadas indican las muestras de “*Zea mays*” sometidas a condiciones de humedad, la barra más alta corresponde a las 6 muestras que presentaron niveles de aflatoxinas superiores a 20 ppb(> 20 ppb) verificado por el color rosado en los micropozos, la barra mediana que aparece a la izquierda corresponde a las tres muestras que presentaron niveles de aflatoxinas inferiores a 20 ppb (< 20 ppb) comprobado por el color azul en los micropozos de ELISA, la barra del centro aparece al nivel del piso (plano donde aparecen ubicadas las barras), esto indica una frecuencia cero (0), es decir no

hubo ninguna muestra sometida a condiciones de humedad que presentara niveles de aflatoxinas igual al control, o sea igual a 20 ppb(= 20 ppb).

Según (Gaggioti *et.al*, 2001) la presencia de hongos en un alimento no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas pero si es un factor de riesgo importante para que esta se produzca. Así mismo, la ausencia de crecimiento fúngico aparente no garantiza la ausencia de estas toxinas. Por esta razón en nuestros ensayos para aflatoxinas algunas muestras fueron positivas a pesar de encontrarse por debajo de los niveles de unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g).

Las fotos N° (28a), (28b) y (28c), indican las coloraciones obtenidas en el análisis de aflatoxinas (la coloración rosada es positiva ">20 ppb", morada igual al control "20 ppb" y azul "<20 ppb" presentes en las 18 muestras de "*Zea mays*" tomadas de las tiendas; 9 de ellas fueron sometidas a cambios en las condiciones de humedad y las otras 9 en condiciones normales, la tabla N° 8 indica los resultados obtenidos para cada una de las muestras estudiadas tanto en condiciones normales como las sometidas a condiciones de humedad, de las 9 muestras en condiciones normales una dió positiva (> 20 ppb) y de las sometidas a condiciones de humedad 6 resultaron positivas (> 20 ppb).

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para la producción de micotoxinas (Gimeno, 2003); esto se relaciona con los resultados obtenidos, donde se notó que aquellas muestras que fueron sometidas a condiciones de humedad presentaron en su mayoría producción de aflatoxinas siendo positivas a concentraciones mayores de 20 ppb, ocurriendo lo contrario en las muestras analizadas en condiciones normales, lo que indica que al agregar agua al sustrato "*Zea mays*" se crea un ambiente propicio para la proliferación de hongos y su consecuente producción de micotoxinas, (Gimeno, *op cit*).

La mayoría de los hongos invaden los cereales a una humedad relativa (HR) del 70 % aproximadamente (Gimeno, 2003), sin embargo con una HR superior al 85 % existe una alta proliferación de los hongos productores de micotoxinas (Carrillo, 2003). En esta experimentación la HR promedio durante el período (Abril 2005-Agosto 2006) fue del 62, 5 % variando de esta forma en los lugares donde se realizó este estudio (Laboratorio de microbiología UNISUCRE 61 %, fuera del laboratorio 63 %, Tiendas 65 % y fuera de las tiendas 61 %). Según (Gimeno, 2003) una humedad relativa HR inferior al 65 % en semillas almacenadas difícilmente puede condicionar la invasión de hongos de la flora propia, aunque las muestras de "*Zea mays*" analizadas en este estudio presentaron hongos propios de la flora de este sustrato, es posible que la humedad relativa HR inferior al 65 % haya contribuido a encontrar solamente una muestra positiva de las 9 analizadas en condiciones normales; como en los resultados de esta investigación se tomaron pocas muestras de "*Zea mays*" en almacenamiento a las cuales se les analizaron las aflatoxinas presentes, se sugiere tomar un número mayor de muestras para corroborar los resultados obtenidos o realizar pruebas de detección de aflatoxinas con mayor grado de sensibilidad; ya que este ensayo es más que todo de carácter cualitativo, teniendo en cuenta además que las técnicas de inmunoensayo a pesar de las ventajas que presentan por su facilidad, rapidez y poco requerimiento de instrumentación lo cual permite analizar un gran número de muestras en poco tiempo puede presentar el inconveniente de que se presenten falsos positivos debido a las interferencias lo que puede dificultar la interpretación de los resultados, por lo que los valores positivos deben ser confirmados con otros métodos tales como las técnicas cromatográficas (HPLC Y TLC) las cuales permiten detectar aflatoxinas y otras toxinas en bajas cantidades y con estimaciones precisas; estas técnicas permiten una purificación y aislamiento de las toxinas para un estudio más detallado de ellas, ya que estas una vez aisladas pueden ser identificadas por métodos espectroscópicos (Gimeno, 2003; Lara, 2003).

La detección de aflatoxinas en "*Zea mays*" es un factor clave en el control de calidad de este producto, ya que las aflatoxinas son agentes causantes de

enfermedades en los animales y seres humanos. Muchos hongos de la flora de "*Zea mays*" se consideran toxigénicos, principalmente los de los géneros "*Aspergillus*", "*Penicillium*" y "*Fusarium*" (Goachin, 1983, Fulgueira y Borghi, 2000, Gaggiotti, 2001, Devegowda *et al*, 2002) los cuales fueron encontrados en la micoflora presente en las muestra de "*Zea mays*" analizadas.

Según (Devegowda *et.al*, 2002), algunas micotoxinas pueden encontrarse más frecuentemente que otras. En algunas regiones más frías como en Canadá, y países europeos caracterizados por una alta humedad pueden predominar: las vomitoxina, Zearalenona, Ocratoxinas, Diacetoxiscirpenol (DAS) y toxina (T-2), Las aflatoxinas que son las micotoxinas más comunes se encuentran en condiciones cálidas y húmedas Como las que existen en los países de Latinoamérica, Asia, África y Australia. Dadas estas condiciones, el estudio de las aflatoxinas fue uno de los pilares de esta investigación, teniendo en cuenta además que el moho "*Aspergillus flavus*", se considera el principal productor de aflatoxinas (Goachin, 1983; Koustenesov, 1998; Fulgueira y Borghi, 2000; Carrillo, 2003; Gimeno; 2003). Este hongo se observó en un alto porcentaje en la micoflora encontrada en las muestras de "*Zea mays*" (19%) lo que implica un estudio de aflatoxinas presentes debido a su consecuente producción. Estos resultados obtenidos en la detección de aflatoxinas presentes coinciden con (Izquierdo *et al*, 1996) quienes realizaron estudios de aflatoxinas en diversos productos; encontrando que de 10 muestras solo 3 de ellas presentaron niveles superiores a las 20 ppb.

La tabla N° 9, indica el resultado del screen fitoquímico de "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Sizygium aromaticum*", aparecen los resultados correspondientes a Alcaloides, quinonas, flavonoides, fenoles, terpenos, taninos y saponinas.

Tabla N° 9. Screen fitoquímico de “*Cinnamomum zeylanicum*” y “*Sizygium aromaticum*”.

“ <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ”		“ <i>Sizygium aromaticum</i> ”	
Alcaloides		Alcaloides	
Acido fosfotungstico	++	Acido fosfotungstico	++++
Erlyc	++	Erlyc	+
Hager	++	Hager	+++
Dragendork	-	Dragendork	++
Erban	+	Erban	+++
Wagner	++	Wagner	++
Quinonas	+	Quinonas	-
Flavonoides	+++	Flavonoides	++++
Fenoles	++	Fenoles	+++
Terpenos	++	Terpenos	+++
Taninos	-	Taninos	+
Saponinas	-	Saponinas	+

(+) Poco; (++) moderadamente; (+++) abundante; (++++) muy abundante, (-) negativo

En el extracto con ciclohexano de “*Cinnamomum zeylanicum*” se obtuvo un rendimiento de 0.28 %; para el extracto en cloroformo de 0.74 %; en el de acetona 0,74 % y para el de metanol 2.5 %.

En el extracto con ciclohexano de “*Sizygium aromaticum*” se obtuvo un rendimiento del 0,5 %; en el de cloroformo 0.9%, el de acetona 2% y para el de metanol 4.38 %.(ver anexo 4.3 sobre como se obtiene el rendimiento de los extractos en canela y clavo)

En la tabla N° 9 se muestran los resultados positivos ante la prueba de fenoles tanto para “*cinnamomun zeylanicum*” como “*sizygium aromaticum*” la presencia de estos compuestos explica la actividad biológica de estas dos plantas frente a los hongos estudiados, lo cual se relaciona con los reportes de (Carretero, 2000) quien dice que esta propiedad de los compuestos de tipo fenólicos es debida a la presencia de grupos hidroxilos, y parece que está ligada con la toxicidad del microorganismo, de manera que un aumento en la hidroxilación presenta una

mayor toxicidad, causando la inhibición enzimática de estos microorganismos frente a los compuestos oxidados.

Entre los compuestos de tipo fenólicos presentes en "*Cinnamomun zeylanicum*" y "*Sizygium aromaticum*" se encuentran el ácido cinámico y eugenol, los compuestos de tipo quinonas también se le atribuyen actividad frente a microorganismos mediante inhibición enzimática. (Carretero, 2000)

En el screen fitoquímico se observaron diferencias entre la canela "*Cinnamomun zeylanicum*" y el clavo "*Sizygium aromaticum*" con respecto a las coloraciones presentadas en las pruebas fitoquímicas, las cuales se dan si son compuestos hidrosolubles o concentrados, estos cambios ocurren en compuestos de tipo fenólicos y en taninos; en la prueba de fenoles para "*Cinnamomum zeylanicum*" se presentó una coloración verde muy intenso, mientras que para "*Sizygium aromaticum*" fue de color azul turquesa, según (Galindo *et.al*, 1989) el color azul en esta prueba indica que estos compuestos son de tipo hidrosolubles y un color verde oscuro puede indicar que son catecolicos o concentrados, lo que explica las diferencias observadas en el screen para estas dos plantas.

Los taninos también tienen un rango amplio de inhibición de hongos y bacterias a si como a los alcaloides se les atribuye actividad frente a microorganismos el cual parece ser mediante interacción en la pared celular y el DNA del microorganismo. (Domingo y López, 2003).

El eugenol es un compuesto de tipo fenólico abundante en el clavo "*sizygium aromaticum*" cuya presencia ha sido reportada por muchos autores (Ranasinghe *et.al*, 2002; Boulevard, 2005). Al cinemaldehido se le ha atribuido actividad contra los hongos (Morozumi, 1978; Ranasinghe *et.al*, 2002 *et. al*, 2005), en la Canela "*Cinnamomun zeylanicum*" están presente terpenos de el linalol, terpenos (pineno, cíneol y felandreno). Según (Padrón *et, al* 2003) en el extracto en éter de petróleo (baja polaridad) se encontraron alcaloides, terpenos y esteroides y en el extracto en acetona oxhidrilos, fenoles y cumarinas los cuales se les considera

responsables de la actividad biológica de las plantas, según (Coleman y Anderson, 1985), se habían mencionado como compuestos producidos por las plantas en respuesta incompatibles con respecto a los hongos.

Estas diferencias presentes en la composición química de "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Sizygium aromaticum*". Son las responsables de las variaciones en cuanto a la efectividad de una planta con respecto a la otra, según (padrón *et.al*, 2003) el clavo mostró mayor efectividad que la canela contra algunos microorganismos, esta diferencia con los resultados de esta investigación puede atribuirse a que los microorganismos utilizados en el presente estudio no fueron los mismos que los del citado trabajo, al igual que la diferencia en los solventes utilizados.

Las foto N° (29a) y (29b), ilustra los halos de inhibición obtenidos con el extracto en ciclohexano de ("*Cinnamomum zeylanicum*") para "*Aspergillus flavus*" a las concentraciones de 30mg/mL (halo N° 1), 20mg/mL (halo N° 2), la perforación observada en el centro del cultivo corresponde al control negativo dimetilsulfoxido (DMSO); las concentraciones de 10mg/mL (halo N° 3) y 2mg/mL (halo N°4); los halos de inhibición obtenidos con los demás extractos (en cloroformo, acetona y metanol) de ("*Cinnamomum zeylanicum*") y ("*Sizygium aromaticum*") a las concentraciones mencionadas se visualizan de la misma forma para los 7 hongos estudiados, únicamente se presenta variación en los diámetros de dichos halos.

Foto N° 29 a. Halos de inhibición obtenidos con el extracto en ciclohexano de "*Cinnamomum Zeylanicum*" para "*Aspergillus flavus*" a las concentraciones 30 mg/ ml (halo N°), 20 mg/ ml (halo N° 2) y DMSO (centro).



Foto N° 29 b. Halos de inhibición de “*Aspergillus flavus*” a concentraciones 10 mg/ml y 2 mg/ ml.



La foto N° (30) Muestra el halo de inhibición obtenido con el control positivo griseofulvina a una concentración de 1000 mg/mL para el “*Aspergillus flavus*”; de las tres concentraciones trabajadas, esta representó mayor efectividad frente a los hongos evaluados causando sensibilidad, mientras que las concentraciones 0.2 mg/ml y 30mg/ml no lograron producir inhibición.

Foto N° 30. Halos de inhibición para “*A. flavus*” con griseofulvina A concentración 1000 mg / ml.



Las fotos N° (31a) y (31b). Muestra los halos de inhibición del hongo “*Paecylomices sp.*”, con el extracto en cloroformo de (“*Cinnamomum zeylanicum*”) a las concentraciones tratadas. De los 7 hongos estudiados solamente este presentó cambio de coloración con los tratamientos tanto de (“*Cinnamomum zeylanicum*”) y (“*Sizygium aromaticum*”), cambiando su color natural gris-azul verdoso a rosado.

Foto N° (31 a). Sin tratamiento. "*Paecylomices sp.*"



Foto N° (31 b). Con tratamiento de canela "*Paecylomices sp.*" con cloroformo.).



Estos cambios de color de los hongos en el medio de cultivo han sido reportados en otras investigaciones; (Stauffer *et.al.* 2000) encontraron que extractos de plantas como los de cerraja ("*Sonchus oleraceus*"); pipi ("*Petiveria alliacea*"); polea ("*Lippia sp.*"), zarzaparrilla("*Herrena montevidensis*"); e hinojo ("*Apium graveolens*"); causaron alteraciones en el comportamiento del hongo "*Fusarium sp.*", a través del cambio de color del sustrato (medio de cultivo) y del desarrollo miceliar; en los demás hongos de esta investigación también se presentaron algunas alteraciones en el crecimiento del micelio, percibiéndose estas estructuras miceliales con una consistencia pastosa a diferencia de su estado normal.

Este cambio de color en "*Paecilomyces sp.*", se relaciona con lo dicho por (Maynor, 1998) quien afirma que la coloración de un hongo puede variar dependiendo de la fase de desarrollo, los nutrientes en el sustrato, la presencia de otros organismos, la edad del cultivo y otros factores ambientales, y el color de un hongo en particular puede ser causado por los micro-nutrientes del sustrato, pigmentos en el hongo mismo en el color de sus esporas, otra causa de los cambios de coloración se presentan por hidrólisis de los compuestos químicos producidos en el proceso digestivo y subproductos excretados; se sabe además que ciertos hongos producen pigmentos y pueden causar cambios extensivos de color en el sustrato, aun cuando su crecimiento sea limitado; ciertos tipos de pigmentos prevalecen más en colonias viejas y son más profundos en aquellas áreas donde las hifas, se han deteriorado, dado que los extractos de las dos plantas utilizadas en este estudio provocaron sensibilidad en los hongos tratados, es posible que estos tratamientos produjeran algún deterioro en las hifas de "*Paecilomyces sp.*", lo que puede haber incrementado el cambio de coloración junto con la producción de pigmentos, que asociado con las manchas pueden ser el resultado del ataque al organismo, incluyendo las condiciones ambientales adversas incorporadas para retardar su crecimiento o incluso la fumigación. Teniendo en cuenta que los extractos fueron utilizados por sus propiedades antifúngicas como métodos de control de hongos, y según lo dicho por (Maynor, 1998) es posible que el cambio de coloración presentado se haya dado por condición de estrés en este microorganismo.

Según (Maynor, 1998), el pH juega un papel importante en el crecimiento de los hongos en el medio de cultivo, la mayoría de ellos crecen mejor en un medio ligeramente ácido; cuando se producen condiciones adversas o al agregar al medio ciertas sustancias que pueden inducir cambios de pH, este cambio contribuye a la producción de metabolitos ácidos o básicos lo que puede generar cambios de coloración en el hongo; los extractos de estas dos plantas pudieron generar un cambio de pH en el medio de "*Paecilomyces sp.*", induciendo su producción como respuesta química.

Muchas de estas condiciones de estrés para estos microorganismos pueden provocar mutaciones responsables de cambios de color en el micelio en los medios de cultivo (Maynor, 1998).

Las tabla N° 10 y 11, indican las medias en milímetros (mm) de los halos de inhibición de cada uno de los respectivos hongos encontrados en las muestras de (“*Zea mays*”) después de haber sido sometidos a los tratamientos con los diferentes extractos de la corteza de (“*Cinnamomum zeylanicum*”) y de los capullos de (“*Sizygium aromaticum*”), los cuales fueron:

1- “*Aspergillus flavus*”, 2- “*Mucor sp (1*)*”, 3- “*Aspergillus niger*”, 4- “*Fusarium sp*”, 5- “*Penicillium purpurogenum*”, 6- “*Penicillium sp (1*)*”, 7- “*Paecylomices sp*”.

Tabla N° 10. Tratamientos de (“*Cinnamomum zeylanicum*”) frente a los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” (medias de los halos de inhibición en mm al tercer día).

Ciclohexano				
hongos	[30 mg/mL]	[20 mg/mL]	[10mg/mL]	[2mg/mL]
1	24.5	23.5	15.6	10.3
2	33.3	30.0	11.5	7.8
3	25.0	20.0	12.1	0
4	28.6	24.3	14.1	6.6
5	35.0	41.6	0	0
6	53.8	47.0	10.4	0
7	48.3	50.6	21.3	0
Cloroformo				
1	34.3	26.2	18.7	16.6
2	19.7	12.8	0.0	0.0
3	31.3	22.6	20.7	11.3
4	51.8	52.3	37.4	12.6
5	94.5	94.5	20.3	0.0
6	50.4	49.2	25.0	0.0
7	51.4	49.0	36.0	0.0
Acetona				
1	22.5	34.3	0.0	0.0
2	37.8	28.9	28.6	0.0
3	25.5	19.3	0.0	0.0
4	23.6	25.0	17.6	0.0
5	49.3	53.4	24.6	0.0
6	56.0	59.0	22.8	18.6
7	42.8	35.0	25.7	0.0
Metanol				
Negativo para los siete hongos.				

Tabl 11 N°. Tratamientos de ("*Sizygium aromaticum*") frente a los 7 hongos aislados de "*Zea mays*" (medias de los halos de inhibición en mm al tercer día).

		Ciclohexano		
hongos	[30 mg/mL]	[20 mg/mL]	[10 mg/mL]	[2 mg/mL]
1	20.1	19.5	18.0	7.0
2	34.3	25.8	20.8	20.2
3	31.7	21.6	17.6	9.0
4	35.5	31.7	18.5	17.0
5	23.0	24.4	18.8	9.3
6	14.1	14.7	10.0	1.0
7	15.1	15.5	14.8	0.0
Cloroformo				
1	21.2	19.7	0.0	0.0
2	56.6	53.6	31.2	0.0
3	26.1	19.5	8.5	0.0
4	43.5	37.6	29.2	23.0
5	94.5	94.5	39.0	0.0
6	24.9	16.4	15.6	10.0
7	29.1	27.6	17.1	20.6
Acetona				
1	21.6	14.6	12.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0
3	25.9	20.6	12.5	10.8
4	36.3	37.6	0.0	0.0
5	45.6	46.9	19.3	18.0
6	23.8	20.8	11.1	7.9
7	30.3	21.8	16.8	12.0
Metanol				
Negativo para los siete hongos.				

Las medias en milímetros que aparecen en las tablas N° 10 y N° 11 correspondientes a los halos de inhibición indican el grado de sensibilidad de cada uno de los siete microorganismos al tercer día de tratamiento con canela y clavo, aquellos que presentaron mayor diámetro en milímetros (mm) fueron los mas sensibles, el extracto en cloroformo produjo mayor sensibilidad a estos patógenos mientras que el extracto en metanol tuvo un efecto negativo ya que no produjo inhibición en ninguno de los siete hongos, lo que indica que si hubo crecimiento fúngico en lugar de halos ya que ninguno de ellos fue sensible a este extracto; de las cuatro concentraciones trabajadas para la mayoría de los siete hongos la concentración de 30mg/ml produjo halos de inhibición mas grande que las demás,

la concentración de 2mg/ml produjo menos sensibilidad en los microorganismos estudiados ya que tuvieron diámetros menores o incluso fueron nulos para algunos.

Figura N° 14 . Comportamiento de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”, al 3 día de tratamiento con los diferentes extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*”.

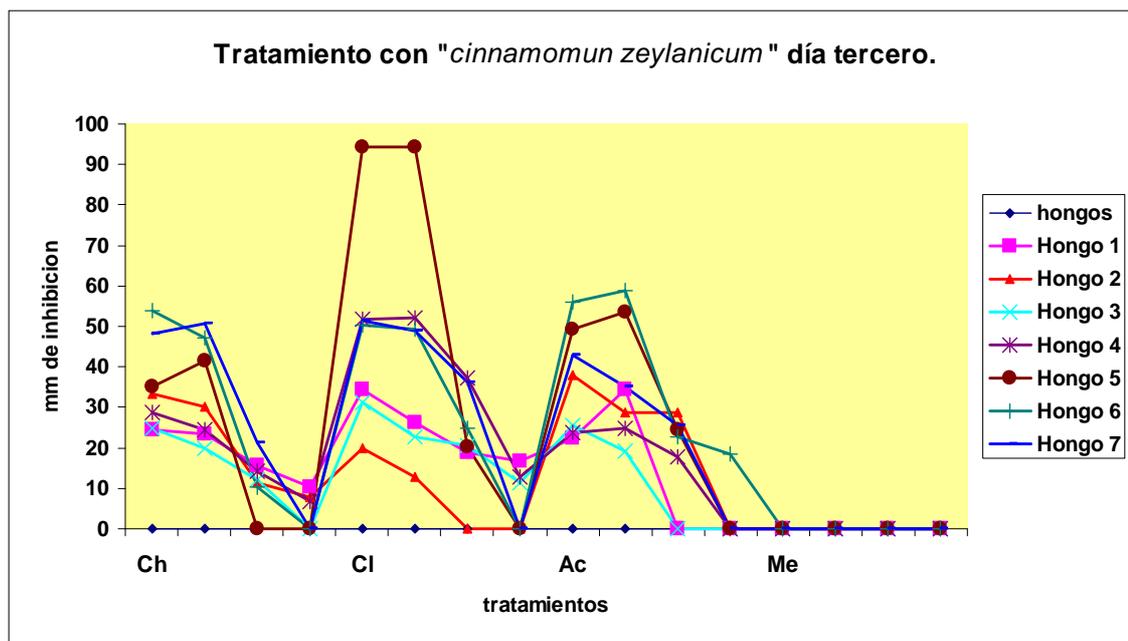
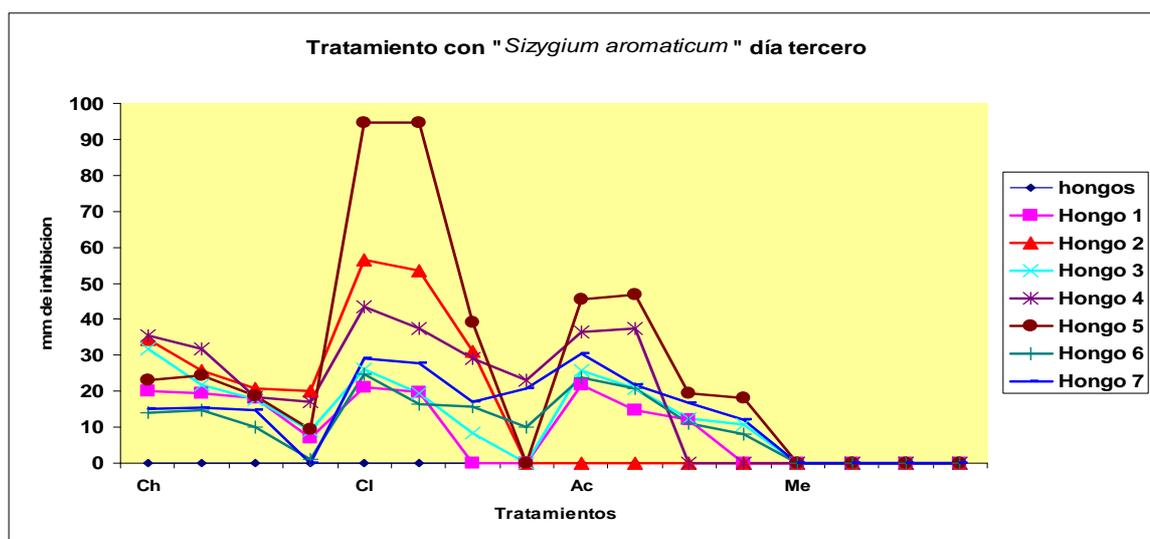


Figura N° 15 . Comportamiento de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”, al 3 día de tratamiento con los diferentes extractos de clavo de olor “*Sizygium aromaticum*”.



A continuación las tablas N° 12 y 13. Muestran las medias de los halos de inhibición en mm de los 7 hongos aislados de *Zea mays* al quinto (5) día de tratamiento con los extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Sizygium aromaticum*".

Tabla N° 12. Tratamientos de extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" frente a los 7 hongos aislados de "*Zea mays*". (medias en milímetros al 5 día).

Ciclohexano				
Hongos	[30 mg/ mL]	[20mg/mL]	[10mg/mL]	[2mg/mL]
1	11.3	17	15.6	7
2	10.1	7.6	7	7.1
3	8.5	6.5	7.5	7
4	27.8	23.9	11.4	5.3
5	34.3	40.6	0	0
6	50.2	45.8	8	0
7	46.2	48.6	19.6	0
Cloroformo				
1	16.1	16.8	13.6	9.2
2	18.8	11.3	0	0
3	25.1	21.3	16.3	10
4	50.6	50.2	35.3	10.6
5	94.5	94.5	18.6	0
6	44.8	48.6	0	0
7	49.3	47.3	34.6	0
Acetona				
Hongos	[30 mg/ mL]	[20mg/mL]	[10mg/mL]	[2mg/mL]
1	18.5	12.6	0	0
2	34.2	25.3	24.7	0
3	23.4	17.4	0	0
4	20.6	20	16.6	0
5	47.6	50.8	20.6	0
6	22.8	48.6	20.8	16.8
7	27	33	23.2	0

Tabla N°13. Tratamientos con extractos de clavo de olor "*Sizygium aromaticum*" frente a los 7 hongos aislados de "*Zea mays*", (medias en milímetros al 5 día).

Ciclohexano				
Hongos	[30 mg / mL]	[20mg/mL]	[10 mg/ mL]	[2 mg/ mL]
1	15.3	15	14	3
2	28.8	24.7	17.6	19.8
3	26.5	18.3	15.6	0
4	30.6	28.7	14.8	10
5	18	20.6	16.9	0
6	13.9	11.9	0	0
7	12.6	13.6	10.8	0
Cloroformo				
1	18.4	16.6	0	0
2	52.6	50.2	29.8	0
3	20.2	14.8	4.2	0
4	40.1	30.2	20.6	18
5	94.5	94.5	35	0
6	20.2	10.6	13.2	9.6
7	25.3	20.5	15.5	10.2
Acetona				
1	20.2	10.9	8	0
2	0	0	0	0
3	24.2	17.3	9.5	4.4
4	30.2	30.1	0	0
5	40.8	40.2	10.2	10
6	50.4	17.8	6.6	3.3
7	40.3	18.1	10.5	8

Figura N° 16. Comportamiento de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” al 5 día de tratamiento con los diferentes extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*”.

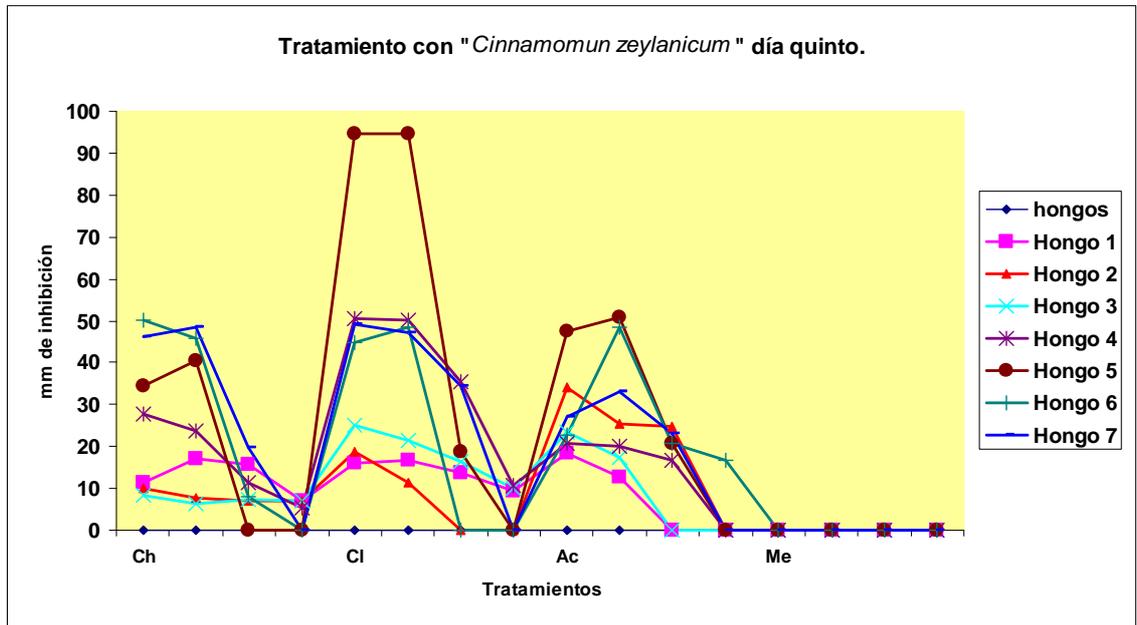
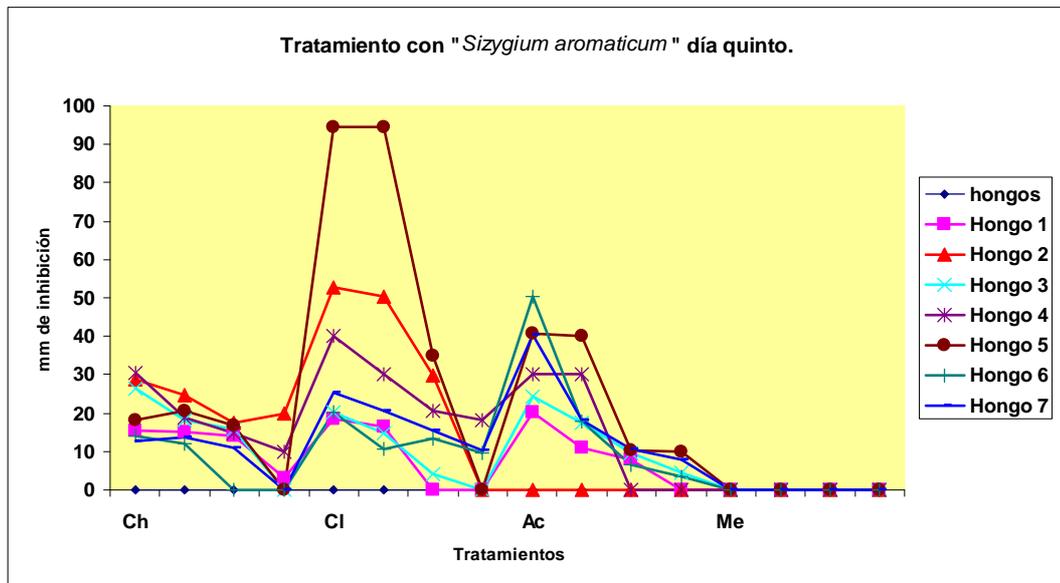


Figura N° 17. Comportamiento de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” al 5 día de tratamiento con los diferentes extractos de clavo de olor “*Sizygium aromaticum*”.



Las Tablas N° 14 y 15. Muestran las medias en milímetros de los 7 hongos aislados de "Zea mays" al 7 día de tratamiento con los extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Sizygium aromaticum*".

Tabla N° 14. Medias en milímetros para los 7 hongos aislados de "Zea mays" tratados con los extractos de "*Cinnamomum zeylanicum*" al 7 día.

Ciclohexano				
hongos	[30 mg/ mL]	[20 mg / mL]	[10 mg/ mL]	[2 mg / mL]
1	19.5	19	8	6
2	9	0	0	0
3	8	3.5	0	0
4	25	19.3	10.3	3.3
5	0	0	0	0
6	46.4	40.8	3	0
7	42.8	40.5	15.4	0
Cloroformo				
1	12	15.4	0	0
2	6	7	0	0
3	18.6	11.1	0	0
4	33.6	21.6	6	0
5	94.5	94.5	10	0
6	40.2	40.2	0	0
7	45.2	44.9	30.2	0
Acetona				
1	18.5	12.6	0	0
2	34.2	25.3	24.7	0
3	23.4	17.4	0	0
4	20.6	20	16.6	0
5	47.6	50.8	20.6	0
6	22.8	48.6	20.8	16.8
7	27	33	23.2	0

Tabla N° 15. Medias en milímetros de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” al 7 día de tratamiento con los extractos de clavo de olor “*Sizygium aromaticum*”.

Ciclohexano				
hongos	[30 mg / mL]	[20 mg / mL]	[10 mg / mL]	[2 mg / mL]
1	15.3	15	14	3
2	28.8	24.7	17.6	19.8
3	26.5	18.3	15.6	0
4	30.6	28.7	14.8	10
5	18	20.6	16.9	0
6	13.9	11.9	0	0
7	12.6	13.6	10.8	0
Cloroformo				
1	18.4	16.6	0	0
2	42.6	50.2	29.8	0
3	20.2	14.8	4.2	0
4	40.1	30.2	20.6	18
5	94.5	94.5	35	0
6	20.2	10.6	13.2	9.6
7	25.3	20.5	15.5	18.2
Acetona				
1	20.2	10.9	8	0
2	0	0	0	0
3	24.2	17.3	9.5	4.4
4	30.2	30.1	0	0
5	40.8	40.2	10.2	10
6	50.4	17.8	6.6	3.3
7	40.3	18.1	10.5	8

En las tablas N° (12 y 13 correspondiente a las medias de inhibición de los hongos al 5 día de tratamiento), (Tablas N° 14 Y 15 correspondientes a las medias (mm) de inhibición al 7 día), se observa una disminución en las medidas de estas medias de inhibición en milímetros (mm), lo cual se debe a la aparición de crecimiento fúngico, lo que indica una menor actividad biológica de los extractos tanto de canela como de clavo sobre estos 7 hongos evaluados a medida que transcurren los días. Los solventes ciclohexano, cloroformo y acetona que aparecen en las tablas 10 a 15 fueron los utilizados para realizar los extractos de canela y clavo, al igual que los solventes que aparecen en las gráficas de las figuras N° 14 a 19.

Figura N° 18 .Comportamiento de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” al 7 día de tratamiento con los diferentes extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*”.

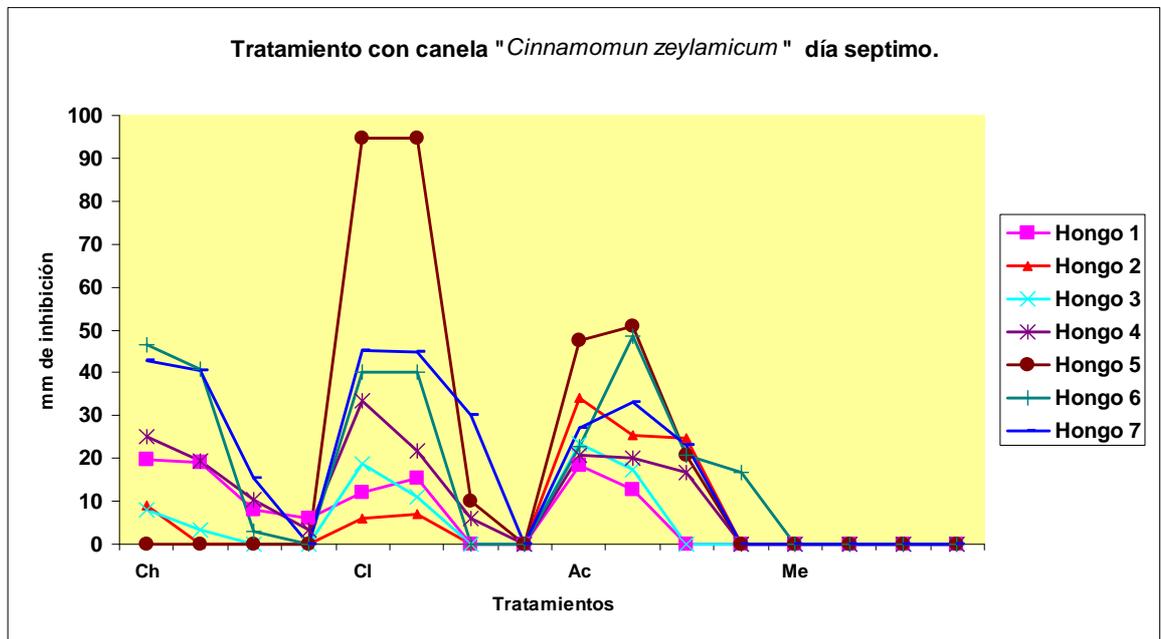
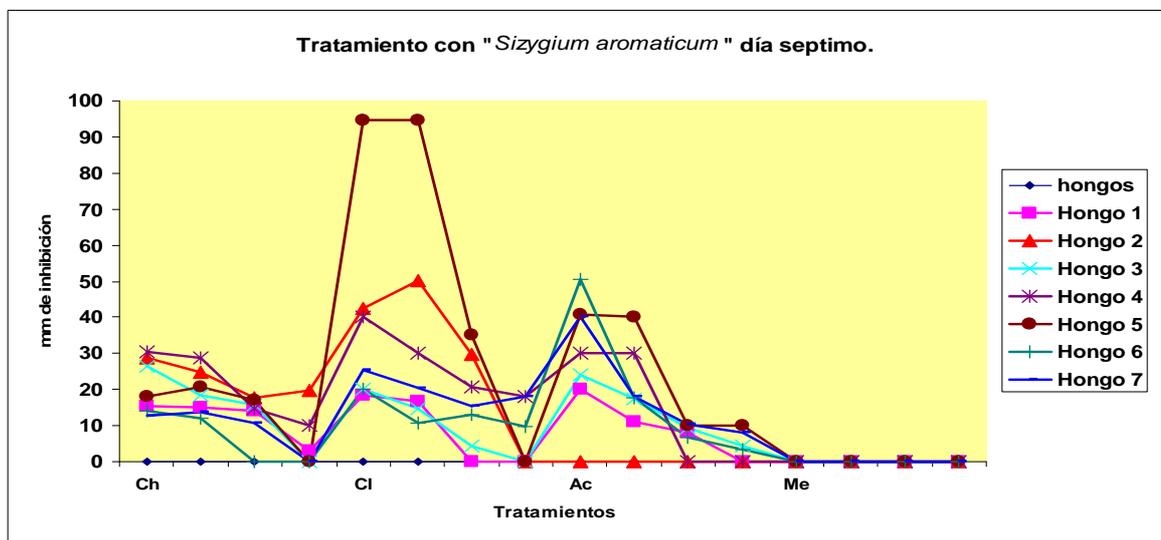


Figura N° 19. Comportamiento de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” al 7 día de tratamiento con los diferentes extractos de “*Sizygium aromaticum*”.



Las figuras (N° 14 a 19) explican el comportamiento de los siete hongos (1- “*Aspergillus flavus*”, 2- “*Mucor sp* (1*)”, 3- “*Aspergillus niger*”, 4- “*Fusarium sp*”, 5- “*Penicillium purpurogenum*”, 6- “*Penicillium sp* (1*)”, 7- “*Paecylomices sp.*”), frente

a los tratamientos con extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Syzygium aromaticum*" a las diferentes concentraciones tratadas. En el eje x aparecen los cuatro extractos evaluados, los cuales tienen cuatro intervalos donde cada uno de ellos es representado por una letra (Ch=ciclohexano, Cl=cloroformo, Ac=acetona, Me=metanol), en el eje de las y se representan en milímetros (mm) las medias de los halos de inhibición, cada color de línea indica uno de los siete hongos, en cada intervalo correspondiente a un extracto aparecen las cuatro concentraciones (30mg/ml, 20mg/ml, 10mg/ml, 2mg/ml) en orden sucesivo de mayor a menor, dichas concentraciones están representadas por una figura la cual es característica para cada hongo.

Al tercer día de tratamiento la mayoría de los hongos presentaron picos más altos en las curvas de comportamiento con los extractos de "*Cinnamomum zeylanicum*" en relación a los de "*Syzygium aromaticum*" (ver figura 14 y 15), esto indica una mayor sensibilidad de estos hongos con los extractos de canela, en cada intervalo representativo de un extracto se observa que la mayoría de las líneas comienzan elevadas, estos picos corresponden a las concentraciones de 30mg/ml y 20mg/ml a las cuales fueron más sensibles los hongos, al final de cada intervalo se observa una caída correspondiente a la concentración de 2mg/ml a la cual fueron menos sensibles estos microorganismos; todos los hongos frente al extracto de metanol registraron efecto nulo lo cual puede apreciarse en estas gráficas por no presentar elevación en este intervalo.

En la figura N° 16 correspondiente al comportamiento de los hongos al 5 día de tratamiento con los extractos de "*C. zeylanicum*" se observa una disminución en el diámetro de los halos para algunos hongos en relación al tercer día, esto indica la aparición de crecimiento fúngico; se aprecia detalladamente las caídas de las curvas para los tres intervalos correspondientes a los extractos en ciclohexano, cloroformo y acetona en el hongo 1 ("*A. flavus*") representado en línea fucsia, en el hongo 6 ("*Penicillium sp 1**") representado en línea azul-verdosa se observan algunas caídas en el pico correspondiente a extracto en acetona, para el hongo 2 ("*Mucor sp 1**") representado en línea roja se aprecia una caída correspondiente

al intervalo del extracto en ciclohexano a las concentraciones 30 mg/ ml y 20 mg/ ml (compara los resultados de esta figura 16 con los de la figura 14).

En la figura N° 17 correspondiente al comportamiento de los 7 hongos al 7 día de tratamiento con los extractos de "*S. aromaticum*", se puede notar que estos microorganismos se comportaron de una manera similar al tercer día con relación a los extractos de esta misma planta al tercer día, esto quiere decir que la actividad biológica se mantuvo, se registró una caída para el hongo "*Fusarium sp*" (representado en línea morada) en el intervalo correspondiente al extracto en ciclohexano de clavo a la concentración 20 mg/ ml (ver figura 17 y comparar con la figura 15).

La Figura N° 18 correspondiente al 7 día de tratamiento con los extractos de "*C. zeylanicum*" en relación al 5 día de tratamiento de los hongos con estos mismos extractos, se puede apreciar que los hongos 2 (*Mucor sp 1**), representado en línea roja, hongo *A. niger* en azul clara, hongo 4 ("*Fusarium sp*") representado en línea morada registraron caídas apreciables para los tres intervalos correspondientes a los extractos en ciclohexano, cloroformo y acetona (compara la figura N° 18 con la figura N° 16).

La figura N° 19 no muestra muchas diferencias en el comportamiento de los hongos con los extractos de "*S. aromaticum*" en comparación con el comportamiento de estos microorganismos al 5 día graficados en la figura N° 17), esto indica que la actividad biológica de los extractos de clavo se mantiene casi igual desde el tercer día al 5 día.

En forma general el hongo 5 ("*Penicillium purpurogenum*") representado en línea caoba presentó un pico bastante elevado en el intervalo correspondientes al extracto en cloroformo tanto de canela como de clavo a las concentraciones de 30 mg/ ml y 20 mg/ ml en comparación al comportamiento de los demás hongos, el comportamiento del hongo "*P. purpurogenum*" se mantuvo desde el 3 al 7 día, indicando que este hongo fue el más susceptible, notese que este pico

permanece con la misma elevación en las figuras N° (15 a 19) donde se representa el comportamiento de los hongos desde el tercer día hasta el séptimo.

Entre el 8 y 10 día no se observó presencia de halos en ninguno de los hongos, notándose un crecimiento total de estos en las cajas. Lo que indica que transcurrido este tiempo ya no hay actividad biológica de los extractos de canela y de clavo sobre los 7 hongos evaluados.

En la Tabla N° 16. Aparecen los medias de halos de inhibición en milímetros (mm) obtenidos al tercer día de tratamiento de los hongos con el control positivo (antifúngico griseofulvina) a diferentes concentraciones: [0.2 mg/mL], [30 mg/mL] y [1000 mg/mL], se observa que el hongo 2 (“*Mucor sp1**”) fue muy sensible a las tres concentraciones del control positivo griseofulvina evidenciado por la ausencia de su crecimiento en las cajas de petri, el diámetro en milímetros (mm) que aparece en las tres columnas de la tabla 16 (94,5 mm) corresponde al diámetro total de las cajas petri, mientras que los demás hongos solo fueron sensibles a la concentración 1000 mg/ml, nótese que en la columna correspondiente a esta concentración se obtuvieron halos cuyas medidas en milímetros aparecen registradas, mientras que en las columnas correspondientes a las concentraciones 0,2 mg/ml y 30 mg/ ml no se obtuvieron halos por lo que las medidas obtenidas fueron (0 mm).

Tabla N° 16 .Halos de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” con el control positivo griseofulvina al tercer día.

hongos	[0.2 mg/mL]	[30 mg/mL]	[1000 mg/mL]
1	0.0	0.0	42.0
2	94.5	94.5	94.5
3	0.0	0.0	42.0
4	0.0	0.0	45.0
5	0.0	0.0	74.9
6	0.0	0.0	51.6
7	0.0	0.0	33.3

TABLA N° 17. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN RELATIVO DE CANELA "*Cinnamomum zeylanicum*" CON LOS DIFERENTES EXTRACTOS A LA CONCENTRACIÓN DE 30mg/ml CON RESPECTO A LA GRISEOFULVINA A 1000mg/ml

Hongos	Medias de halos de <i>Griseofuivina</i> mm	Medias de halos con el extracto ciclohexano en mm.	% de inhibición relativo	Medias de halos con el extracto de cloroformo	% de inhibición relativo	Medias de halos con el extracto de Acetona	% de inhibición relativo
1	42	24,5	58,33%	34,3	81,66%	22,5	76,23%
2	94,5	33,3	35,23%	19,7	20,84%	37,8	40%
3	42	25	59,52%	31,3	74,52%	25,5	66,71%
4	45	28,6	6,,55%	51,8	115,11%	23,6	52,44%
5	74,9	35	46,72%	94,5	126,16%	49,3	65,85%
6	51,6	53,8	164,26%	50,4	105,42%	56	108,52%
7	33,3	48,3	104,04%	51,4	154,35%	42,8	129,69%

TABLA N° 18. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN RELATIVO DE CLAVO DE OLOR“*Sizygium aromaticum*” A UNA CONCENTRACIÓN DE 30mg/mL CON RESPECTO A LA GRISEOFULVINA A 1000mg/mL

Hongos	Medias de halos de <i>griseofuivina</i> mm	Medias de halos con el extracto ciclohexano	% de inhibición relativo	Medias de halos con el extracto de cloroformo	% de inhibición relativo	Medias de halos con el extracto de Acetona	% de inhibición relativo
1	42	20,1	47,85%	21,2	50,97%	21,6	51,42%
2	94,5	34,3	36,29%	56,6	59,89%	0	0%
3	42	31,7	75,47%	26,1	62,14%	25,9	61,66%
4	45	35,5	78,88%	43,5	96,66%	36,3	80,66%
5	74,9	23	30,70%	94,5	126,16%	45,6	60,88%
6	51,6	14,1	27,32%	24,9	48,25%	23,8	46,12%
7	33,3	15,1	45,34%	29,1	87,38%	30,3	90,99%

Los porcentajes (%) de inhibición relativa (INR) que aparecen en las tablas 17 y 18 se obtuvieron mediante la fórmula:

$$\% \text{ INR} = \frac{\text{Diámetro del halo de mayor tamaño}}{\text{Diámetro del control positivo}} \times 100$$

El % de inhibición relativo de los extractos mide la efectividad o actividad de los extractos de acuerdo a los halos de inhibición, dado que hay que escoger el diámetro del halo de mayor tamaño para establecer esta relación, se tuvieron en cuenta los halos obtenidos con la concentración de 30 mg/ml tanto de canela como de clavo para los respectivos hongos, debido a que esta fue la que causó mayor sensibilidad en los microorganismos aislados de "*Zea mays*", hecho que pudo ser comprobado por los análisis estadísticos, para establecer la relación se tomaron en cuenta los halos con la concentración 1000 mg/ml de la griseofulvina que fue el control positivo, el INR permite determinar si las sustancias a las cuales se les va a evaluar su actividad biológica frente a un determinado microorganismo, son activas o no. Según (Ayala y Bozzi, 1998) los extractos de una determinada sustancia se pueden considerar activos si sus % de inhibición relativos resultan ser mayores o iguales al 20%.

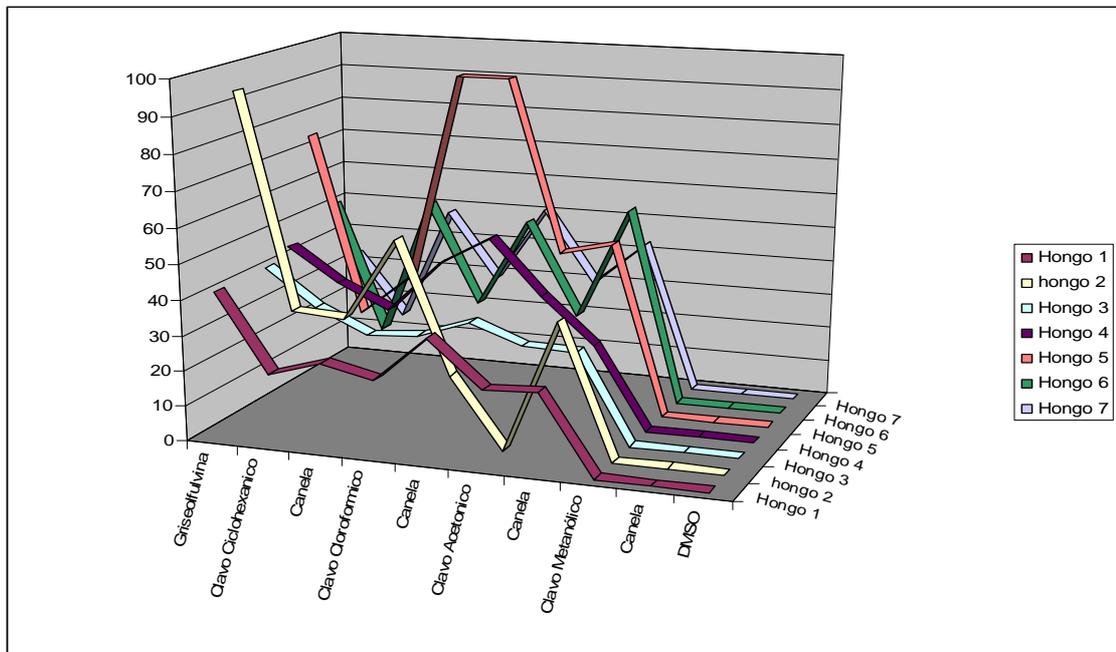
Nótese en las tablas 17 y 18 que los hongos tratados tuvieron en general % de inhibición relativos superiores al 20%, esto indica que estos extractos a la concentración 30 mg/ml lograron ser efectivos frente a los 7 hongos aislados de "*Zea mays*" evaluados en esta investigación, dado que la concentración de 30 mg/ml causó gran sensibilidad evidenciado por el tamaño de los halos.

Los anexos N° c.1 y c.2 Explican detalladamente como se obtuvieron los % de inhibición relativos representados en las tablas N° 17 Y 18.

Figura N° 20 Comportamiento de los hongos: 1- "*Aspérgillus flavus*", 2- "*Mucor sp 1**", 3- "*Aspergillus niger*", 4- "*Fusarium sp*", 5- "*Penicillium purpurogenum*", 6- "*Penicillium sp*", 7- "*Paecylomices sp*", con los diferentes extracto: ciclohexano,

cloroformo, acetona y metanol tanto de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Syzygium aromaticum*" a la concentración de 30 mg/ mL por ser la de mayor significancia , ya que esta fue la causó más inhibición sobre los 7 hongos aislados de "*Zea mays*" y esto pudo ser comprobado por el análisis estadístico; se aprecia también el efecto de estos hongos con el control positivo (griseofulvina a una concentración de 1000 mg/ mL) y con el control negativo (DMSO).

Figura N° 20. Comportamiento de los 7 hongos aislados de "*Zea mays*" con los extractos de "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Syzygium aromaticum*" a concentración 30mg/mL; controles (positivo y negativo).



La figura N° 20 es un plano tridimensional donde en el eje x se representan los cuatro extractos a la concentración de 30mg/mL tanto de canela como de clavo, la griseofulvina (control positivo a concentración de 1000mg/mL) y el control negativo dimetil sulfoxido (DMSO), en el eje y se representan las medias de los halos de inhibición, cada cinta representada en un color característico corresponden a cada uno de los siete hongos aislados de "*Zea mays*". Nótese que para todos los hongos el extracto en metanol tanto de "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Syzygium*

aromaticum” se encuentran representados en forma plana y al mismo nivel que el control negativo (DMSO) y no se observa ninguna elevación, esto indica que estos extractos en metanol de ambas plantas a concentración de 30mg/mL presentaron un efecto nulo sobre estos patógenos al igual que el control negativo; se observa que la cinta en color amarillo claro correspondientemente al hongo N° 2 (“*Mucor sp. (1*)*”) registra una elevación superior a los demás hongos en el tramo correspondiente al control positivo griseofulvina, lo cual indica la alta sensibilidad de este hongo a dicho compuesto a la concentración 1000 mg/mL siendo mayor el efecto que el causado por los extractos de canela y clavo a concentración de 30mg/mL, mientras que para el hongo N° 5 (“*Penicillium purpurogenum*”) representado en cinta roja clara presentó mayor susceptibilidad a los extractos de cloroformo de estas dos plantas con relación a los demás hongos, nótese la elevación en este tramo. Los hongos N° 1 “*A. flavus*” y hongo N° 3 “*A. niger*” representados en cintas vino tinto y azul clara respectivamente presentaron picos mas bajos frente a los extractos de estas dos plantas en comparación con los demás hongos, al igual que con el control positivo, esto indica baja sensibilidad.

4.3 ANALISIS ESTADISTICO

Para las pruebas de sensibilidad de los 7 hongos de “*Zea mays*” frente a los extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*” y clavo de olor “*Sizygium aromaticum*” se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS versión 5.1.

Se utilizó un diseño factorial de 2x3x4x7 para las pruebas de sensibilidad de los 7hongos de “*Zea mays*” frente a los extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*” y clavo “*Sizygium aromaticum*” según los siguientes factores que aparecen en la siguiente tabla 19.

Tabla Nº 19 Diseño factorial de 2x3x4x7 para las pruebas de sensibilidad de "Aromaticum".

Los hongos de Zea mays frente a los extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Sizygium aromaticum*"

Factor		
Planta	2	" <i>Cinnamomum zeylanicum</i> " y " <i>Sizygium aromaticum</i> "
Solución	3	Extractos en: ciclohexano, cloroformo, acetona
Concentración	4	30, 20 , 10 y 2 mg/ mL
Hongos	7	1- " <i>Aspergillus flavus</i> ", 2- " <i>Mucor sp1*</i> ", 3- " <i>Aspergillus niger</i> ", 4- " <i>Fusarium sp</i> ", 5- " <i>Penicillium purpurogenum</i> ", 6- " <i>Penicillium sp (1*)</i> ", 7- " <i>Paecylomices sp</i> ".

El asterisco (*) indica las especies de un mismo género las cuales no fueron identificadas.

Tabla Nº 20. Análisis de la varianza para inhibición (pruebas de sensibilidad) ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES				
A: PLANTA	1959,6	1	1959,6	0,0000 **
B: SOLUCIÓN	8853,74	2	4426,87	0,0000 * *
C:CONCENTRACIÓN	73071,9	3	24357,3	0,0000 **
D: HONGOS	19761,7	6	3293,61	0,0000 **
INTERACCIONES				
AB	319,183	2	159,591	0,0002 **
AC	3674,33	3	1224,78	0,0000 **
AD	6109,16	6	1018,19	0,0000 **
BC	3025,72	6	504,286	0,0000 **
BD	14963,7	12	1246,97	0,0000 **
CD	14901,3	18	827,848	0,0000 **
ABC	1011,16	6	168,526	0,0000 **
ABD	12122,2	12	1010,18	0,0000 **
ACD	5153,59	18	286,311	0,0000 **
BCD	12140,2	36	337,226	0,0000 **
ABCD	7145,38	36	198,483	0,0000 **
RESIDUOS				
TOTAL (CORREGIDO)	6180,09	336	18,3931	
	190393,0	503		

La tabla N° 20 representa el análisis de varianza de las pruebas de sensibilidad, esta anova es un análisis de varianza múltiple con un diseño factorial de 2x3x4x7, dichos factores fueron explicados detalladamente en la tabla N° 19, el análisis de varianza es una prueba estadística que permite establecer si hay diferencias significativas entre los factores analizados.

Al comienzo de la tabla N° 20 se indican los Efectos Principales, los cuales serían los cuatro factores tenidos en cuenta para realizar el diseño factorial 2x3x4x7, indicados en la tabla N° 19, estos Efectos Principales de la tabla N° 20 fueron representados por las letras: A, B, C y D; el Efecto Principal A sería el efecto planta, el B Efecto Principal solución, el C efecto concentración y el D efecto hongo, debajo de los Efectos Principales se representan las interacciones entre dichos factores; aparecen representadas en total 11 interacciones; la interacción AB se refiere a la interacción planta -solución, la interacción AC corresponde a planta –concentración; el resto de interacciones se pueden deducir en base a lo observado en la tabla N° 20. La columna N° 2 corresponde a la suma de cuadrados que resulta de elevar cada media de los halos de inhibición al cuadrado y luego sumar dichos cuadrados, los grados de libertad representados en la tercera columna como GL son importantes para calcular el error estos se obtienen del número de datos menos uno o sea (n-1), los cuadrados medios de la cuarta columna permiten establecer una variabilidad entre los datos, los residuos que aparecen debajo de la tabla corresponden al error estándar, la columna p-valor, es la que determina estadísticamente las diferencias significativas. Para el p-valor se establecen 3 hipótesis:

- 1- $p < 0,01$, indica que hay diferencias altamente significativas
- 2- $p < 0,05$, indica que hay diferencias significativas
- 3- $p > 0,05$, indica que no hay diferencias significativas (hipótesis nula).

En la columna quinta aparecen representados los p-valor de los Efectos Principales y sus interacciones, todos los 15 p-valores fueron inferiores a 0,01 lo que indica una diferencia altamente significativa para todos estos Efectos Principales y sus interacciones.

Tabla N° 21. Medias por mínimos cuadrados para INHIBICION con Intervalos de confianza de 95 %. ($p < 0.01$).

Nivel	Frecuencia	Media
Media Total	504	22,5893
PLANTA		
CANELA	252	(a)24,5611
CLAVO	252	(b)20,6175
SOLUCIÓN		
CICLOHEXANO	168	(b)19,6315
ACETONA	168	(b)19,6196
CLOROFORMO	168	(a)28,5167
CONCENTRACIÓN		
10mg/ml	126	(c)16,3992
20mg/ml	126	(b)32,6881
2mg/ml	126	(d)5,9381
30mg/ml	126	(a)35,3317
HONGOS		
1	72	(d)15,0417
2	72	(c)18,6014
3	72	(d)16,3833
4	72	(b)24,2667
5	72	(a)34,975
6	72	(b)24,6514
7	72	(b)24,2056

La tabla N° 21 representa las medias por mínimos cuadrados para inhibición con 95,0 intervalos de confianza ($p < 0,01$). En la primera columna aparecen los factores analizados del diseño factorial de $2 \times 3 \times 4 \times 7$ es decir los factores planta, solución, concentración y hongos, las frecuencias que aparecen en la segunda columna corresponden a todos los datos analizados, las frecuencias para canela y clavo fueron 252, indicando esto 252 datos analizados para estas dos plantas, para las soluciones la frecuencia 168 indica 168 datos analizados para cada solución y de la misma forma ocurre con las frecuencias de las concentraciones y la frecuencia de los hongos, la frecuencia 504 corresponde al total de todos los datos analizados, la tercera columna corresponden a las medias en milímetros(mm) (promedios de todas las medias de inhibición obtenidas con respecto a todos los factores analizados).

Las letras indicadas al lado de las medias de inhibición de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”, corresponden al grado de significancia para cada uno de los factores analizados, aquellas medias de inhibición que presentan una medida en milímetros (mm) mayor son de mayor significancia y por lo tanto se les asignó la letra (a), las medias o promedios de inhibición a las cuales se les asignó la letra (b), presentan menor nivel de significancia por ser inferiores a las del nivel(a), las medias que se les asignó la letra (c) presentan un nivel de significancia inferior a las del nivel (b), por lo tanto son menos significativas, e igualmente ocurre con las medias de inhibición ubicadas en un nivel de significancia (d), las cuales son inferiores a las medias de inhibición del nivel de significancia (c), por ser medias de inhibición con medidas más bajas y por lo tanto menos significativas, aquellas medidas de las medias de inhibición de un determinado factor que resultaron ser casi iguales se ubicaron en el mismo nivel de significancia y por lo tanto se les asignó la misma letra.

Tabla N° 22 Contraste Múltiple de Rangos para VARIABLE según PLANTA (p<0.01) intervalo de confianza 95%.

Método:	95,0	porcentaje Duncan		
PLANTA	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

CLAVO	252	20,6175	0,270164	X
CANELA	252	24,5611	0,270164	X

Contraste	Diferencias			

CANELA - CLAVO	*3,94365			

* indica una diferencia significativa.

La tabla N° 22. Correspondiente a la prueba Duncan, la cual aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar que estas plantas son significativamente diferentes una de la otra. En la primera columna aparecen las dos plantas utilizadas que fueron canela y clavo, el número 252 ubicado debajo de la columna donde dice recuento, corresponde a 252 datos analizados con respecto a estas dos plantas, en la tercera columna se ubican las medias de

inhibición con respecto a los 252 datos analizados para estas dos plantas, el número 0,270164 corresponde al error estandar, la x representada al lado de los datos correspondiente a la canela y clavo, sirve para determinar cuales grupos son homogéneos o estadísticamente similares, las x en los grupos que son homogéneos se alinean al mismo nivel, si los grupos analizados no son estadísticamente homogéneos debido a las diferencias significativas, las x no se ubican en la misma dirección, esto quiere decir que cuando hay grupos que muestran diferencias significativas, la x representada aparecerá desplazada, notese en esta tabla que la x correspondiente a la canela se encuentra desplazada hacia la derecha en relación a la x del clavo, esto significa que la canela tiene mayor significancia estadísticamente con relación al clavo de olor en lo que concierne a su efectividad como tratamiento de inhibición, por lo tanto la canela y el clavo no se ubican en el mismo grupo.

En la parte de debajo de la tabla se indica la diferencia significativa entre canela y clavo, el asterisco (*) ubicado en la parte de abajo indica que entre estas dos plantas si hubo diferencias significativas.

El dato correspondiente a 3,94365 indicado por el asterisco (*) significa que tanto difiere la media de inhibición de los datos analizados para la canela con respecto a los del clavo.

Tabla Nº 23 Contraste Múltiple de Rangos para VARIABLE según SOLUCIÓN (p<0.01) intervalo de confianza 95%.

Método: 95,0	porcentaje Duncan			
SOLUCIÓN	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

ACETONA	168	19,6196	0,330882	X
CICLOHEXANO	168	19,6315	0,330882	X
CLOROFORMO	168	28,5167	0,330882	X

Contraste	Diferencias			

CICLOHEXANO - ACETONA	0,0119048			
CICLOHEXANO - CLOROFORMO	*-8,88512			
ACETONA - CLOROFORMO	*-8,89702			

* indica una diferencia significativa.

La tabla N° 23 correspondiente a la prueba Duncan de contraste múltiple para el factor solución, la cual representa un análisis para determinar cual extracto (soluciones) fue más efectivo, esto determina si existen o no diferencias significativas entre los extractos en: ciclohexano, cloroformo y acetona. El número 168 que se encuentra ubicado debajo de la palabra recuento indica que se analizaron 168 datos estadísticos con respecto a los tres extractos como utilización de tratamientos para inhibición de hongos, en la tercera columna aparecen unos datos correspondientes a las medias de inhibición con respecto a los 168 datos analizados, nótese que para el extracto en cloroformo la media de inhibición (promedio en milímetros), la cual fue de (28,5167), fue mayor que para el extracto en ciclohexano y el extracto en acetona, esto indica que el extracto en cloroformo mostró mayor efectividad frente a los hongos evaluados, en esta tabla N° 23 se puede ver que la media de inhibición en (promedios) del extracto en ciclohexano (19,6315) es casi igual con respecto a la media de inhibición del extracto en acetona (19, 6196), esto indica que entre estos dos extractos no hay diferencias significativas en cuanto a su utilización como tratamiento de inhibición frente a los 7 hongos estudiados, los cuales fueron: 1- "*Aspergillus flavus*", 2- "*Mucor sp. (1*)*", 3- "*Aspergillus niger*", 4- "*Fusarium sp.*", 5- "*Penicillium purpurogenum*", 6- "*Penicillium sp (1*)*", 7- "*Paecylomices sp.*".

Al no haber diferencias significativamente entre estos extractos, esto quiere decir que cualquiera de los dos que se utilice como tratamiento frente a los 7 hongos mencionados va tener un efecto similar. La cuarta columna corresponde al error estándar, la quinta columna corresponde al análisis de grupos homogéneos, se puede notar de acuerdo al alineamiento de las x, que el extracto en acetona y el extracto en ciclohexano, se encuentran ubicados en grupo homogéneo, obsérvese que las x de estos dos extractos están alineadas una de bajo de la otra, mientras que la x correspondiente al extracto en cloroformo presentó un desplazamiento hacia la derecha, lo que indica que el extracto en cloroformo no pertenece al mismo grupo homogéneo del extracto en ciclohexano y el extracto en acetona, este desplazamiento de la x indica mayor significancia de este extracto con respecto a los otros dos, esto quiere decir que el extracto en cloroformo puede

considerarse más efectivo(en lo que concierne a esta investigación) como tratamiento de inhibición de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”, esto si se compara con los otros dos extractos.

En la parte debajo de La tabla N° 23 se observan unos contrastes o interacción donde se establece una comparación de un extracto con respecto al otro en dicha comparación se notó que entre el extracto en ciclohexano y el extracto en cloroformo tanto de canela como de clavo no hubo diferencia significativa esto puede corroborarse porque el número colocado en frente (0.0119048) no tiene el asterisco ubicado al lado lo que indica que no hay diferencia significativa entre estos extractos. El número (0.0119048) es el resultado de las diferencia entre las medias de inhibición de ciclohexano con respecto a las de acetona; como no aparece indicado por un asterisco (*) indica que la diferencia no es significativa, mientras que el contraste comparativo entre la efectividad del ciclohexano con respecto al cloroformo y de igual forma el contraste de las medias de inhibición del extracto en acetona si mostraron diferencia significativa, nótese que los números ubicados al frente de dichos contrastes aparecen indicados por un asterisco (*) el cual indica que si hay diferencias significativa entre estos extractos.

Tabla N° 24. Contraste múltiple de rango para VARIABLE según CONCENTRACIÓN ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%.

Método: 95.0 porcentaje Duncan				
CONCENTRACIÓN	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
2mg/ml	126	5,9381	0,38207	X
10 mg/ml	126	16,3992	0,38207	X
20 mg/ml	126	32,6881	0,38207	X
30 mg/ml	126	35,3317	0,38207	X
Contraste		Diferencias		
10mg/ml-20mg/ml		*-16,2889		
10mg/ml-2mg/ml		*10,4611		
10mg/ml-30mg/ml		*-18,9325		
20mg/ml-2mg/ml		*26,75		
20mg/ml-30mg/ml		*-2,64365		
2mg/ml-30mg/ml		*-29,3937		

Según los grupos homogéneos que aparecen en la tabla 24 las concentraciones de 10 mg/ mL y 20 mg/ML se ubicaron en el mismo grupo, indicando que estas son estadísticamente similares, indicando así que estas tienen un efecto similar sobre los 7 hongos de *Zea mays*, la concentración 2 mg/ml se ubicó en otro grupo indicando que fue menos significativo ya que se encuentra desplazada la \bar{x} hacia la izquierda, mientras que la de 30 mg/ml fue la de mayor significancia la \bar{x} se encuentra más hacia la derecha y su media de inhibición es mayor, aquellos contrastes indicados por los asteriscos son los que son significativamente diferentes.

Tabla N° 25. Contraste múltiple de Rangos para VARIABLE según Hongos ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%

Método: 95.0 porcentaje Duncan				
HONGOS	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	72	15,0417	0,50543	X
3	72	16,3833	0,50543	X
2	72	18,6014	0,50543	X
7	72	24,2056	0,50543	X
4	72	24,2667	0,50543	X
6	72	24,6514	0,50543	X
5	72	34,975	0,50543	X

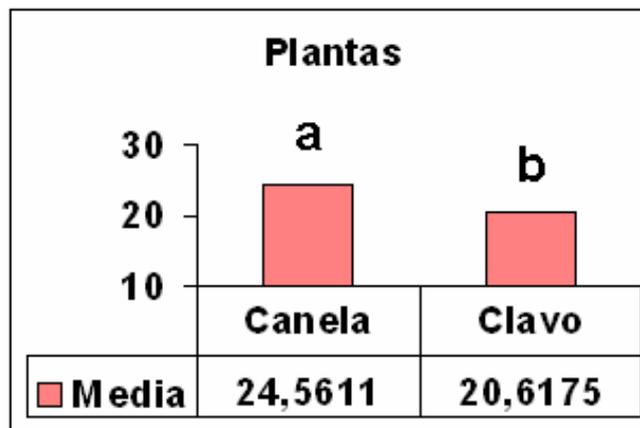
De acuerdo a los resultados de la tabla 25 el hongo 5 presentó la mayor media de inhibición indicando así que este fue el más susceptible, notese que el hongo 1 y 3 tienen la \bar{x} desplazada hacia la izquierda ubicándose estas en el mismo grupo homogéneo indicando menos susceptibilidad a los extractos.

Los datos correspondientes a los extractos metanólicos de "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Sizygium aromaticum*" no se incluyeron dentro del análisis estadístico por presentar un efecto totalmente nulo frente a los 7 hongos aislados de "*Zea mays*".

La figura N° 21, representa las medias en milímetros (mm), es decir los promedios de los diámetros de los halos de inhibición en base a todos los datos analizados

de las plantas "*Cinnamomum zeylanicum*" y "*Sizygium aromaticum*" con respecto a su utilización como tratamientos de los 7 hongos al tercer día. Se observa que la media para la primera fue mayor (la letra a asignada indica un nivel de significancia más alto y la letra b una menor significancia). ($p < 0,01$)

Figura N°21. Medias de inhibición (mm) para canela y clavo de olor con respecto a su utilización como tratamiento de los 7 hongos aislados de "*Zea mays*". ($p < 0,01$) intervalo de confianza 95%.



Las medias de inhibición como tratamiento de hongos, a que se refiere la grafica de la figura N° 21 con relación a estas dos plantas (canela y clavo), fueron analizadas en forma global, es decir estas medias de inhibición se evaluaron simultáneamente con respecto a todos los factores analizados: (cuatro concentraciones trabajadas, tres extractos analizados y siete hongos analizados, esto debido a que el análisis de varianza múltiple de este diseño factorial 2x3x4x7 representado en la tabla N° 20 evalúa estos factores combinados debido a sus interacciones lo que quiere decir que las medias de inhibición para estas dos plantas no son analizadas con respecto a uno de los factores por independiente.

La corteza de la Canela "*Cinnamomun zeylanicum*" y capullo de Clavo de olor "*Sizygium aromaticum*" presentaron actividad biológica con respecto a los siete hongos evaluados ("*Aspergillus flavus*", "*Mucor sp. (1*)*", "*Aspergillus niger*", "*Fusarium sp.*", "*Penicillium purpurogenum*", "*Penicillium sp. (1*)*", "*Paecylomices sp.*".) Coincidiendo con los resultados de otras investigaciones donde se reportó actividad biológica contra los hongos "*Aspergillus flavus*", "*penicillium roqueforti*",

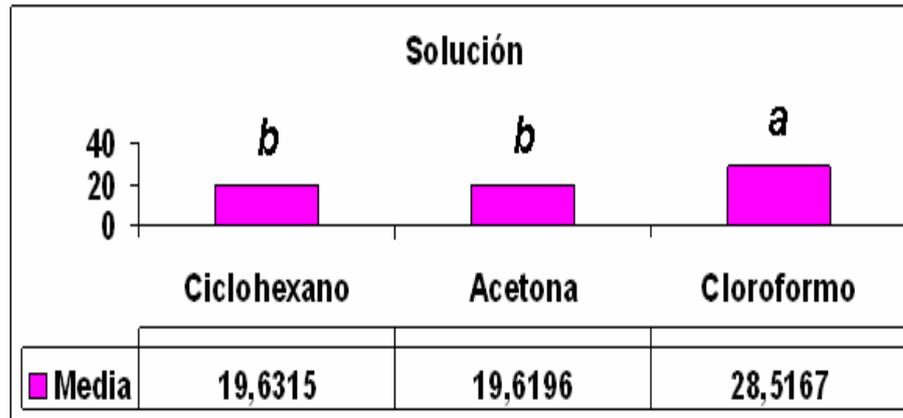
“*Mucor plumbeus*”, y “*Euroticum sp.*”. (Matan *et.al* 2006), contra “*Aspergillus niger*” (Pawar y Thaker, 2006), “*Fusarium graminearum*” (Velluti *et.al*, 2006). (El asterisco (*) al lado de los números indica aquellas especies de un mismo genero las cuales no fueron identificadas).

Estas dos plantas (canela y clavo) también tuvieron la misma actividad biológica frente a hongos de “*Zea mays*” al ser aplicados directamente sobre semillas de este cereal. (Ver metodología de esta experimentación en anexo 1, resultados en las fotos (Nº 32, 33,35 Y 36).

La actividad inhibitoria de estas plantas como control de estos hongos; mostró diferencias significativas entre si, corroborado por el análisis estadístico de la prueba de Duncan de contraste entre estas dos plantas, donde “*cinnamomum zeylanicum*” se le clasificó en un nivel (a) por presentar una media de inhibición mayor, mientras que “*Sizygium aromaticum*” presentó una media de inhibición menor, por lo que se clasificó en un nivel (b), esto significa que la canela presentó mayor efectividad frente a los 7 hongos aislados de muestras de “*Zea mays*” de tiendas y graneros.

La Figura Nº 22. Medias de inhibición de las soluciones utilizadas como tratamientos (extractos), las medias de inhibición de cloroformo presentaron un nivel de significancia **a** ($p < 0,1$) (mayor media) y las de ciclohexano y acetona un nivel **b** no existiendo diferencias significativas entre ellas; estas letras fueron analizadas según las medidas de las medias de inhibición representadas en la tabla Nº 21, para las cuales fueron asignadas según el diámetro de las medidas en milímetros, la mayor es nivel **a** y la inferior es nivel **b**, estas medias de las soluciones fueron analizadas globalmente con respecto a múltiples factores, por el programa estadístico (STATGRAPHICS versión 5.1), es decir aquí se estudió el efecto de las interacciones (cuatro concentraciones, el tipo de extracto, las plantas utilizadas y los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”) estos factores se analizaron en forma general sin ser estudiados independientemente uno respecto al otro, dado que en el diseño factorial 2x3x4x7 se analizan simultáneamente.

Figura N° 22. Medias de inhibición de las soluciones (extractos) utilizadas como tratamientos de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*” ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%.



(Padrón *et.al*, 2003) reportaron actividad microbiana de los extractos con éter de petróleo, acetona y metanol de “*cinnamomun zeylanicum*” y “*Sizygium aromaticum*” contra ciertos tipos de bacterias y hongos, observando que esta actividad es inversamente proporcional a la polaridad.

En los resultados obtenidos en esta investigación, donde según las pruebas de Duncan y la tabla N° 23 de medias, los extractos en ciclohexano, cloroformo y acetona de ambas plantas mostraron diferencias significativas, los extractos en cloroformo, se clasificaron en un nivel (**a**) indicando una media superior que representa mayor efectividad que los extractos en ciclohexano y acetona, los cuales se ubicaron en un nivel (**b**) por presentar medias inferiores; esta similitud entre los extractos en ciclohexano y acetona indican que no hay diferencias significativas entre ellos por lo tanto cualquiera de los dos que se utilicen tendrán resultados similares, la mayor efectividad del cloroformo para estos hongos evaluados coincide con lo resultados de (Morozumi,1978).

El cloroformo es un solvente de mayor polaridad que el ciclohexano, sin embargo este resultó ser más eficiente que el solvente de polaridad inferior, mostrando en parte una diferencia con la investigación de (Padrón *et al*, 2003), donde a mayor polaridad menor efectividad, esta diferencia puede deberse a que los citados investigadores usaron éter de petróleo que es una mezcla de hidrocarburos de

baja polaridad, mientras que en este estudio se utilizó ciclohexano un solo solvente; por lo que la polaridad de los metabolitos extraídos van a diferir un poco, y por ende el comportamiento de los microorganismos, teniendo en cuenta que estos fueron diferentes para ambas investigaciones, donde algunos utilizados por (Padrón *op cit*) fueron de carácter bacteriano ("*Bacillus cereus*", "*Salmonella Typha*", algunos hongos no fueron fitopatógenos, (entre ellos tenemos "*Trichophyllum tunsurans*" y la levadura "*Cryptococcus neoformans*"), las diferencias también pueden deberse a los métodos de extracción utilizados por los citados investigadores donde además de la técnica de reflujo también utilizaron la percolación.

Pese a esta diferencia, los resultados del presente estudio coinciden con la anterior investigación citada en que los extractos de acetona mostraron menor efectividad y nula para el metanol, donde se guarda una relación entre menor efectividad conforme al aumento de polaridad.

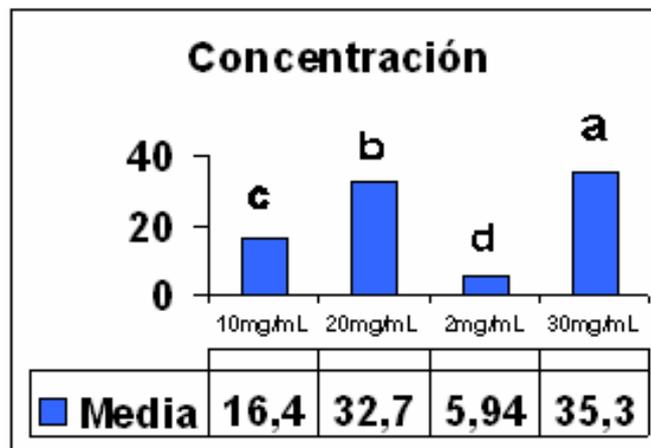
Los extractos en cloroformo tanto de canela como de clavo a la concentración 30mg/mL produjeron también buena inhibición sobre semillas de "*Zea mays*" corroborado por ausencia de crecimiento fúngico mientras que a 10mg/mL si hubo crecimiento fúngico; los extractos en ciclohexano y acetona de ambas plantas sobre semillas tratadas fueron menos eficientes frente a los hongos al igual que en las muestras de "*Zea mays*" de tiendas y graneros. (ver anexo N° 1, Fotos N° 32, 33, 35 y 36).

Los extractos en ciclohexano, cloroformo y acetona aplicados directamente sobre maíces molidos los cuales después se le realizaron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} para realizar las respectivas siembras para recuento en placa. Estos extractos no tuvieron ningún efecto sobre los maíces molidos por lo cual es recomendable tomar un volumen mayor de extracto para comprobar la actividad biológica de estas dos plantas con dichos extractos (ver Anexo N° 1, Foto N° 34, 37 y 38).

La figura N° 23. Muestra las medias de inhibición de las diferentes concentraciones utilizadas en los diferentes tratamientos de los 7 hongos aislados de “Zea mays”, la concentración de 30 mg/ mL presentó mayor significancia ($p < 0,01$) con una media más alta (nivel **a**), las letras **b**, **c** y **d** indican niveles de significancias decrecientes a medida que las medias disminuyen, las letras asignadas sobre las barras de esta figura N° 23 son las mismas letras asignadas en la tabla N° 21.

Se analizaron las cuatro concentraciones estudiadas en forma global es decir con relación a los demás factores ((cuatro concentraciones, el tipo de extracto, las plantas utilizadas y los hongos), estos análisis hacen parte de una interacción del diseño factorial $2 \times 3 \times 4 \times 7$ las cuatro concentraciones no se analizaron en relación a un solo factor sino en forma general con respecto a todos los factores.

Figura N° 23. Medias de inhibición de las diferentes concentraciones utilizadas como tratamiento de los 7 hongos aislados de “Zea mays”. ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%.

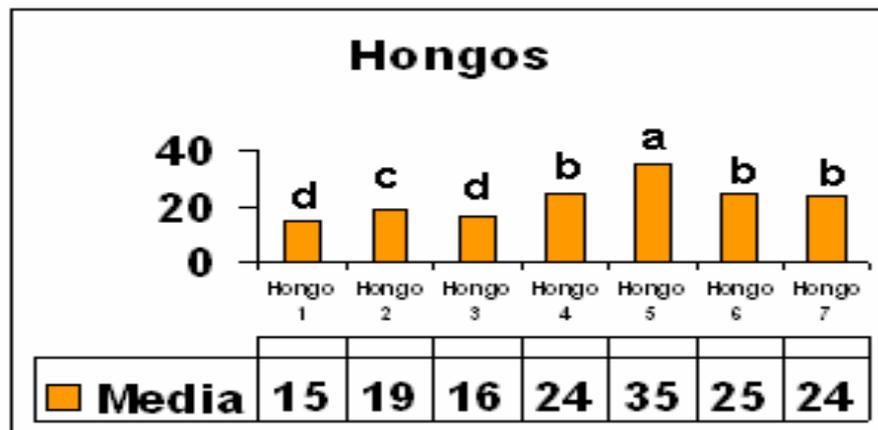


En cuanto a las concentraciones trabajadas la de 30 mg/ mL, se ubicó en nivel (**a**) con una media superior de 35,3317 (ver tabla N° 23), mostrando así mayor eficiencia que las otras tres concentraciones, la de 20 mg/ mL se ubicó en un nivel (**b**) con una media de 32,6881, la de 10 mg/ mL en un nivel (**c**) con una media de 16,3992 y la de 2 mg/ mL en nivel (**d**) con una media de 5,9381 indicando que

esta fue la menos efectiva en cuanto a inhibición; los 4 niveles obtenidos para estas medias demuestran que no tiene el mismo resultado una u otra indicando que las cuatro son diferentes entre si. (Esto en lo que concierne a esta investigación).

Según figura N° 24. Medias de inhibición de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”, al tercer día de tratamiento ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%; el hongo 5 presentó una media de inhibición mayor (nivel a), las letras b, c y d corresponden a niveles decrecientes de significancias, según las medias de inhibición en milímetros con los extractos de canela y clavo a las cuatro concentraciones tratadas, obsérvese en esta figura N° 28 las letras asignadas a cada una de las barras, las cuales se asignaron con relación a las letras de la tabla N° 21. Estas medias de inhibición en milímetros (mm) se analizaron con respecto a los demás factores estudiados: (factor planta, factor solución, factor concentración), sin tener en cuenta la inhibición de estos hongos en base a un solo factor ya que así lo requiere el diseño factorial $2 \times 3 \times 4 \times 7$ analizado por el programa estadístico (STATGRAPHICS versión 5.1).

Figura N° 24. Medias de inhibición de los 7 hongos aislados de “*Zea mays*”, al tercer día de tratamiento ($p < 0.01$) intervalo de confianza 95%.



En la tabla 23, el hongo 5 (“*Penicillium purpurogenum*”), presentó la media más alta la cual fue (34,975) ubicándose en un nivel (**a**), lo que indica que este fue el hongo más sensible a los tratamientos de “*cinnamomum zeylanicum*” y “*sizygium*”

aromaticum”, los hongos 4 (*Fusarium sp.*), 6 (*Penicillium sp.(1*)*), 7-
“*Paecylomices sp.*” presentaron medias similares ubicándolos en un nivel **(b)**, esto
significa que estos hongos se comportaron casi igual ante los extractos aplicados,
el hongo 2 (*Mucor sp. (1*)*) se ubicó en un nivel **(c)** y los hongos 1 (*Aspergillus
flavus*) y 3 (*Aspergillus niger*) en nivel **(d)** presentando las medias más bajas y
por lo tanto menos sensibilidad a los tratamientos (según los resultados de esta
investigación).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta investigación se concluye.

- ✓ El hongo *Aspergillus* fue el hongo que se halló en mayor porcentaje en “*Zea mays*” en almacenamiento en esta investigación dado que es un hongo que tiende a colonizar granos y cereales.
- ✓ El hongo *Botrytis sp.*, presente en algunas de las muestras de “*Zea mays*” de este estudio, no es un colonizador propio de los cereales y granos, ya que este infecta por lo general frutas y verduras. Esto permite concluir que en las tiendas y graneros donde se comercializa este producto no existe un control riguroso a la hora de manipular y almacenar este producto al igual que otros se comercializan en estos lugares.
- ✓ De las cuatro concentraciones trabajadas en esta investigación utilizadas en ambas plantas para cada uno de los extractos, la de 30mg/mL presentó mayor poder inhibitorio sobre los hongos evaluados de “*Zea mays*”.
- ✓ El tratamiento con extractos en metanol tanto de “*Cinnamomum zeylanicum*” como de “*Sizygium aromaticum*” no tuvieron en esta investigación poder inhibitorio a ninguna de las cuatro concentraciones trabajadas, para ninguno de los siete hongos evaluados.
- ✓ La concentración de 2mg/mL en todos los tratamientos en ambas plantas no tuvo un poder inhibitorio sobre los hongos de “*Zea mays*” evaluados en esta investigación.
- ✓ El moho *Penicillium purpurogenum* fue el hongo más sensible a los tratamientos aplicados tanto en “*Cinnamomum zeylanicum*” como de “*Sizygium aromaticum*” de este estudio.
- ✓ Los hongos *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.*, tienden a encontrarse en “*Zea mays*” y otros cereales durante su cultivo en campo, por lo tanto la presencia de estos mohos en algunas de las muestras indican que estas pudieron haber sido contaminadas en campo o dado que no existe una

restricción total a los parámetros de hongos de campo y de almacenamiento, estos agentes fúngicos pudieron haberlo hecho durante el almacenamiento.

- ✓ El análisis de aflatoxinas de "*Zea mays*" bajo condiciones normales y de humedad, permite concluir que la humedad es un factor importante que favorece la invasión y la proliferación de hongos, entre ellos los productores de micotoxinas.
- ✓ Los tratamientos con canela "*Cinnamomum zeylanicum*" en las pruebas de sensibilidad a los siete hongos evaluados fueron mas efectivos en esta investigación, logrando mejor inhibición que los de clavo de olor "*Sizygium aromaticum*".
- ✓ Los extractos de cloroformo tanto en "*Cinnamomum zeylanicum*" como de "*Sizygium aromaticum*" tuvieron mayor poder inhibitorio sobre los hongos de maíz en este estudio que los de ciclohexano y acetona.

6. RECOMENDACIONES

En base a la siguiente investigación se recomienda:

- ✓ Un estudio detallado de las fluctuaciones de la micoflora presente en “*Zea mays*” bajos condiciones de almacenamiento, con respecto a las variaciones de los factores ambientales (sequía-lluvia) que se presentan en un tiempo anual.
- ✓ Investigación de la población fúngica presente en “*Zea mays*” durante las condiciones de campo, realizando un seguimiento desde esta etapa hasta la de almacenamiento teniendo en cuenta como varia la micoflora, para ofrecer así una mejor forma de control para la calidad del producto.
- ✓ Evaluación de los extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*” y clavo de olor “*Syzygium aromaticum*”, y de otras plantas frente a hongos de “*Zea mays*”, teniendo en cuenta al mismo tiempo si estos extractos, ejercen algún poder inhibitorio en la producción de micotoxinas.
- ✓ La utilización de de otros antifúngicos comerciales y fungicidas de uso agrícola como control positivo en las pruebas de sensibilidad de hongos frente a extractos naturales de plantas.
- ✓ La utilización de los extractos de canela “*Cinnamomum zeylanicum*” y clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” en forma separada, como método de control biológico de hongos de “*Zea mays*” obtenidos mediante otras técnicas como las de precolación y arrastre de vapor, comparándolas con la técnica de reflujó utilizada en esta investigación; evaluándolos también combinados simultáneamente como método de control de estos hongos; comparando la actividad biológica obtenida con los resultados obtenidos en esta investigación.

- ✓ Evaluación de la actividad biológica de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Syzygium aromaticum*" frente a los hongos de "*Zea mays*" mediante la técnica dilución directa en agar, comparando los resultados obtenidos con los de esta investigación.

- ✓ Investigaciones con profundidad de los factores higiénico-sanitarios influyentes en la contaminación por hongos durante las condiciones de almacenamiento de "*Zea mays*".

- ✓ Un estudio detallado de las aflatoxinas presentes en "*Zea mays*" en almacenamiento mediante la técnica de inmunoensayo (ELISA) y de otras técnicas como las cromatografías, evaluando a la vez cuantitativamente estas toxinas, para permitir un mejor control de calidad de este alimento, teniendo en cuenta también otras toxinas que tienden a encontrarse en otros granos de almacenamiento a los cuales se les debe estudiar también la micoflora presente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN.A. Mycoflora of South African barley and malt en: the American society of brewing chemist inc.1998 vol 56(4) pág 169-176.

ARAGÓN J. y FLORES. F. Insectos de suelos perjudiciales para el Maíz en: sección de entomología. Área de suelos y producción vegetal.2005.

ARANGO. María y MARÍN. Ligia. Aflatoxinas en la salud humana en: Medicina y laboratorio. 1998 vol 8(3) Pág. 161-168.

ARANGO. María y MARÍN .Ligia. Presencia de la micotoxina Zearalenona en muestras de Maíz en: Revista veterinaria y Zootecnia de Caldas. (Enero-junio 1999)Vol. 11(1).Pág. 11-14.

ARPIDE. J. .En: <http://www.afuegolento.com/noticias/15/firmas/arpide/517/>. 2006.

AYALA y BOZZI. B. Evaluación de la actividad antifungica de los extractos de la raíz de pentacalia corymbosa contra alternaria sp., thichoderma viridae, fusarium oxysporum, pontificia universidad Javeriana .tesis.1998.

BARTOLINI. R. 1990. Plagas, enfermedades y fisiopatías del Maíz en: El Maíz.1990. Pág. 237-250.

BAYMAN. P, BAKER.J, DOSTER. J.L, THEMIS . M.A, MICHAELIDES.J, MAHONE y NOREEN.E. Mayo 2002.Ochratoxin producción by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus* .en: Applied and Enviromental Microbiology. 2002.Vol. 68 (5) Pág. 2326-3229.

BENITO. E., ARRAZ. Mónica y ESLAVA. A. 2000.Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*.2000.

BEOMONT. P. Capacidad aflatoxigenica de cepas nativas de *Aspergillus flavus* link ex fries, en maíz "*Zea mays*" en Venezuela .Tesis de pregrado de la facultad de agronomía de la universidad central de Venezuela.2004.

BIAL y ARISTEGUI. El Reino de los hongos .en: Revista Iberoamericana de Micología .2002.Pág 1-4.

CABRALES. L. Determinación de la contaminación por hongos e insectos en los granos de mayor consumo en Santa Marta .en: Fitopatología colombiana. 1992. Vol 16(1-2) Pág 98-103.

CARRETERO, María E. Panorama actual de medicina. 2000. Vol 24(236) Pág 778-782.

CARRILLO .Leonor. *Aspergillus, Penicillium y Alternaria* en: Los hongos de los alimentos y forrajes. 2003Cáp. 5(pag 61-69), Cáp. 6 (pag 70-74), Cáp. 7(Pág 81-86), Cáp. 10.

CERMEÑO. Julman Rosiris y TORRES RODRIGUEZ. Z. J.Sensibilidad de hongos micelares dermatiaceos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar en: Revista Iberoamericana de micología.2001.Vol 13 Pág 113-117.

CHENGA. S.S, LIVA .J. Y, HSUIB. Y .R y CHENGA. S.T.Chemical Polymorphism and activity of essential oils from leaves of different provenances of Indigenous Cinnamon. (*Cinnamomum osniphbeum*).2005.

COLEMAN. M. y ANDERSON. A. J. 1985.Plant responcees to risopogon vinicolor elicitora .Phytopatol. 1985. Vol 75.1283.Abstract.

COMERÓN, E, GAGGIOTI .Mónica y ROMERO. L .microflora en granos de Maíz en almacenamiento en el estado de Guarico Venezuela: Identificación y cuantificación en: Resumen del articulo de la facultad de Agronomía de la Universidad central de Venezuela.

CUELLAR. Carmen. . Seguridad alimentaria en consumo de frutos y verduras en maíz.2003.

CORRALES. Sonia y SUBERO. L. Efectos de la época de siembra en la incidencia de hongos en semillas de Arroz "*Oryza sativa I*" en : Revista de la sociedad Venezolana de Fitopatología.1997.

DE LUCA. L. Octubre .Micotoxicosis en:¿Conoce las micotoxinas? 2003.

DEL VALLE .Romina.Inhibición probiótica del desarrollo de *Aspergillus nomius*. VSC23 .Trabajo de tesis de la facultad de Bioquímica, Química y farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.}.2004.

DEVEGOWDA. G, MVLN y HVLN. Swamy. 2002. Micotoxinas: Nuevas soluciones para su contraataque. En: Asociación peruana de agricultura.2002

DOMINGO. D y LÓPEZ-BREA .M. Plantas con acción antimicrobiana en: Revista española de quimioterapia. Diciembre de 2003 .Vol 16 (4) pag 385-393 prous science, S .A. Sociedad española de quimioterapia.

FIESSEN. M, BOCHY. F. X y MONTESANO .R. Métodos actuales para determinar la exposición humana de micotoxinas en: Revista alimentaria .1991.pag 16-24.

FONTANA H y GONZÁLES. C. Protección sanidad vegetal. En: Enfermedades del maíz en Venezuela.2000.

FRAZIER. W y WESTHOOFF. P. Microbiología de los alimentos. Editorial acribia 4ª edición.1993. Pág 231.

FULGUEIRA. Cecilia y BORGHI. A. Toxigenic fungi .Ecology and prevention of their mycotoxin production (A Review) en: Boletín micológico .2000.Vol 15 pag 1-16.

GAGGIOTTI. Mónica, CAFFARATTI Sandra, ROMERO .L, BASILICO. J. DE BASILICO. María y COMERÓN .E.Encilaje de maíz y sorgo forrajero: Influencia de la compactación sobre la calidad micotoxicológica. Resumen del 24 congreso Argentino de producción animal. Rafaela. 2001.

GALINDO. W, ROSALES. M, MURGUEITIO. E Y LARRAHONDO. J.Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarraton. Livestock research for rural development. 1989. Vol 1 (Nº 1).

GARCÍA .J. D. Micotoxinas en rumiantes un problema pasado o presente en: Congreso de la sociedad española de medicina interna veterinaria (Universidad de león) 2002. Pag 66-81,7719-7810.

GARCÍA-GONZÁLES. Y VÁZQUEZ. Resumen del artículo: El Clavo una nueva esperanza contra el cáncer, en: Revista Farmaté Divulgación de las ciencias farmacéuticas. 2006.

Gimeno. A. Posibles soluciones en el problema de las micotoxinas, en: [http:// www.Mycotoxin.com](http://www.Mycotoxin.com).2003

GOACHIN. B. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos, en: Patología veterinaria .1983. Pag 323-326.

GRANADOS. G. .Insectos del Maíz, en: El Maíz en los trópicos” mejoramiento y producción”, depósitos de documentos de la FAO. Departamento de agricultura.2001.

HORN.B y PORNER.J. Regional differences in producction of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of aspergillus flavus conga transeetm within the united states.1999.

INGRAHAN. J, INGRAHAN. Catherine Y PRENTISS .Harriet.1998.Introducción a la microbiología. 1998. pag 507.Editorial reverté S.A. Barcelona- Bogota – buenos aires -caracas –México

IZQUIERDO. P, ROJAS .Evelyn, RANGEL .Lisbeth y MÁRQUEZ. Presencia de aflatoxinas en algunos alimentos, en: Revista de la facultad de agronomía.1995. Pag 485-492.

JARAMILLO. J. F. 101 hiervas medicinales. 2005. Pág 67.

JAY. J. Microbiología moderna de los alimentos .Edit. Acribia. S. A. Zaragoza-España.1994.

KEDERA. C. J, PLATNER. R.D Y Desjardins. A.J.Incidence of *Fusarium spp* and levels of fumonisina B1 in Maize western Kenya, en: Applied and environmental microbiology. 1999. Vol65 (1) Pág 41-44.

KIM. J.K y Lee. Y.W.Sambutoxina a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* Isolates obtained from rotted potato tubers, en: Applied and microbiology 1994. Pág 4380-4386.

KOUZNETSOV.V.Toxinas de los hongos, en: Defensa química en la naturaleza. 1998. Pág 6-42.

LARA. J. Métodos de detección, identificación y control de micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal.2003 http://www.engormix.com/metodos_determinacion_identificacion_control_s_articulos_300_MYC.htm

LATORRE .B.Funguicidas, bactericidas y nematocidas. 1994 Pág 467-515. En: Enfermedades de las plantas cultivadas.5ª edición .editorial alfaomega.

MADIGAN. M. MARTINKO. J. JACK. P. Método de recuento en placa. en: Brock biología de los microorganismos.2004.pag 146-147. 10ª Editorial Pearson prentice.

MANG. B, WOLTERS. M, WOLTERS. M, KELB. K, LICHTINGHAGEN .R, STICHTENOTTH .D.O y HAHN.A. Mayo . Effect of a cinnamon extracto on plasma glucosa, HbA, and serum lipids in diabetes mellitus type 2.en: Nutrition physiology and human Nutrition unit , institute of food science, university of hannover Germany .2006. Vol 36(5) Pág 340-344.

MARTINS .J. ZITELLI. Sandra, ZAPATA. María y BASILICO.J. Identificación de hongos que afectan a los granos de maíz. Ciencia y tecnología. Resumen de la prensa institucional UML.2004.

MATAN. N, RIMKEEREE .H, MAWSON. A. J, CHOMPREEEDA .P, Haruthaithanasan.V y Parker. M. Antimicrobial activity of cinnamon and oils under modified atmospheric conditions en: Food microbiology .2006. Vol 107(2) Pág 180-185.

MAYNOR. Catherine. Fascículo de hongos. En: Catalogo de conservación de papel del American institute for conservation. Biblioteca nacional de Venezuela. 1998. Pag 5, 12, 15 y 16.

MAZZANI .C, BORGES. O, LUZÓN .O, BARRIENTOS .V y QUIJANA. P.*Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de Maíz en el

estado de Guaneó (Venezuela) en: Revista de la facultad de agronomía .2000. Vol 17 pag 185-189.

MAZZANI. C, LUZÓN. Odalis, CHAVARR .Marley.2004. *Aspergillus flavus* asociado a *Epitagus sp* (coleoptera.tenebrionidae) en Maíz bajo riego en Turen, Estado Portuguesa, .2004.Venezuela Vol 19(3) pag 157-159.

MELJEN.J. Norma oficial Mexicana nom-147-ssaj-1996, bienes y servicios .cereales y sus productos.harinas de cereales, semola, o semolina o. 1 sus mezclas. Productos de panificación, disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.1999.

MERCK. E. Manual de medios de cultivos .1994.pág.46, 47 y 48.editorial Zertificiertes.

MOHAMMED. Kasm, SMITH. J. E, HARRANG. Aflatoxinas. Biodegradación, efectos de temperatura y microbios.1993.

MONTES .R y FLORES .Hilda. Combate de *Fusarium thapsinum* y *claviceps africana* Mediante semillas de sorgo tratadas con productos naturales.2001.

MORENO, Marellys, MARTÍNEZ. A y RAYBAUDII .Rosa .Determinación de deoxinivalenol en trigo, cebada y maíz y su relación con los niveles de mohos totales, *Fusarium spp*, porcentaje de colonización y actividad de agua. En: Archivos latinoamericanos de nutrición.2000.

MOROZUMI. S. Isolation, purificación and Antibiotic Activity of Methoxycinnamaldehyde from cinnamon en Applied and Environmental Microbiology .1978. Vol 36(4) pag 577-583.

OCAMPO. I, JAIMES. Judith, CONTRERAS. Elizabeth y CARRAZANA. J. Estudio de la micoflora y contenido de aflatoxinas presentes en cebada cultivada y almacenada en el estado de hidalgo. 2004. Pág. 245- 252.

ORELLANA. A. MUCHAYPINA. J.Y. GUILLERMO. J. Prevalencia de hongos en harina de *lipidium peruvianun* (Maca) en mercados de Andahuaylas. Ica y Cañete-Perú. En: Revista peruana de Biología.2005. Vol 92 Pág. 445-448.

OSUNA. O. Impacto de las fumonisinas en la producción animal. En revista porcicultura colombiana .1992. Vol 7(3).

OSUNA.O Manejo de los granos en las fábricas de alimentos, en: Revista Industrial Agrícola. Octubre 1999, Pág. 18-21.

PADRÓN, Beatriz, ORANDY, Azucena, RIVAS, Catalina, VERDE, Maria. Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium Aromaticum* y

Cinnamomum zeylanicum con efectos inhibitorios sobre bacterias y hongos, en ciencia Julio-sep 2003. Vol. 6(3) Pág. 333-338.

PAWAR. V. C. y THAKER. V.S. In vitro efficacy of 75 essential oil against *Aspergillus niger*. 2006.

PERAICA, M. RADIC, B. LUCIC, A. PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxin in humans. En World health organization. Bolletin of the world health organization. 1999. Vol 77(9), Pág. 754-813.

PINEDA. J y CARRASCO. A. Población de hongos asociadas a inflorescencia y mazorcas de maíz. 1997. Resumen.

PLAZA y JAMES. Gran enciclopedia ilustrada circulo 1994 vol. 8 Pág. 2578.

RABAL-ZUZAGUA. Diccionario Geográfico de Colombia. Tomo 4. Editorial Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Tercera edición. 1996.

RAMOS. M. Programa universitario de alimentos. 1980.

RANASINGHE. L, Jayawardena. B y Abeywickrama. K. Fungicidal activity of essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* (L) and *Syzygium aromaticum*. Meret L, M Perry. Against crown rot and anthracnose pathogens isolate from banana. En: Lett Applied Microbiol. 2002. vol 35(3) pag 208- 211.

RESTREPO. Melida, QUINTERO. P.R y FRAUME. N.J. Aplicaciones medicinales y orofaríngeas. En: El milagro de las plantas. 2005. Pág. (75).

ROBLEDO, Maria de L, MARÍN, Sonia y RAMOS, A. J. 2001. Contaminación con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el estado de Nayarit. 2001. Pág. 141- 144.

ROJAS. Tamara y RONDÓN. A. J. Control químico in Vitro de *Fusarium decencellulare brink* aislado de mango, en. Agronomía tropical. 1995. Vol 45 (39) Pág. 417-428.

SAENZPEÑA. C.H. Reino hongos. en: Hipertextos del area de la Biología. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Agrarias. 2004.

SALGAR. Lina. Resumen del Cultivo de Maíz en Colombia, en: Revista Semillas. 2004.

STAUFFER. A, Orrego. Aida y Aquino. Alicia 2000. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/ o bactericida. En : Revista de ciencia y tecnología.. 2000. Vol 1 N° 2 Pág 29.

TAYLOR. T, REMY. W y HASS. H. Allomyces in the Devonian. Nature, Pág 367-601.

VÁZQUEZ. M. El Ecosistema de Granos Almacenados, en: Avance y perspectiva.2001.Vol.20. Pág 407-413.

VELLUTIA, SANCHOS. V, RAMOS.A.J, TURON. C y MARIN.S. Impact of essential oils on growth rate, Zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity y conditions in maize grain en: Applied Microbiology. 2004. Vol 96 (4) Pág 716-724.

WALES.J. . Enciclopedia virtual wikipedia en :
[http:// www.eswikipedia.org/wiki/introducei%03%B3n.2001](http://www.eswikipedia.org/wiki/introducei%03%B3n.2001).

WARREN .L y JAWETZ. E. Microbiología e inmunología segunda edición – editorial el manual moderno s, a, México. 1998. Pág 83-84.Editorial el manual moderno S.A. de .México. D.f-Santa fe de Bogotá.

WATNWRIGHT. M. Introducción a la biotecnología de los hongos.1992. Pág 18-20, 136.editorial acribia España. 1992.

WYATT, R.D. Formas practicas para disminuir exitosamente las perdidas por micotoxicosis .Aflatoxicosis en: Avicultura profesional.1993. .Vol 11, Pág 64, 66-67.

ZHU. J, ZENG. X, LIU. T, QIAN . K, HAN.Y, XUE.S, TUCKER.B, SCHULFZ.G, COATS. J, ROWLEY .W Y ZHANG.A. Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against.2006. Vol 22 (3) Pág 515-522.

ANEXOS

ANEXO A.

Evaluación de la actividad biológica de los extractos de "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Sizygium aromaticum*" (en ciclohexano, cloroformo, acetona).

Se realizó un ensayo con los extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Sizygium aromaticum*" (en ciclohexano, cloroformo y acetona) a las concentraciones de [30 mg/ mL] y [10 mg / mL], estos extractos fueron aplicados sobre semillas de maíz enteras y sobre granos de maíz molidos, para esto se tomó 1 mL de cada solución y se agregó en un vial limpio, agregándose a continuación 5 semillas de maíz, las cuales fueron dejadas por un tiempo de media hora, para el maíz molido se tomaron 11 g, se rosearon con 1 mL de extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum* y clavo "*Sizygium aromaticum*" a las concentraciones de 30 mg/mL y 10 mg/mL, después se agregaron aun erlenmeyer con 99 mL de agua peptonada estéril dejándose por un tiempo de media hora ,se procedió a continuación a preparar diluciones seriadas sembrando en medio YGC las diluciones 10 y 10, incubándose a continuación por 3-5 días a una temperatura promedio de 35 °C estos fueron comparados con los controles a los cuales no se les trató con los extractos.

Las siguientes fotos muestran los resultados obtenidos con los extractos en ciclohexano de Canela "*Cinnamomum zeylanicum*" a las concentraciones de 30 mg/mL y 10 mg/mL para el tratamiento de las semillas de maíz y granos molidos.

Foto N° 32. Extracto en ciclohexano Canela 30mg/mL.



Las semillas tratadas con una concentración de 30 mg/mL no mostraron ningún crecimiento fúngico después de un tiempo de 5 días de haber sido incubadas.

Foto N° 33. Extracto en ciclohexano Canela 10mg/mL.



Las semillas tratadas con la concentración de 10 mg/mL si presentaron crecimiento fúngico, se aprecian aquí las colonias crecidas.

Foto N° 34. Extracto en ciclohexano Canela dilución 10^{-2} , concentración mg/mL.



El maíz molido tratado con el extracto en ciclohexano a una concentración de 30 mg/mL a la dilución 10^{-2} si presentó crecimentofúngico, mostrándose un Elevado crecimiento de colonias.

Las fotos ilustradas a continuación muestran los resultados obtenidos con el extracto cloroformico de canela "*Cinnamomum zeylanicum*".

Foto N° 35. Extracto en cloroformo de Canela a 30mg/mL.



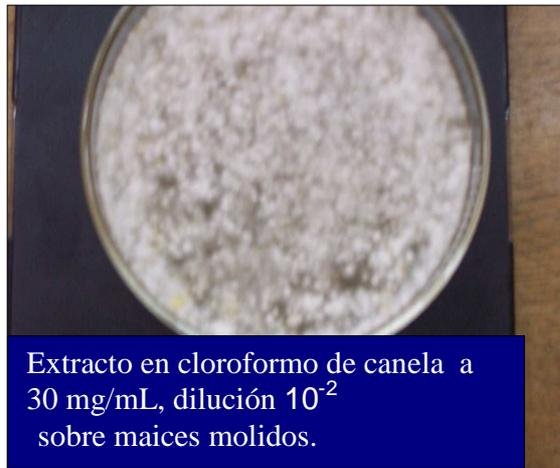
El extracto en cloroformo de canela a una concentración de 30 mg/ mL mostró actividad biológica, ya que las semillas de "*Zea mays*" no mostraron ningún crecimiento fúngico.

Foto N° 36. Extracto en cloroformo de Canela a 10mg/mL.



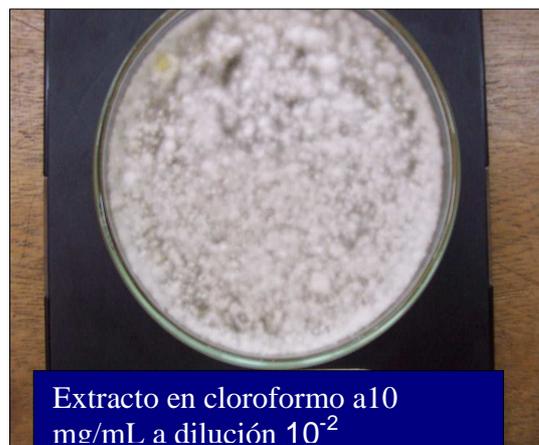
Las semillas tratadas con el extracto en cloroformo a una concentración de 10 mg/ mL mostraron crecimiento fúngico, se observan en la foto las colonias crecidas.

Foto N° 37. Extracto en cloroformo de Canela a 30mg/mL, dilución 10^{-2} sobre maíces molidos.



Los maíces molidos tratados con el extracto en cloroformo a una concentración de 30 mg/ mL en la dilución 10^{-2} si mostraron crecimiento fúngico en la foto se observa el crecimiento abundante de las colonias.

Foto N° 38. Extracto en cloroformo a 10 mg/mL a dilución 10^{-2} .



El extracto en cloroformo a una concentración de 10 mg/ mL a la dilución 10^{-2} no tuvo ninguna actividad inhibitoria en el crecimiento de hongos, en la foto se observa el crecimiento de las colonias.

ANEXO B.

Cálculos para la preparación de los reactivos utilizados. A continuación aparecen los cálculos requeridos para la preparación de los reactivos utilizados: para establecer la relación matemática de la regla de tres simple, se tiene en cuenta una relación estandar para cada reactivo, por ejemplo para el medio agar sabouraud, según la indicación de la etiqueta del reactivo: 5g de agar sabouraud rinde para preparar un litro (1000 ml) de agua destilada, para el Medio nutritivo YGC se requieren 40g para preparar un litro (1000 ml) de agua destilada, para preparar el agua peptonada estéril según indicación del reactivo 100 ml por cada 0.1 g de peptona, para el caldo nutritivo se necesitan 13 g para preparar un litro (1000 ml).

De acuerdo a la cantidad de volúmenes en mililitro (mL) que se desee preparar se establece la cantidad en gramos de reactivo necesario para lo cual se plantea la regla de tres simple con base a la indicación de los reactivos ya mencionados:

2.1. Medio agar sabouraud.

$$\begin{array}{l} 65 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ mL} \\ X \longrightarrow 240 \text{ mL} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 65 \text{ g} \\ X \end{array}} \right\} 15.6 \text{ g}$$

2.2. Medio YGC

$$\begin{array}{l} 40 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ mL} \\ X \longrightarrow 240 \text{ mL} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 40 \text{ g} \\ X \end{array}} \right\} 9.6 \text{ g}$$

2.3. Agua peptonada al 0.1 %

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mL} \longrightarrow 0.1 \text{ g} \\ 270 \text{ mL} \longrightarrow x \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 100 \text{ mL} \\ 270 \text{ mL} \end{array}} \right\} 0.2 \text{ g}$$

2.4. Caldo nutritivo.

$$\begin{array}{l} 13 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ mL} \\ X \longrightarrow 120 \text{ mL} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 13 \text{ g} \\ X \end{array}} \right\} 1.56 \text{ g}$$

Para otros volúmenes (cantidad en mL) se utilizó la misma relación de regla de tres simple, solamente varió la cantidad de volumen a preparar y por ende el número de gramos requeridos.

ANEXO C.

Obtención de los porcentajes de inhibición relativa (% INR)

Los porcentajes de inhibición de los tratamientos aplicados sobre los hongos con respecto a la griseofulvina se calcularon aplicando la siguiente fórmula.

Para obtener los % de inhibición relativos (INR) de los extractos en ciclohexano, cloroformo y acetona tanto de canela como de clavo de olor (Ver tablas N° 17 Y 18), se estableció la relación de acuerdo a la fórmula ya mencionada para obtener el INR con base a las medidas del diámetro de los halos de inhibición con los respectivos extractos a la concentración 30 mg/ ml, la cual se escogió porque fue la que causó mayor inhibición, dicha significancia de esta concentración fue corroborada por el análisis estadístico, esta medida de los halos obtenidos con los extractos de ciclohexano, cloroformo y acetona, fue dividida por el diámetro del halo de inhibición de cada uno de los hongos con el control positivo griseofulvina a la concentración 1000mg/ ml, se escogió esta concentración del control positivo porque esta fue la que produjo buena inhibición con respecto a la mayoría de los hongos, el resultado de esta división fue multiplicado por cien (100) lo que matemáticamente se representa en la fórmula indicada:

$$\% \text{INR} = \frac{\text{diámetro del halo de mayor tamaño}}{\text{diámetro del halo del control positivo}} \times 100$$

%INR= Porcentaje de inhibición relativo

A continuación se registran los % INR de los 7 hongos con el extracto en ciclohexano y de clavo de olor a la concentración 30 mg/ ml con relación a los halos de inhibición de griseofulvina (control positivo) a concentración 1000 mg/ ml. Hongos aislados de las muestras de "Zea mays" a los cuales se les realizó las pruebas de sensibilidad.

Los números indicados con asteriscos (*) del 1 al 7 corresponden a los hongos, prueba de sensibilidad a los extractos de canela y de clavo de olor, los cuales fueron:

(1- "*Aspergillus flavus*", 2- "*Mucor sp. (1*)*", 3- "*Aspergillus niger*", 4- "*Fusarium sp.*", 5- "*Penicillium purpurogenum*", 6- "*Penicillium sp. (1*)*", 7- "*Paecilomyces sp.*").

C.1 % INR de los 7 hongos con el extracto en ciclohexano de canela

*hongo 1

$$\frac{24,5}{42} \times 100 = 58,33\%$$

* hongo 2

$$\frac{33,3}{94,5} \times 100 = 35,23\%$$

* hongo 3

$$\frac{25}{42} \times 100 = 59,52 \%$$

* hongo 4

$$\frac{28,6}{45} \times 100 = 63,55 \%$$

* hongo 5

$$\frac{35}{74,9} \times 100 = 46,72 \%$$

*hongo 6

$$\frac{53,8}{51,6} \times 100 = 104,26 \%$$

*hongo 7

$$\frac{48,3}{33,3} \times 100 = 145,04 \%$$

C.2 % De inhibición de los 7 hongos con los extracto en ciclohexano de clavo.

*hongo 1

$$\frac{20,1}{42} \times 100 = 47,85\%$$

* hongo 2

$$\frac{34,3}{94,5} \times 100 = 36,29 \%$$

* hongo 3

$$\frac{31,7}{42} \times 100 = 75,47 \%$$

*hongo 4

$$\frac{35,5}{45} \times 100 = 78,88\%$$

* hongo 5

$$\frac{23}{74,9} \times 100 = 30,70 \%$$

* hongo 6

$$\frac{14,1}{51,6} \times 100 = 27,32\%$$

* hongo 7

$$\frac{15,1}{33,3} \times 100 = 45,34\%$$

Para obtener los % INR (porcentajes de inhibición relativos) de los extractos en cloroformo y acetona tanto de canela como de clavo se aplicó la misma fórmula con la cual se obtuvieron los % de inhibición relativo de los extractos en ciclohexano tanto de canela como de clavo.

ANEXO D.

Preparación de los tratamientos

Preparación de las soluciones madre (Stock) y las disoluciones de los extractos de canela "*Cinnamomum zeylanicum*" y clavo de olor "*Syzygium aromaticum*".

El ejemplo citado corresponde a los cálculos de la solución (Stock) y las disoluciones de concentración (30mg/mL), (20mg/mL), (10mg/mL) y (2mg/mL) del extracto ciclohexanico de canela "*Cinnamomum zeylanicum*".

D.1. Solución stock

Esta solución se preparó a una concentración de (100mg/mL), la cual se calculó de acuerdo a la formula:

$$(100\text{mg/mL}) = \frac{\text{Cantidad de soluto}}{\text{mL de solvente}}$$

A partir de aquí se calcularon los ml de solvente (DMSO) teniendo en cuenta lo siguiente:

Cantidad de soluto = 282.2mg

De extracto de ciclohexanico

Concentración deseada = (100mg/mL)

$$\text{mL solvente} = \frac{282 \text{ mg}}{100\text{mg/mL}}$$

mL de solvente = 2.822 mL de DMSO

Para preparar las demás soluciones stock de los demás extractos se procedió de la misma forma únicamente varió la cantidad de miligramo de extracto del cual se partió y por ende la cantidad en mL de DMSO utilizada.

D.2. Preparación de las diluciones de los extractos

A partir de las soluciones stock con base en la formula:

$V_1C_1=V_2C_2$, para el extracto en ciclohexano de canela a las cuatro soluciones trabajadas, donde:

V_1 =volumen inicial

C_1 =concentración inicial

V_2 =volumen final

C_2 =concentración final

$$V_1C_1=V_2C_2$$

$$V_1=?$$

$$C_1=100 \text{ mg/mL}$$

$$V_2=5 \text{ mL}$$

$$C_2=30 \text{ mg/ mL}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/mL}}{100 \text{ mg/ mL}}$$

Se tomó un volumen de 1,5 ml de solución stock y 3,5 ml de DMSO para obtener un volumen de 5 ml

Solución II

$$V \text{ (SII)}=?$$

$$C_1=100 \text{ mg/ mL}$$

$$V_2=5 \text{ mL}$$

$$C_2=20 \text{ mg/MI}$$

$$V = \frac{5 \text{ mL} \times 20 \text{ mg/MI}}{100 \text{ mg/ MI}}$$

Se tomó 1 MI de la solución stock y 4 MI de DMSO para obtener un Volumen de 5 ml

Solución III

$$V_1 \text{ (SII)}=?$$

$$C_1=20 \text{ mg/MI}$$

$$V_2=4 \text{ ml}$$

$$C_2=10 \text{ mg/ MI}$$

$$V_1=4 \text{ MI} \times 10 \text{ mg/MI}$$

$$20 \text{ mg/MI}$$

$$V_1 \text{ (S II)} = 2 \text{ mL}$$

Se tomaron 2 mL de la solución II y 2 ml de DMSO para obtener un volumen de 4 MI

$$\begin{aligned} \text{Solución IV} & & V1 &= \frac{5 \text{ MI} \times 2 \text{ mg/MI}}{30 \text{ MG/ML}} = 0,33 \text{ mL} \\ V1 &=? & & \\ C1 &= 30 \text{ mg/MI} & & \\ C2 &= 2 \text{ mg/ MI} & & \\ V2 &= 5 \text{ MI} & & \end{aligned}$$

Se tomaron 0,33 ml de la solución I y 4,7 ml de DMSO.

D.3. Obtención del rendimiento de los extractos de Canela y Clavo.

Para obtener el rendimiento se estableció una relación partiendo de que 100 g del tamizaje del material vegetal representan un rendimiento del 100%, en el siguiente ejemplo aparecen los resultados del rendimiento del extracto en ciclohexano de canela, se obtuvieron 0,282 g de extracto a partir de 100 g de material vegetal entonces se tiene que:

$$\begin{array}{l} 100\text{g} \longrightarrow 100 \% \\ 0,282 \text{ g} \longrightarrow X \end{array} \qquad X = \frac{0,282 \text{ g} \times 100\%}{100\text{g}}$$
$$X = 0,28 \%$$

ANEXO E.

Análisis de harinas comerciales

Se realizó un ensayo con 4 muestras de harinas de “*Zea mays*” comercial de diferentes marcas (Promasa, Arepa nieve, Harina Pan y Quaquer) con el fin de evaluar la presencia de hongos.

11 g de harina en 99 mL de agua peptonada estéril al 0.1% dejándolas por media hora y procediendo a preparar diluciones seriadas, sembrando las de 10^{-2} y 10^{-3} en cajas de petri con medio YGC, técnica de siembra profunda (se hizo por duplicado), se incubaron a 35 °C por 3 días.

La siguiente tabla N° 28, muestra los resultados obtenidos al 3 día de siembra en harinas comerciales de “*Zea mays*”.

Tabla N° 26. Resultados de ufc/g en muestras de harinas comerciales de “*Zea mays*”.

Muestras	ufc/g
1	20×10^2 ufc/ g
2	10×10^2 ufc/g
3	10×10^2 ufc/g
4	10×10^2 ufc/g

Los hongos predominantes en estas muestras fueron: “*Alternaria sp.*”, “*Aspergillus flavus*”, “*Mucor sp. (2*)*”, “*Aspergillus fumigatus*”, “*Aspergillus ochraceus*”.

Los niveles máximos permitidos de ufc/g en harinas son de 1000 ufc/g.

En las siguientes fotos aparecen las colonias crecidas en las diluciones de las muestras de harinas.

Foto N° 39.a. Colonias crecidas en una muestra de harina de “Zea mays” a dilución 10^{-2}

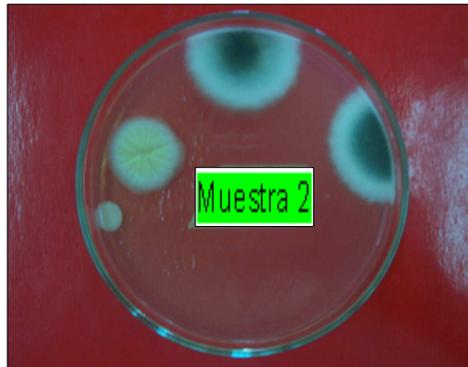


Foto N° 39b. Colonias crecidas en una muestra de harina de “Zea mays” a dilución 10^{-3}



En la foto N° 39 a. Aparecen las colonias crecidas en una de las muestras de harinas en la dilución 10^{-2} obsérvese las colonias azul verdosas correspondientes al hongo “*Aspergillus fumigatus*” y las verde claro a “*Aspergillus flavus*” y en la foto N° 39b las crecidas en una dilución 10^{-3} en otra muestra de harina de “*Zea mays*” se observan también las colonias Azul verdosas correspondientes a “*A. flavus*” y la amarilla radial a “*Aspergillus ochraceus*”.

Las siguientes fotos muestran los hongos crecidos en las muestras de harinas de “*Zea mays*” analizadas.

Foto N° 40. Colonias de “*A. flavus*” y “*Mucor sp. (2*)*” crecidas en harinas de “*Zea mays*”.



La colonia que presenta la coloración Amarillo-verde corresponde al hongo “*Aspergillus flavus*” y la que presenta coloración gris corresponde a “*Mucor sp. (2*)*” Foto N° 40.

Foto N° 41. Colonia de “*Mucor sp. (2*)*” en mayor tamaño.



En esta foto se observa el hongo “*Mucor sp. (2*)*” en mayor tamaño.

Foto N° 42. Colonias crecidas de “*Aspergillus Ochraceus*” y “*Aspergillus fumigatus*” en una muestra de harina de maíz.



La colonia que presenta color amarillo claro corresponde al hongo “*Aspergillus Ochraceus*” y las de color azul-verde al hongo “*Aspergillus fumigatus*”.

Foto N° 43. Colonias crecidas de “*Alternaria sp.*” en una muestra de harina de maíz.

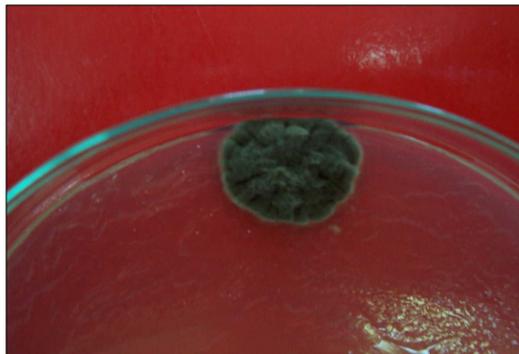
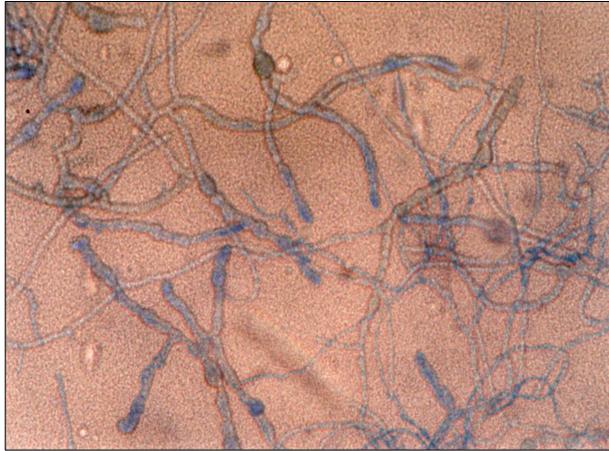
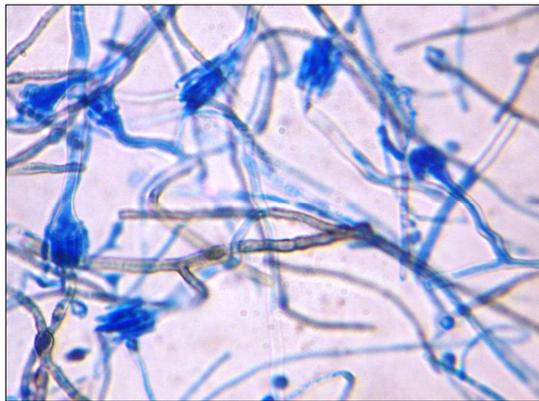


Foto N° 44 a. Colonias crecidas de “*Aureobasidium sp.*”, en una muestra de harina de maíz.



Estructuras asexuales de reproducción del hongo “*Aureobasidium sp.*”, nótese las formas globosas que aparecen a lo largo de las hifas formando unas cadenas, las cuales reciben el nombre de basidiosporas. (Ver foto 45 N° a).

Foto N° 44 b. Colonias crecidas de “*Aureobasidium sp.*”, en una muestra de harina de maíz.



Estructuras sexuales de reproducción del hongo “*Aureobasidium sp.*”, nótese la terminación de las hifas, el brote de las esporas recibe el nombre de artrosporas. (Ver 45b)

ANEXO F.

MERCK

Tabla Nº 27. Normas para interpretar y reportar el recuento estandar en placa

Médios de cultivo, Normas para interpretar y reportar el recuento estandar en placa

Características del recuento.	Ejemplo	Calcular	Reportar
1. Dos cajas de La misma dilución tienen entre 30 y 300 colonias. Contar las dos cajas.	Caja 1:180 Dil. 10^{-2} Caja 2: 140	Promedio aritmético $\bar{X} = 160$	Recuento estandar en placa 16×10^3
En la misma dilución una caja tiene entre 30n y 300 y la outra <30 ó >300 colonias. Contar las dos cajas.	Caja 1 : 70 Dil. 10^{-2} Caja 2 : 26	Promedio aritmético $\bar{X} = 48$	Recuento estandar en placa. 48×10^2
3. Las cajas de 2 diluciones consecutivas tienen entre 30 y 300 colonias. Contar las 4 cajas.	a. \bar{X} Dil 10^{-3} :35 \bar{X} Dil 10^{-2} : 250	Relación: $10^{-3}/10^{-2}$ $\frac{35.000}{25.000} =$ si menor de tomar Promedio	Recuento estandar en placa 30×10^3
	b. \bar{X} Dil 10^{-3} :: 38 \bar{X} Dil 10^{-2} : 150	Relación: $10^{-3} / 10^{-2}$ $\frac{38.000}{15.000} =$ si mayor de 2 tomar el menor	Recuento estandar en placa 15×10^3
4. No hay colonias en las cajas de la suspensión más concentrada.	Caja 1:<1 Dil 10^{-1} Caja 2:<1	$\bar{X} < 1$	Recuento estimado en placa $< 1 \times 10^1$
5. Dos cajas de la dilución más alta tienen más de 300 colonias. Dividir las cajas en forma radial (2,4,8) y contar El número de colonias por sección.	a. Dil 10^{-3} Caja1:180 en $\frac{1}{4}$ Caja 2: 160 en $\frac{1}{4}$	Promedio aritmético $180 \times 4 = 720$ $\bar{X} = 680$ $160 \times 4 = 640$	Recuento estandar en placa 68×10^4
	b. Más de 200 en $\frac{1}{8}$	$> 200 \times 8 = 1.600$	Recuento estimado en placa: $> 16 \times 10^5$
6. Presencia de colonias diseminadas en un área menor que la mitad de la cajá. Contar la otra mitad.	Dil 10^{-2} =Caja1 mitad 60x2 Caja 2: 180	Promedio aritmético $\bar{X} = 150$	Presencia de colonias diseminadas 15×10^3

