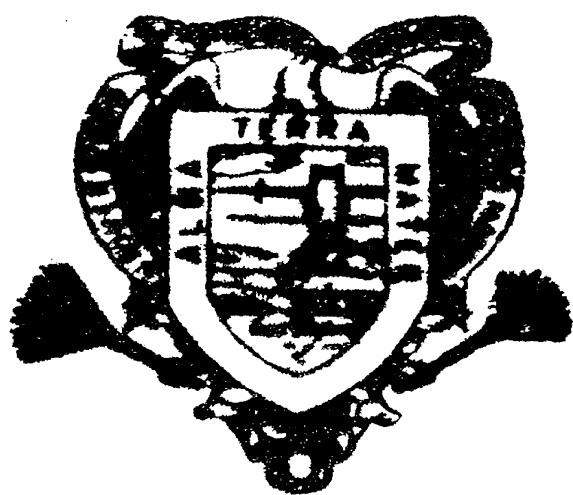


**EFECTO DE CUATRO FUNGISTATICOS SOBRE  
Aspergillus flavus Link Y LA PRODUCCION DE  
AFLATOXINAS EN GRANO DE MAIZ DEL NORTE  
DE TAMAULIPAS**

**ALEJANDRO GUZMAN LEGARRI**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA**



**Universidad Autónoma Agraria**

**“Antonio Narro”**

**PROGRAMA DE GRADUADOS**

**Buenovista, Saltillo, Coah.**

**JUNIO DE 2002**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

"EFECTO DE CUATRO FUNGISTÁTICOS SOBRE *Aspergillus flavus* (Link) Y LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN GRANO DE MAÍZ DEL NORTE DE TAMAULIPAS"

TESIS

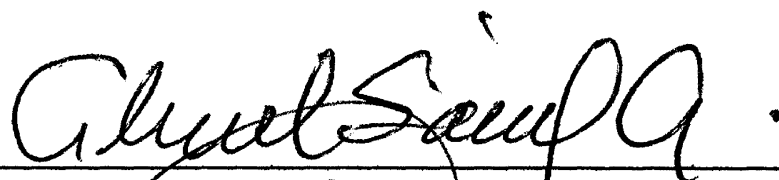
ALEJANDRO GUZMÁN LEGARREA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

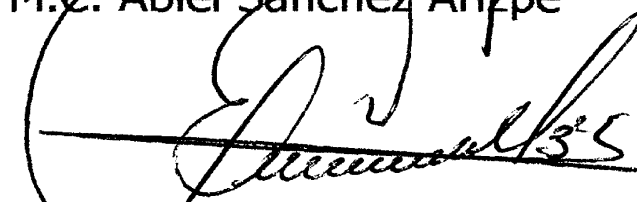
COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:



M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Asesor:



Dr. Mario E. Vázquez Badillo

Asesor:



PhD. Juan Manuel Fernando Narváez Melo



Dr. Ramiro López Trujillo  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila  
Junio del 2002

13512

# AGRADECIMIENTOS

## *A Dios*

### **Por haberme dado la vida y permitir desarrollarme en mi vida profesional**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" (UAAAN), que me albergó en estos años de preparación.

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe por ese gran apoyo desinteresado que siempre me dio, por su tiempo, sus experiencias que compartió en todo momento y por su honestidad como persona y profesionalista en su campo de trabajo.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez por facilitarme el llevar a cabo los análisis de las aflatoxinas y por sus opiniones tan valiosas en este documento.

Al Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo por el gran apoyo para llevar a cabo este trabajo y la amistad que siempre me ha brindado.

Al PhD. Juan Manuel Narváez Melo por su gran colaboración y confianza.

Al Dr. Jerónimo Landeros Flores, por la confianza y amistad.

Al M.C. Víctor Manuel Zamora Villa, por esa gran ayuda en el aspecto estadístico y estar siempre colaborando.

A todos los Maestros del Departamento de Parasitología Agrícola y del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas (CCDTS). Con los cuales tomé mis cursos para formarme y salir adelante.

Al área secretarial del Departamento de Parasitología Agrícola por su amistad siempre brindada en todo momento y su accesibilidad para sacar adelante el trabajo.

A Irene Ayala López que siendo una persona con múltiples ocupaciones personales y de trabajo ha colaborado en la corrección y escritura de este documento además de la gran confianza y la amistad.

Al Lic. Juan Enrique Álvarez Sánchez y su esposa María de la Luz Rodríguez Silva, sus hijos Cristela, Nancy y Jorge, porque han sido mi segunda familia, durante estos años de preparación.

A América Rodríguez Silva por darme su amistad y compartir momentos de alegrías.

A todas las personas que de alguna u otra manera me brindaron su apoyo y creyeron en mi.

# DEDICATORIAS

*A DIOS*

**Por permitirme concluir este trabajo a pesar de las adversidades que se presentaron a lo largo de estos años que han sido de lucha constante y superación profesional.**

A mi Abuelo

**Esteban Legarrea Iribarren (+)**

*Hombre honrado y fiel amigo, ejemplo completo para toda la familia e inspiración para el trabajo en esta vida.*

A mis Padres

**Marcelino Guzmán Mesta y Victoria Legarrea García**

*Por el apoyo que en todo momento me han brindado, siendo un gran ejemplo de esfuerzo.*

A mis hijos

**Victoria Alejandra y Marcelino Alejandro**

*En quienes siempre me inspiro para sacar adelante mis sueños y verlos cristalizados.*

**A María Ofelia Seda Vergara**

*Fiel compañera de la vida, trabajadora y entusiasta*

A mis hermanos

**Gerardo, Adán,  
José Luis, Marcelino,  
Marco Antonio y Jorge,**

*En quienes he encontrado el apoyo necesario y el calor de familia  
para mantener la unidad en el trabajo y realizar proyectos en  
conjunto con la idea de salir siempre adelante.*

# COMPENDIO

Efecto de Cuatro Fungistáticos Sobre *Aspergillus Flavus* Link y la Producción de Aflatoxinas en Grano de Maíz del Norte de Tamaulipas

**POR**

ALEJANDRO GUZMÁN LEGARREA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN  
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"  
Buenavista, Saltillo, Coahuila. Junio del 2002

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Asesor-

Palabras Clave: Aflatoxinas, *Aspergillus flavus* Link, Maíz, Aflatest Fungistáticos, Hongos

Uno de los problemas más fuertes que se presentan en grano de maíz almacenado y en campo es la presencia de hongos y la producción de toxinas que afectan grandes volúmenes de toneladas mermando su producción y su calidad no siendo apto para el consumo humano. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cuatro fungistáticos sobre el hongo *Aspergillus flavus* Link y la producción de aflatoxinas en grano de maíz almacenado bajo condiciones desfavorables.

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de Parasitología Agrícola de la UAAAN, en Saltillo, Coahuila en la Unidad de Investigaciones en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la UNAM en Pabellón de Arteaga, Aguascalientes y en el Laboratorio Central de CONASUPO en la Ciudad de México, D. F. Se utilizó grano de maíz procedente de Reynosa, Tamaulipas, se instalaron 20 tratamientos producto de cuatro fungistáticos: Luprosil NC (Propianato de Amonio al 53.5 por ciento de i.a.), Altik (45 por ciento de ácido propiónico y 15 de ácido fórmico), Mycotox (50 por ciento de oxyquinol) y thiabendazol, dos contenidos de humedad al 17 y 20 por ciento, dos dosis una alta y una baja.

El grano se inoculó con 5,000 conidios/ml al momento de ajustar la humedad al 17 y 20 por ciento, almacenado el grano a una temperatura de 27° C, se realizaron tres muestreos a los cero, 10 y 20 días, determinando el contenido de microflora presente y la cuantificación de aflatoxinas totales por el método Aflatest.

Los resultados mostraron que en el efecto sobre el hongo *Aspergillus flavus* Link, el producto Luprosil NC fue el mejor reduciendo la incidencia del 1.5 a un 0.94 por ciento en la dosis de 7.5 kg/ton (Alta) y a 5.5 kg/ton (baja) y a contenidos de humedad del 17 y 20 por ciento durante los tres muestreos, presentando un efecto similar en la producción de aflatoxinas reduciendo de 2.33 a 1.94 ppb, cantidad que se encuentra dentro del límite de aflatoxinas



permitido para el consumo humano (20 ppb), en el caso del Altik en la dosis de 2.5 kg/ton (alta) de semilla, presentó un buen efecto en los dos contenidos de humedad, no siendo igual para la producción de aflatoxinas ya que los muestreos arrojaron 364.1 ppb cantidad que rebasa el límite de 20 ppb de grano destinado para consumo humano.

El Thiabendazol y Mycotox presentaron un efecto aceptable sobre el hongo en los contenidos de humedad del 17 y 20 por ciento durante los primeros 10 días de almacenado el grano y en la producción de aflatoxinas no presentaron efecto alguno ya que rebasaron las 3,000 ppb.

# ABSTRACT

Effect of Four Fungistatics on *Aspergillus Flavus* (Link) and The Production of Aflatoxin in Grains of Maize Stored of The North of Tamaulipas

BY

**ALEJANDRO GUZMAN LEGARREA**

MASTER OF SCIENCE  
IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila. June, 2002.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe - Advisor -

Key words: *Aspergillus flavus* (Link.), Fungistatics, Luprosil, Mycotox, Altik, Tiabendazol

Four fungistatics based on propionic acid were evaluated to see the effect on the fungus *Aspergillus flavus* and it's production of aflatoxins. Each fungistatic where evaluated with two dosis (high and low), also two blanks ofn maize grain stored, that were inoculated with a suspension of 5,000 conidios/ml of a cepa, producer of alfatoxins of *Aspergillus flavus* (Link) at two moisture contents (17 and 20 per cent) and a temperature of 28°C at periods of

storage of 0, 10, and 20 days, the fungistatics used where: Mycotox, Altik Luprosil NC and Thabendazol.

With Luprosil NC, it showed the lowest presence of *Aspergillus flavus*, reducing its presence from 1.5 to 0.94 per cent, followed by Altik and Luprosil with 6.52 per cent, Thabendazol also reduced it form 11.77 to 9.55 per cent, not being so for Mycotox which was superior to the blank with 19.19 and 15 per cent respectively, demostrating that the higher dosis where more effective than the lower dosis, Luprisol showed the lowest population of fungus during the samplings, inhibiting the fungus, not being so for the rest of the other treatments, which showed a tendecy to increase progressively. The moisture content of 20 per cent allows to inhibit the development of *Aspergillus flavus*, results showed that Luprosil NC was the one that gave the best results, Thiabendazol and Mycotox didn't give any effect what so ever, and Altik presented a good control at high dosis.

For the presence of aflatoxins, Luprosil NC gave the lowest value, with 2.1 ppb, Altik with 364.1 ppb, Mycotox was above the blank with 762.7 ppb and Thiabendazol with 1114.7 ppb. With the interaction, Luprosil reduced the production of aflatoxins from 2.33 to 1.94 ppb at a moisture content of seed of 20 per cent, which is acceptable in maiz grain for human consumption.

Luprosil NC was the best fungistatic to inhibit the presence of *Aspergillus flavus* with a 3 per cent and a production of aflatoxins of 2.1 ppb at a dosis of 5.5 and 7.5 kg/ton at a moisture content of 17 and 20 per cent.

# INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Índice de Cuadros .....	Vii
Índice de Figuras.....	Viii
INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos .....	3
Hipótesis .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
Punto de Entrada y Establecimiento.....	6
Pérdidas Económicas por Aflatoxinas .....	6
Toxicidad .....	7
Control .....	8
Control Genético .....	10
Control con extractos Vegetales .....	10
Control Químico .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
Lugar de Realización del Experimento .....	14
Contenido de Humedad .....	15
Micoflora .....	16
Determinación del Contenido de Aflatoxinas .....	16
Procedimiento de Análisis (Ortiz, 1992).....	16
Tratamientos .....	19
Tiempo de Almacenamiento .....	22
Variables a Evaluar .....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
CONCLUSIONES .....	41
RESUMEN .....	42
LITERATURA CITADA .....	44

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
3.1	Tratamientos instalados en el Experimento con fungistáticos, contenidos de humedad, dosis y sus repeticiones .....	21
4.1	Cuadrados medios, coeficiente de variación para producción de aflatoxinas e incidencia de <i>Aspergillus flavus</i> en grano de maíz almacenado a 17 y 20 por ciento de humedad .....	25
4.2	Comparación de medias de la interacción, contenido de humedad y fungistáticos en la producción de aflatoxinas en maíz almacenado durante 20 días .....	25
4.3	Comparación de medias de las dosis bajas y altas, fungistáticos y su interacción para producción de aflatoxinas en grano de maíz .....	27
4.4	Comparación de medias de los muestreos y fungistáticos e interacción para aflatoxinas en grano de maíz.....	28
4.5	Comparación de medias de los fungistáticos y contenido de humedad e interacción en la incidencia de <i>Aspergillus flavus</i> en granos de maíz .....	33
4.6	Dosis y fungistáticos e interacción para <i>Aspergillus flavus</i> en grano de maíz almacenado .....	35
4.7	Comparación de medias de muestreos y fungistáticos e interacción para <i>Aspergillus flavus</i> en grano de maíz almacenado.....	36

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
3.1	Determinación opcional de aflatoxinas totales por el método de inmunoafinidad en minicolumna	20
4.1	Interacción de las dosis de los fungistáticos con los muestreos en la producción de aflatoxinas con una humedad del 17 por ciento .....	30
4.2	Interacción de dosis de los fungistáticos y muestreos en la producción de aflatoxinas en maíz con una humedad del 20 por ciento .....	31
4.3	Interacción de las dosis por muestreos y fungistáticos en producción de aflatoxinas a través de las dos humedades en grano de maíz .....	32
4.4	Interacción de las dosis por muestreo y fungistáticos en la humedad del 17 por ciento para <i>A. Flavus</i> en grano de maíz .....	36
4.5	Interacción de las dosis por muestreo y fungistáticos en la humedad del 20 por ciento para <i>A. Flavus</i> en grano de maíz .....	38
4.6	Interacción de dosis por muestreo y fungistáticos a través de las dos humedades del 17 y 20 por ciento en grano de maíz almacenado .....	38

# INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas principales e importantes en la actualidad es el de proporcionar suficiente alimento y en buena calidad a una población que crece a ritmo alarmante, sin embargo, para lograrlo es indispensable reducir las pérdidas que sufren los granos, base fundamental en la dieta alimenticia de los humanos, desde que se producen en campo hasta su consumo y que son ocasionados por diversos factores.

Entre los factores que causan el deterioro de granos y hacen que disminuya su calidad física y sanitaria se encuentran los hongos que crecen tanto en estos productos como en otros alimentos, ocasionando modificaciones indeseables como: cambio de color, olor, textura y su aspecto, además, disminución de su valor nutricional y comercial (Moreno, et al 1992).

Dentro de los hongos que afectan a los granos se encuentra *Aspergillus flavus* (Link), que produce sustancia tóxicas llamadas aflatoxinas metabolitos secundarios, que al estar en la dieta alimenticia son consumidos por las diferentes especies animales y son transferidas en la leche, carne, huevos, etc. (López et al., 1995).

Cuando se ingieren las aflatoxinas con los alimentos, estas son absorbidas en la mucosa intestinal, pasando al torrente circulatorio hasta el hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan y localizan, causando lesiones necróticas, tumores y hemorragias (Moreno, et al 1992).

En nuestro país, este problema se presentó en el estado de Tamaulipas, en el año de 1989, en donde el 87 por ciento de 440,000 toneladas de grano presentaba niveles de aflatoxinas por arriba de lo permitido para consumo humano (20 ppb), siendo destinado al consumo animal, situación que obligó a las instancias gubernamentales integrar programas de prevención y descontaminación del grano en almacenes y en campo, situación que disminuyó los niveles de toxinas en los años de 1990, 1991 y 1992, ( López *et al.*, 1995).

En la actualidad el problema persiste siendo el manejo genético, biológico y químico las alternativas para controlar al hongo *Aspergillus flavus* (Link) y su producción de aflatoxinas; siendo en este último una de las más prometedoras, presentando así la oportunidad de implementar nuevas líneas de investigación integradas por el Departamento de Parasitología , además, de ser el Estado de Tamaulipas una área de influencia de la Universidad y dada la importancia del grano de maíz en la dieta alimenticia, por lo anterior se presenta este trabajo con el fin de contribuir a aportar soluciones para el control del hongo y la producción de aflatoxinas y así liberar el consumo del grano de maíz planteando el siguiente objetivo:



## Objetivo

- Evaluar el efecto de cuatro fungistáticos contra *Aspergillus flavus* (Link) y la producción de aflatoxinas en granos de maíz almacenado, bajo dos condiciones de humedad favorables, para el desarrollo del hongo.

## Hipótesis

- Los productos Altik, Mycotox y Luprosil superan en eficiencia al tiabendazol en el control de *Aspergillus flavus* (Link) y la producción de aflatoxinas en grano de maíz.

# REVISION DE LITERATURA

## Aflatoxinas

La historia de las aflatoxinas datan desde el año de 1960, con la muerte de 100,000 pavos en Inglaterra por una enfermedad denominada Turkey X o enfermedad X de los pavos, al ser alimentados con una fuente de harina de cacahuate proveniente del Brasil, la cuál contenía el hongo *Aspergillus flavus* (Link), (Moreno *et al.* 1992). En 1961 se aisló la micotoxina causal a la que se le denominó aflatoxina, palabra formada con la letra "A", inicial de *Aspergillus*, seguida de la sílaba "fla" de flavus y "toxina" de sustancia acuosa, iniciando el estudio intensivo y sistemático de las micotoxinas (Acosta, 1994).

Moreno *et al.* 1992) mencionan que las aflatoxinas se caracterizan por ser fluorescentes cuando se iluminan con la luz ultravioleta, originando el nombre aflatoxinas B cuando es azul (Blue) o G cuando es verde (Green), siendo la B1, B2, G1 y G2 las que se descubrieron primero, además se producen en cepas del grupo *Aspergillus flavus*, la cual produce los primeros dos tipos de toxina y *Aspergillus parasiticus* (Speare) produce las cuatro toxinas. Por otro lado, se menciona que el reporte de aflatoxinas en maíz data desde 1920

en campos del estado de Texas, (E.U.A.). Acosta (1994) reporta que las aflatoxinas se consideraron originalmente como un problema exclusivo de almacenamiento. Sin embargo, se reporta su presencia en maíz en campo antes de la cosecha y fue reportado en la literatura científica por primera vez en 1975. Lo anterior, coincide con Romero (1993), que menciona que este hongo presentó una enorme capacidad de esporulación, siendo cosmopolita y sumamente perjudicial al hombre, limitando su ataque a las semillas provocando un daño en una pudrición parcial ó total del sustrato.

Moreno (1988), reporta este hongo como de almacén causando diversos daños a granos y semillas almacenadas, sobresaliendo la reducción del poder germinativo, ennegrecimiento del grano y la producción de aflatoxinas. Al igual, Shotwell *et al.* (1973), menciona que el hongo *A. Flavus* (Link era considerado como hongo de almacén, sin embargo se ha demostrado que es capaz de invadir el grano de maíz en el campo y de producir aflatoxinas, lo cual fue comprobado por Moreno *et al.* (1992), encontrando que puede crecer en los granos cuando están en la mazorca en el campo, durante su formación y aún después de que el grano alcanza su madurez fisiológica si no se cosecha a tiempo, además que la producción de aflatoxinas ocurre en dos etapas, la de campo, antes de la cosecha y la producción después de la cosecha.

En México, según el análisis mundial del programa conjunto FAO/OMS/PNUMA para el período 1972-1983, se reporta la presencia de

aflatoxinas y sus productos, además en 1989 y 1990 la producción de maíz en la región norte de Tamaulipas se contaminó con aflatoxinas casi en su totalidad (Acosta, 1994).

### **Punto de Entrada y Establecimiento**

Guthrie *et al.* (1977), señalan que en maíz *A. Flavus* (Link) coloniza con facilidad los estigmas externos a las brácteas, invadiendo luego el pericarpio de los granos y penetra a través del pedicelo en la etapa tardía del desarrollo del grano, favoreciendo los estigmas cafés amarillentos su crecimiento, lo cual coincide con Gatica *et al.* (1992), quienes encontraron que el mayor daño de este hongo se encontró en la etapa de estigmas verdes a grano lechoso-masoso al inocular con tres diferentes métodos. Por otro lado, Moreno *et al.* (1992) señalan que durante la cosecha se mezclan mazorcas infectadas con el hongo *A. Flavus* (Link) el cuál se caracteriza por esporular en forma abundante, diseminando la cosechadora las esporas sobre granos sanos, inoculando así grandes volúmenes de grano húmedo.

### **Pérdidas Económicas por Aflatoxinas**

Eley (1992), reporta que en el año de 1980, el 66 por ciento de muestras de maíz procedentes de Carolina del Norte contenían concentraciones de aflatoxinas superiores a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  equivalentes a pérdidas de casi 31 millones de dólares, además en Turquía, en 1988 se dieron pérdidas en higos secos, ya que en Europa se prohibió su importación y venta, al observar que el

30 por ciento de las muestras contenían aflatoxinas, esto supuso la pérdida de 50,000 empleos en la industria de la producción y envasado de este artículo.

En México, López *et al.* ( 1995), reportan que en la región norte de Tamaulipas en el año de 1989, se contaminaron 440,000 ton. de las cuales el 87 por ciento presentó cantidades arriba de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  no siendo apto para consumo humano, lo cual no permitió su comercialización, agregándose a esto el costo de los análisis realizados para la detección de las aflatoxinas.

### **Toxicidad**

Duffus y Slaughter (1992), reportan que las aflatoxinas son hepatotoxinas, nefrotoxinas o neurotoxinas, algunas son carcinogénicas, teratogénicas o tremorgénicas, se conoce relativamente poco en humanos sus efectos, señalando además, que existen por lo menos 18 compuestos en el grupo *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y estos pueden estar en todos los granos, aún y cuando las señales de infección por éstos hongos hayan desaparecido, las aflatoxinas pueden mantenerse tóxicas 12 años después de haber cesado el ataque de éstos.

La aflatoxina es producida a altas concentraciones ocasionando micotoxicosis crónicas y ocasionalmente agudas en animales domésticos y en el hombre, algunas veces, cuando son ingeridas con el forraje por el ganado lechero son excretadas con la leche en una forma todavía tóxica, (Agrios, 1991). Las principales aflatoxinas son cuatro: B1, B2, G1 y G2, la B1 se

encuentra en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, siendo Carcinógena, Teratógena y Mutágena; la B1 y B2 al ser ingeridas por animales en lactancia son excretadas en la leche en formas alteradas pero aún tóxicas, conocidas como aflatoxinas M1 y M2 (Moreno, 1988). Cuando se ingieren con los alimentos son absorbidos en la mucosa intestinal, pasando por el torrente circulatorio hasta el hígado, riñones canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan y localizan los efectos (Moreno, 1992). La aflatoxina B1 forma una amplia variedad de metabolitos en el hígado de diferentes animales, la naturaleza precisa de la respuesta depende de la especie, sexo y edad, no respondiendo todos los animales a la actividad carcinogénica, aunque para la rata y trucha arco iris la aflatoxina B1 es uno de los compuestos carcinogénicos conocidos, en cambio en humanos tuvo lugar una demostración trágica del efecto de las aflatoxinas en 1974 en la India en donde 100 de 1,000 personas afectadas fallecieron a partir de la concentración de aflatoxinas detectada en la dieta de maíz consumido (Eley, 1992).

### **Control**

Para el manejo y control del hongo y las aflatoxinas existe muy poca información que pueda ser relevante, en este apartado se hablara del control cultural, genético, biológico y químico, este último dentro del área de trabajo.

## **Control Cultural**

El control de la contaminación de aflatoxinas se basa por un lado en la prevención del crecimiento fungoso por medio de un manejo y secado adecuado y por otra parte en la identificación y separación de las áreas infectadas, el grano infectado en pequeña escala se puede usar como alimento para animales si se mezcla y se usa inmediatamente (Duffus y Slaughter, 1992). El manejo adecuado del grano durante la cosecha y almacenamiento puede reducir los daños de *Aspergillus flavus* (Link) evitando heridas que propicien la infección, almacenando el grano con un contenido de humedad del 13 por ciento. Moreno (1988) señala que la temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es de 12°C, la óptima de 27-30 y la máxima de 40-42, además, que el contenido de humedad mínimo para el desarrollo de *Aspergillus flavus* (Link) y su producción de aflatoxinas es aquel en equilibrio con una humedad relativa del 85 por ciento y que el límite de humedad máximo no existe, ya que en laboratorio se puede producir aflatoxinas en medio líquido siempre y cuando sean cultivos puros y que las condiciones óptimas para el desarrollo y la producción de aflatoxinas puede ser alta a las 24 horas, el máximo se alcanza de siete a 10 días y si el cultivo se continúa los niveles de aflatoxinas fluctúan erráticamente con el tiempo, lo cuál ha sido observado en el laboratorio. Por último, concluye que la única manera de combatir a los hongos en el almacén, es a contenidos de humedad en equilibrio con humedades relativas abajo del

70-75 por ciento, aumentando la humedad relativa el período de almacenamiento se reduce debido a la presencia de hongos y a la acción de los procesos fisiológicos de las semillas.

### **Control Genético**

Moreno (1989) señala que los resultados en campo no son consistentes y existen contradicciones en la respuesta de los genotipos en la producción de aflatoxinas, existiendo variaciones de año en año y de localidad a localidad, lo cual no permite hacer recomendaciones sobre el uso de híbridos, además la formación de variedades de maíz menos susceptibles a la producción de aflatoxina no representa la solución total del problema, debido a que se tienen que integrar un manejo integrado, tanto en campo, cosecha y almacenamiento.

### **Control con Extractos Vegetales**

Montes *et al.* (1995) realizaron pruebas de germinación de esporas, desarrollo micelial y protección de granos de maíz con polvos de extractos acuosos de 52 especies de plantas cultivadas, reportando una reducción de la germinación de las esporas con *Coffea arabica* (100 por ciento), *Pimienta dioica* (95 por ciento) y *Manguifera indica* (80 por ciento), redujeron la contaminación de granos de maíz con *Psidium guajara* (23 por ciento), *Rosamarinus officinalis* (61 por ciento), *Coleus blumei* (40.5 por ciento), *Lantana camara* (20 por ciento) y *Coffea arabica* (43 por ciento), además, concluyeron que los extractos pueden actuar en diferentes niveles del proceso infeccioso y la protección del



grano esta en función de la cobertura del extracto. Por otro lado el uso de aceites esenciales de canela, clavo de especia, hierbabuena, tomillo, albahaca, orégano y epazote, tienen un efecto inhibitorio en la germinación de esporas y desarrollo del micelio de *Aspergillus*, así como un efecto protector en granos de maíz.

### **Control Químico**

Se han llevado a cabo diferentes trabajos de aplicación de productos químicos, los cuales incluyen productos sistémicos, protectantes y el uso de ácidos orgánicos, siendo estos últimos los de mejor resultado hasta el momento. Chovrasia (1992), reporta que el clorotalonil es más efectivo en la inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus* Link y la producción de aflatoxina B1, que el Dicloran y el Mancozeb, resultado que no coincide con Hasan (1993), ya que reporta al Dicloran, Iprodione y Vinclozin como fungicidas que inhiben significativamente el crecimiento micelial del hongo a 250 ppm y que disminuyen la producción de aflatoxinas a 100, 250 y 500 ppm. Gatica *et al.*, (1995), determinaron la época de aplicación y dosis óptima de Benlate y Tilt para el control de aflatoxinas inoculando jilotes de maíz con un cepillo humedecido con una suspensión de 5,000 conidias/ml, encontrando tendencias significativas de reducción (15.4 ppb) con Benlate a 0.56 gramos de i.a./ha aplicado al inicio de floración femenina y 19.4 ppb con Tilt a 0.56 gramos de

i.a./ha aplicado al inicio de floración y 35 días después respecto al testigo inoculado y sin fungicida.

El control por medio de sustancias químicas está limitado al uso de ciertos inhibidores que se utilizan en grano de maíz con humedad alta, como en E.U., que han utilizado varios ácidos orgánicos como: El propiónico, benzóico, acético, fórmico y el sórbico, en el caso del ácido propiónico, el maíz tratado sólo se puede utilizar como alimento para animales, ya que su olor y sabor es rechazado para otro fin. En el caso de la semilla, el embrión pierde su viabilidad (Moreno, 1988), esto coincide con Tanboon (1988) que reporta diferentes ácidos usados para controlar al hongo y la solución mezclada de amonio más ácido propianato y ácido propiónico puede dar un control temporal y prevenir el desarrollo del hongo en el grano de maíz bajo condiciones de alta humedad, aunque podría no destruir la aflatoxina presente antes del tratamiento, el grano altamente contaminado con aflatoxinas puede ser detoxificado eficientemente con amonio y el resultado del grano es seguro y puede ser usado para alimentar al ganado, no siendo recomendable para consumo humano y su comercialización.

Patkar *et al.* (1991) reportan que en grano almacenado a 90 días y con humedad relativa al 90 por ciento (atmósfera modificada), todo el grano fue colonizado después de 60 días al ser tratado con ácido propiónico incrementándose el grano infectado durante el almacenamiento. Sulaiman y

Husain (1984), reportan que el Luprosil (99.9 por ciento ácido Propiónico) disminuye e inhibe hasta un 90 por ciento la presencia de *Aspergillus flavus* después de tres meses de almacenado del grano, siendo el ácido acético menos efectivo en el grano inoculado. Ghosh y Haggblom (1985), reportan que con dosis subletales (0.1-2 mg/ml) de ácido propiónico y butírico se aplicaron en medio de cultivo para evaluar el crecimiento y producción de aflatoxinas. Lo anterior, se da cuando los ácidos fueron agregados en el tiempo de inoculación, su aplicación en medios de cultivo da como resultado pobre crecimiento y la producción de aflatoxinas se reduce después de 12 días.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Lugar de Realización del Experimento

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", (UAAAN), en Buenavista, Saltillo, Coahuila y en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas de la UNAM y en el laboratorio central de CONASUPO, en la Ciudad de México.

Antes del establecimiento del experimento se determinó la condición inicial del grano en cuanto a su contenido de humedad, micoflora y su contenido de Aflatoxinas.

Para este trabajo se utilizó grano de maíz obtenido de los almacenes de Reynosa, Tamaulipas, el cual no tuvo tratamiento químico y beneficio. La aplicación de los tratamientos se realizó ajustando el contenido de humedad a 17 y 20 por ciento, utilizando el método de adición de agua (Pixton, 1982), con el agua de ajuste calculada más el inóculo de *Aspergillus flavus* ( 5,000 conidios/ml en frascos de vidrio, los cuales se colocaron en el refrigerador para homogenizar la humedad, al término de este período se complemento el contenido de humedad con el agua adicional para llevar la humedad deseada más el tratamiento de los fungistáticos y nuevamente se colocaron en el

refrigerador durante 18 horas para así homogenizar la humedad del grano, luego se colocó el grano en frascos de vidrio para formar las unidades experimentales, las cuales fueron de 200 gramos cada una, con tres repeticiones por tratamiento. Los frascos fueron tapados con polietileno y estas fueron perforadas con 10 agujeros de aguja para evitar la concentración de CO<sub>2</sub>. Los frascos con el grano inoculado se colocaron en recipientes de plástico, con una solución sobresaturada de cloruro de potasio para crear un 85 por ciento de H.R. para el grano almacenado a una humedad de 17, por ciento y otra con agua para generar una atmósfera del 100 HR para almacenar el maíz con una humedad de 20 por ciento. Se almacenó a 27°C, ya que esta temperatura favorece la producción de aflatoxinas (Diener y Davis, 1987), durante el período de almacenamiento realizada a 20 días con períodos de muestreo a los 0, 10 y 20 días donde se evaluaron en cada muestreo la presencia de su micoflora y aflatoxinas.

### **Contenido de Humedad**

La determinación del contenido de humedad del grano se realizó con el Método de Secado en Estufa establecido por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1976), en donde se pesa por duplicado de 5 a 10 gramos de maíz, una vez pesadas caja y grano, estas se colocaron dentro de una estufa con circulación forzada de aire a 103°C durante 72 horas, después se procede a pesarlas. El porcentaje de humedad se expresó en base al peso

húmedo del grano. El contenido de humedad se ajustó al 17 y 20 por ciento.

### **Micoflora**

La determinación de la clase y número de hongos presentes en el interior de los granos se llevó a cabo con 30 granos de cada repetición, las que se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2.5 por ciento durante 2 minutos; enseguida se sembraron en un medio de cultivo malta-sal-agar, con el 6 por ciento de cloruro de sodio (Christensen y Meronuck, 1976), posteriormente se llevó a incubación durante siete días a 27 °C hasta que los hongos se identificaron y cuantificaron, utilizando las claves del manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados (Moreno, 1988).

### **Determinación del Contenido de Aflatoxinas**

Para la determinación de aflatoxinas se utilizó el método para aflatoxinas totales por el método de inmunoafinidad en minicolumnas AFLATEST. Se tomaron muestras de 100 gramos por cada repetición previamente esterilizado en autoclave a 120 grados centígrados durante 20 minutos a fin de eliminar los hongos presentes y dejar sólo las aflatoxinas para su análisis.

### **Procedimiento de Análisis de Aflatoxinas (Ortíz, 1992)**

**1. Extracción.** Para extraer las aflatoxinas de la muestra se siguen las siguientes indicaciones.

- Colocar 50 g de la muestra molida en un vaso de licuadora.
- Añadir 100 ml de metanol absoluto al 80%.
- Agitar en la licuadora a alta velocidad durante un minuto.
- Filtrar en papel filtro y coleccionar todo el filtrado en un tubo de ensayo con tapa de rosca.
- Tapar el tubo de ensayo y agitar vigorosamente el extracto por 10 segundos.
- Eliminar el grano molido que fue extraído.

## **2. Análisis**

- Colocar 10 ml del extracto en un vaso de precipitado limpio y diluirlo en 40 ml de solución de agua destilada. Mezclar vigorosamente.
- Filtrar el extracto diluido, utilizando papel filtro de microfibra de vidrio, tipo Whatman 934-AH y se colecciona el extracto.
- Conectar la jeringa de vidrio a la columna aflatest, colocándola en un soporte.
- Colocar 10 ml del extracto diluido en la jeringa de vidrio.
- Retirar el tapón inferior de la columna aflatest para permitir que el líquido fluya libremente, recolectándose en un vaso.

- Con el émbolo de la jeringa de vidrio hacer presión para que el extracto pase a través de la columna aflatest a una velocidad de 2 gotas por segundo, desechándose el eluato.
- Haciendo presión con el émbolo de la jeringa de vidrio lavar la columna aflatest haciendo pasar 5 ml de agua destilada a través de ella eliminando el líquido de lavado.
- Colocar 1 ml de metanol grado HPLC en la jeringa y colocar la cubeta de vidrio de boro silicato bajo la columna.
- Cuidadosamente y haciendo presión con la jeringa hacer pasar todo el metanol a una velocidad constante de 2 gotas por segundo, recuperando todo el eluato metanólico en la cubeta.
- Adicionar 1 ml de solución reveladora a base de bromo al 0.002 por ciento a la cubeta y mezclar perfectamente en forma manual durante 5 segundos.
- Limpiar la cubeta con un pañuelo desechable y colocarla en la cámara del fluorómetro previamente calibrado
- Esperar un minuto.
- Anotar la lectura de la pantalla digital, la cuál esta dada en ppb de aflatoxinas totales en la muestra. Si la lectura excede las 300 ppb se procede a partir del paso 4 anterior pero utilizando 1 ml del extracto



diluido y continuar hasta el procedimiento del paso 13 multiplicando por dos, obteniéndose así las ppb de aflatoxinas de la muestra.

- Al final de cada determinación de aflatoxinas se lava el material con jabón y metanol absoluto.

Los tratamientos utilizados en el presente estudio fueron de 20, los cuáles son producto de cuatro fungistáticos, dos contenidos de humedad y dos dosis, más dos testigos por cada humedad.

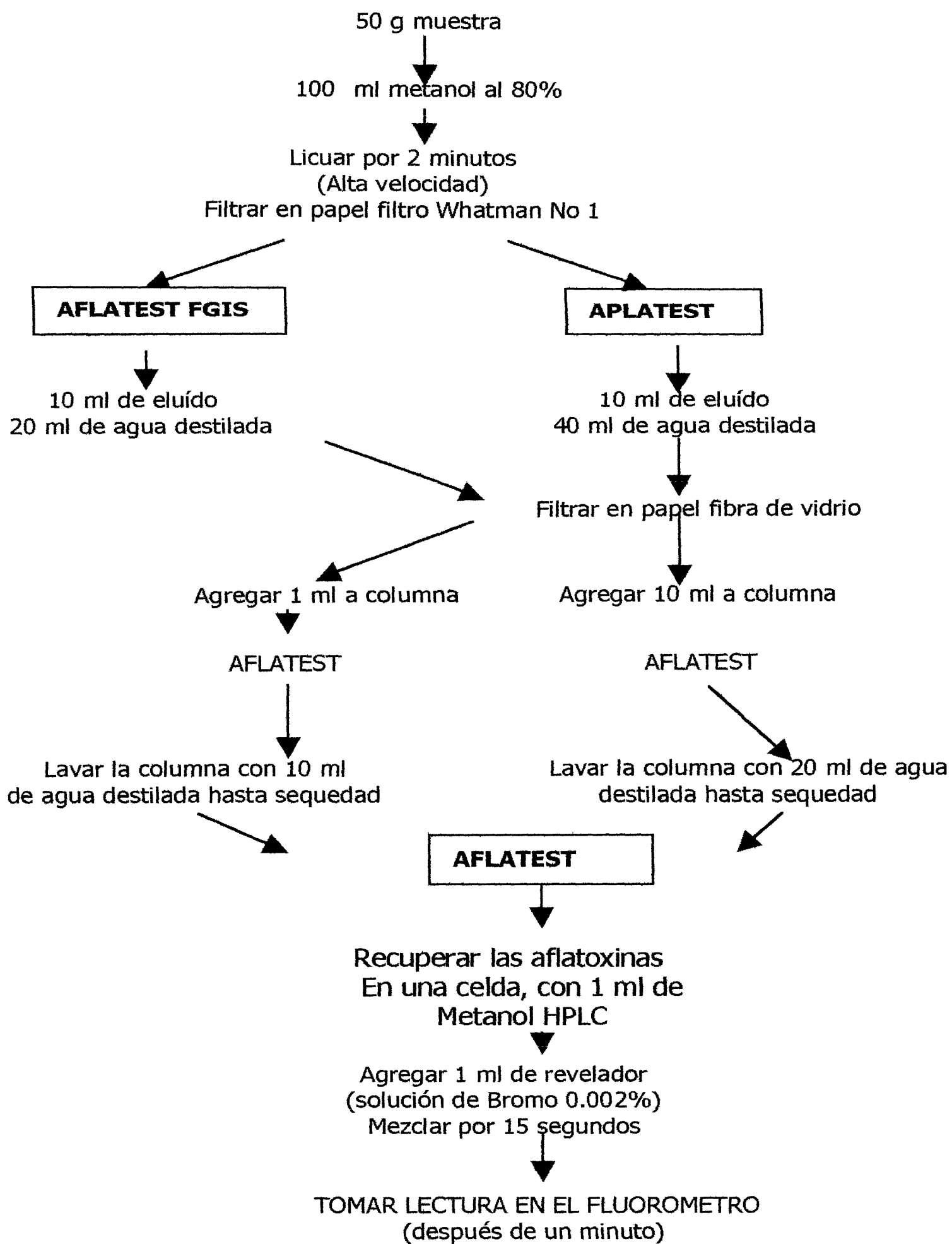
### **Tratamientos**

Los tratamientos utilizados en el presente estudio fueron de 20, los cuales son producto de cuatro fungistáticos, dos contenidos de humedad y dos dosis, más dos testigos por cada humedad. Los fungistáticos utilizados son: Mycotox (50 por ciento de oxyquinol). Altic (45 por ciento de ácido propiónico y 15 por ciento de ácido formónico) y Luprosil NC (Propianato de amonio,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$  al 53.5 por ciento de ingrediente activo) y Tiabendazol (Benzimidazol 20(4-tiazolil). A continuación en el cuadro 3.1 se describen los tratamientos señalados.

**CALIBRACIÓN**

FLUOROMETRO TOR BEX FX-100

ESTANDARES			
AMPOLLETA	ROJA	VERDE	AMARILLA
AFLATEST	24	-1	12
BIOCODE	50	0	20
AFLATEST FGIS	150	-3	75



**Figura 3.1. DETERMINACIÓN OPCIONAL DE AFLATOXINAS TOTALES POR EL METODO DE INMUNOAFINIDAD EN MINICOLUMNA (AFLATEST)**

**Cuadro 3.1** Tratamientos instalados en el experimento con fungistáticos, contenidos de humedad, dosis y sus repeticiones.

TRATAMIENTOS	C.H.	DOSIS	REP.	DOSIS
1. Mycotox	17	1	3	1.5 kg/ton
2. Mycotox	17	2	3	2.5 kg/ton
3. Altic	17	1	3	1.5 kg/ton
4. Altic	17	2	3	2.5 kg/ton
5. Lup. Sal sod.	17	1	3	5.5 kg/ton
6. Luprosil	17	2	3	7.5 kg/ton
7. Tecto	17	1	3	200 gr/ton
8. Tecto	17	2	3	400 gr/ton
9. T c/inóculo	17		3	
10. T s/inóculo	17		3	
11. Mycotox	20	1	3	1.5 kg/ton
12. Mycotox	20	2	3	1.5 kg/ton
13. Altic	20	1	3	1.5 kg/ton
14. Altic	20	2	3	2.5 kg/ton
15. Luprosil	20	1	3	5.5 kg/ton
16. Luprosil	20	2	3	7.5 kg/ton
17. Tecto	20	1	3	200 gr/ton
18. Tecto	20	2	3	400 gr/ton
19. T c/inóculo	20		3	
20. T s/inóculo	20		3	

## Tiempo de Almacenamiento

Las unidades experimentales de los tratamientos fueron evaluadas a los 0, 10 y 20 días de almacenamiento con tres repeticiones por tratamiento por muestreo.

## Variables a Evaluar

Se evaluaron la : Producción de aflatoxinas y la Presencia del hongo *Aspergillus flavus* (Link).

## Análisis Estadístico

El presente trabajo se llevó a cabo bajo un arreglo completamente al azar y se analizó bajo un diseño tetrafactorial con anidamiento de las dosis

## Diseño Experimental

El diseño experimental que se utilizó fue un tetrafactorial con anidamiento de las dosis dentro de cada fungicida con el siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + H_i + F_j + FH_{ij} + D(F)_{kj} + DH(F)_{kji} + M_i + MH_{li} + MF_{lj} + MHF_{lji} + MD(F)_{klj} \\ + MDH(F)_{kijl} + \xi_{ijklm}$$

$Y_{ijklm}$  = valor observado

$\mu$  = Efecto de la media

$H_i$  = Efecto del  $i$  – ésimo nivel de humedad

$F_j$  = Efecto del  $j$ - ésimo fungicida

$FH_{ij}$  = Interacción del  $i$ -ésimo nivel de humedad con el  $j$ -ésimo fungicida

$D(F)_{kj}$  = Anidamiento de la  $k$ -ésima dosis en el  $j$ -ésimo fungicida

$DH(F)_{kji}$  = Interacción de la  $k$ -ésima dosis con la  $i$ -ésimo nivel de humedad anidados en el  $j$ -ésimo fungicida

$M_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo muestreo

$MH_{li}$  = Interacción de la  $i$ -ésimo nivel de humedad en el  $l$ -ésimo muestreo

$MF_{lj}$  = Interacción del  $l$ -ésimo muestreo en el  $j$ -ésimo fungicida

$MHF_{lji}$  = Interacción del  $l$ -ésimo muestreo con el  $i$ -ésimo nivel de humedad y con el  $j$ -ésimo fungicida

$MD(F)_{klj}$  = Interacción del  $l$ -ésimo muestreo con la  $k$ -ésima dosis anidada en el  $j$ -ésimo fungicida

$MDH(F)_{kijl}$  = Interacción del  $l$ -ésimo muestreo con la  $k$ -ésima dosis con el  $i$ -ésimo nivel de humedad anidada en el  $j$ -ésimo fungicida

$\xi_{ijklm}$  = Error experimental

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 4.1 se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza para la producción de aflatoxinas y presencia de *Aspergillus flavus*. En dicho cuadro se puede observar que existieron diferencias altamente significativas ( $\alpha= 0.01$ ) en todas las fuentes de variación para la producción de aflatoxinas. El coeficiente de variación para esta variable se considera aceptable ya que presenta un 28.32 por ciento. Para el caso de la incidencia *A. flavus* se presentaron diferencias altamente significativas para todas las fuentes de variación a excepción del contenido de humedad, el cual fue no significativo, mientras que en la interacción del contenido de humedad por dosis dentro de fungistáticos resultó ser significativo ( $\alpha= 0.05$ ). En lo que se refiere a su coeficiente de variación este fue de un 28.76 por ciento, el cual es aceptable debido a las características de las variables y de los tratamientos.

### Aflatoxinas

Al realizar la comparación de medias (Duncan  $\alpha 0.05$ ), la producción de aflatoxinas en el grano de maíz con un contenido de humedad del 20 por ciento presentó mayor cantidad de aflatoxinas con un promedio de 917.67 ppb que aquel grano que fue ajustado al 17 por ciento de contenido de humedad, ya que éste presentó 265.98 ppb, tal como se aprecia en el Cuadro 4.2.

Cuadro 4.1. Cuadrados medios, coeficiente de variación para producción de aflatoxinas e incidencia de *Aspergillus flavus* en grano de maíz almacenado a 17 y 20 por ciento de humedad.

FV	Gl	Aflatoxinas	<i>A. flavus</i>
H	1	102.55 **	0.42 NS
F	4	78.62 **	26.09 **
FxH	4	11.70 **	1.18 **
D(F)	5	9.66 **	3.97 **
HD(F)	5	4.73 **	0.66 *
M	2	386.20 **	47.24 **
MH	2	25.66 **	3.16 **
MF	8	24.89 **	3.05 **
MFH	8	4.20 **	0.72 **
MD(F)	10	277 **	1.01 **
MHD(F)	10	2.90 **	0.68 **
EE	120	0.692	0.249
CV		28.76	28.32

Cuadro 4.2 Comparación de medias de la interacción Contenido de Humedad y fungistáticos en la producción de aflatoxinas en maíz almacenado durante 20 días.

FUNGISTATICOS	HUMEDADES		MEDIAS
	17 por ciento	20 por ciento	
1 Mycotox	129.208 G	1396.111	762.7 B
2 Altik	3.333 H	724.944 D	364.1 C
3 Luprosil NC	2.333 I	1.944 I	2.1 D
4 Thiabendazol	561.666 F	1667.777 A	1114.7 A
5 Testigo	633.277 E	797.555 C	715.4 B
MEDIAS	265.98 B	917.67 A	

Valores seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren estadísticamente (Duncan, 0.05)

En lo que se refiere a los fungistáticos y la producción de aflatoxinas, el Luprosil NC registró la menor cantidad de aflatoxinas con 2.1 ppb, mientras que el Mycotox, Altik, y Thiabendazol presentaron 762.7, 364.1 y 1114.7 ppb

respectivamente, siendo este último el que registró la mayor cantidad de aflatoxinas.

En lo que se refiere a la interacción fungistáticos y contenido de humedad se aprecia que los fungistáticos al 17 por ciento manifestaron menor cantidad de aflatoxinas que en los contenidos de humedad del 20 por ciento, siendo el Luprosil NC el que presentó la menor cantidad de aflatoxina a los 17 y 20 por ciento de humedad con 2.3 y 1.9 ppb, resultados similares fueron obtenidos por Moreno *et al.* (2000), mientras que el Altik al 17 por ciento de humedad registró 3.3 ppb, mientras que al 20 por ciento se disparó a 724 ppb. En lo que se refiere al Thiabendazol con un contenido de humedad del 17 por ciento presentó 561.66, subiendo a valores muy altos de 1,667.77 ppb, en el 20 por ciento de humedad, valor muy similar al Mycotox quien presentó 1,396.11, no siendo así al 17 por ciento, ya que presentó 129.20 ppb, por otro lado el testigo fue superado por éstos dos (Mycotox y Thiabendazol) en la humedad del 20 por ciento.

Entre las dosis evaluadas, la dosis alta resultó con una menor producción de aflatoxinas con 548.79 ppb, mientras que las dosis Baja registraron 634.86 ppb, tal como se aprecia en el Cuadro 4.3 donde se observa que a la dosis alta de Altik, Luprosil NC y el testigo presentaron una tendencia a inhibir la producción de las aflatoxinas, siendo el Luprosil NC el que presentó la cantidad más baja con un promedio de 2.1 ppb, mientras el Thiabendazol



mostró la cantidad más alta con un promedio de 1114.7 pbb, manteniéndose los tratamientos con el mismo comportamiento antes citado.

**Cuadro 4.3 Comparación de medias de las dosis baja y alta, fungistáticos y su interacción para producción de aflatoxinas en grano de maíz.**

FUNGISTATICOS	DOSIS				MEDIA	
	BAJA		ALTA			
1 Mycotox	741.889	E	783.500	D	762.7	B
2 Altik	539.944	F	188.333	H	364.1	C
3 Luprosil NC	3.500	I	0.778	J	2.1	
4 Thiabendazol	821.111	C	1408.333	A	1114.7	A
5 Testigo	1067.833	B	363.000	G	715.4	B
MEDIAS	634.86	A	548.79	B		

Valores seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren estadísticamente (Duncan, 0.05)

Entre los muestreos (Cuadro 4.4) se puede apreciar que el Luprosil NC, presentó la cantidad más baja de aflatoxinas a través de los muestreos con 2.1 pbb, lo cual se encontró dentro de la norma aceptada para el consumo humano que es de 20 pbb en grano de maíz, seguido por el Altik con 364.1 pbb de aflatoxinas, después del testigo y el Thiabendazol, los cuales registraron 715.4 y 1114.7 pbb respectivamente, en donde este último presentó la mayor cantidad con 1114.7 pbb, el que en los muestreos a los 10 y 20 días presentaron las cantidades más altas de aflatoxinas, rebasando el nivel presentado por el testigo, caso contrario se registró en el Luprosil NC que se comportó bajando la cantidad del muestreo a los 20 días de 3.5 y 2.58 pbb que nos permite ver el efecto para inhibir la producción de aflatoxinas, lo cual concuerda con Moreno *et al.* (2000), ya que la aflatoxina se mantuvo por debajo

de 8.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . El muestreo a los cero días presentó los niveles más bajos de aflatoxinas (0.3 pbb) observándose una tendencia a incrementarse a través del en los muestreos secuenciales.

Cuadro 4.4 Comparación de medias de los muestreos y fungistáticos e interacción para aflatoxinas en grano de maíz.

FUNGISTATICOS	MUESTREOS						MEDIA	
	0 Días		10 Días		20 Días			
1 Mycotox	0.000		317.416	E	1970.666	B	762.7	B
2 Altik	0.583		52.250	H	1039.583	G	364.1	C
3 Luprosil NC	0.333		3.500	I	2.583	J	2.1	D
4 Thiabendazol	0.000		530.833	D	2813.333	A	1114.7	A
5 Testigo	0.500		277.500	F	1868.250	C	715.4	B
MEDIAS	0.3	C	236.3	B	1538.9	A		

Valores seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren estadísticamente (Duncan,0.05)

En la Figura 4.1 se puede apreciar que al contenido de humedad del 17 por ciento, el comportamiento de la producción de aflatoxinas en la dosis baja a través de los tres muestreos, el testigo se incrementó a partir de los 10 días presentando niveles de aflatoxinas de 3,500 pbb no siendo así para la dosis alta, en donde se mantuvo a través del tiempo de muestreo por debajo de 200 pbb, esto indica que su comportamiento se deba a que en esta dosis no se encontraba con inóculo y por tanto la producción de las aflatoxinas se comportara de esta manera. Para el maíz tratado con Thiabendazol, la respuesta a la dosis baja es que se incrementó de los 0 a los 10 días de almacenamiento a 500 pbb mostrando una tendencia a disminuir hasta 350 pbb a los 20 días, en cambio para la dosis alta muestra un comportamiento similar al tiempo de 0 y 10 días, sin embargo, a los 20 días se incrementa de 500 pbb

a 1700, ppb lo que nos indica que en el nivel de humedad del 17 por ciento y con la dosis alta, no tiene un efecto considerable, debido a que rebasa el límite de las 20 ppb. En el caso del Mycotox, se mantiene ligeramente a los 0 días, no siendo así a partir de los 10, ya que se incrementó de 100 a 700 ppb, en la dosis baja, mientras que en la dosis alta se mantiene ligeramente por abajo de 200 ppb, a traves del tiempo de los muestreos, lo que refleja que a esta dosis y con este nivel de humedad mantiene un efecto estable. Para el Luprosil NC y Altik, se ve que su comportamiento en esta humedad es muy similar en ambas dosis ya que presentan una cantidad por abajo de 200 ppb, sin embargo el Luprosil NC se encontró dentro del límite permitido para consumo de grano de maíz con presencia de aflatoxinas, el cual es de 20 ppb, esto indica que bajo las dos dosis el Luprosil NC surte un efecto inhibitorio en la producción de aflatoxinas a un nivel de humedad del 17 por ciento.

En la Figura 4.2 se puede observar que al nivel de humedad del 20 por ciento, y en la dosis baja, el testigo con inóculo presenta una tendencia a incrementar el contenido de aflatoxinas a los 10 días de 0 a 500 ppb mientras que a los 20 días presentó cerca de 3,000 ppb, no siendo así en la dosis alta ya que se mantiene por debajo de 1000 ppb. El Thiabendazol presentó un incremento de aflatoxinas a los 10 y 20 días de almacenamiento en la dosis baja con una producción de 500 ppb a 3,000 ppb, en cambio para la dosis alta se incrementó de 500 a 5,300 ppb a los 10 y 20 días lo que indica que en la dosis alta no tiene efecto alguno en la producción de aflatoxinas al nivel del

20 por ciento de humedad. Para el tratamiento del grano de maíz con Mycotox, éste mostró valores similares en ambas dosis incrementándose a partir de los 10 días, de 500 hasta arriba de 3,000 ppb lo cuál demuestra que el Mycotox no tiene control alguno en ambas dosis y bajo este contenido de humedad en la producción de aflatoxinas. En el tratamiento con Altik, se incrementa la producción de aflatoxinas a partir de los 10 días de 100 hasta 3,000 ppb, en la dosis baja mientras que en la dosis alta se mantiene ligeramente hasta los 10 días y sube a los 20 días hasta, rebasar las 1,000 ppb, lo que indica que a los 10 días tiene buen efecto y mas arriba no. En cambio para el Luprosil NC, éste se mantiene a través de los muestreos en ambas dosis por debajo de 20 ppb, lo cuál indica un buen control en la producción de aflatoxinas en maíz almacenado a 20 por ciento de contenido de humedad.

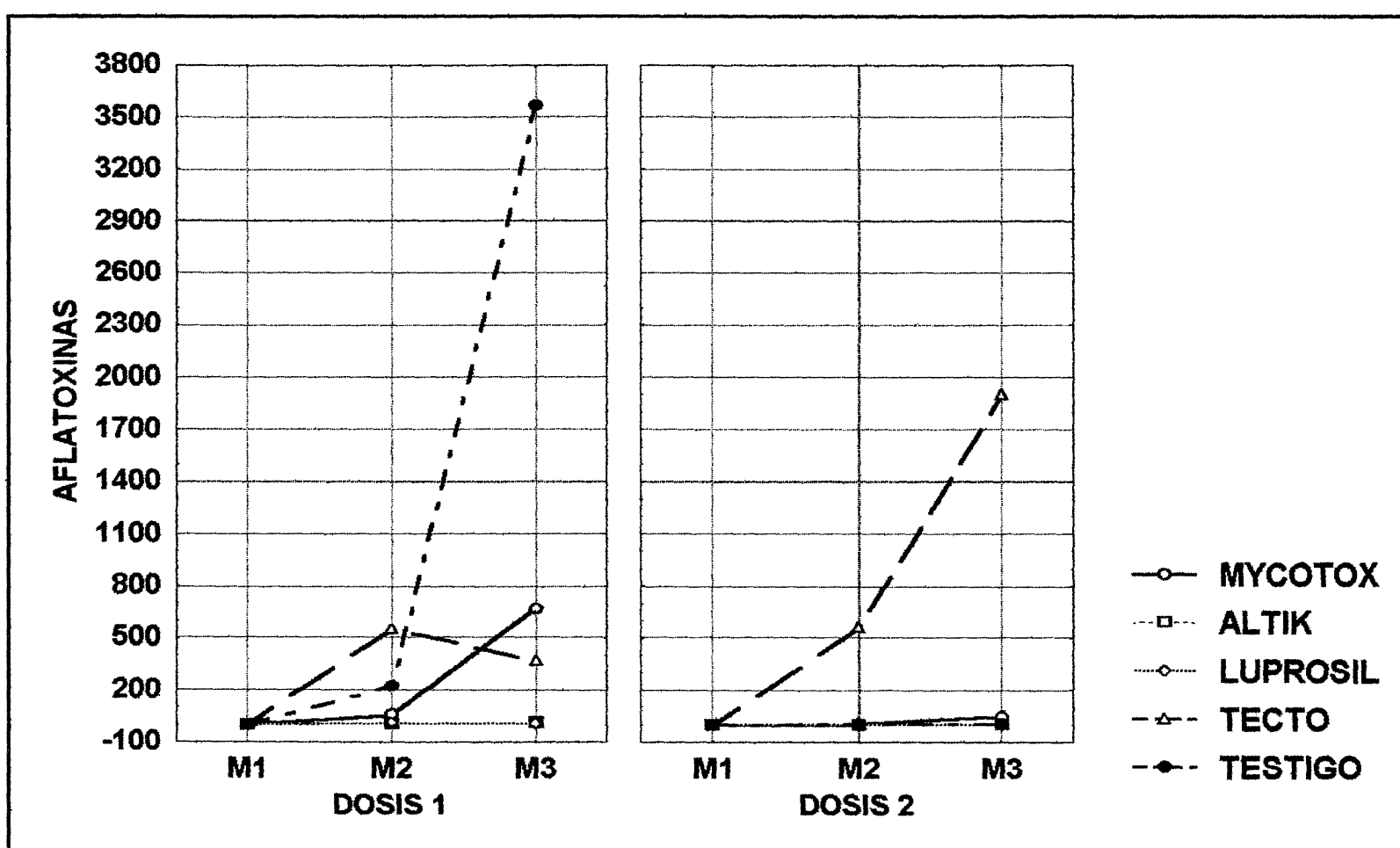


Figura 4.1. Interacción de las dosis de los fungistáticos con los muestreos en la producción de aflatoxinas en maíz con una humedad del 17 por ciento.

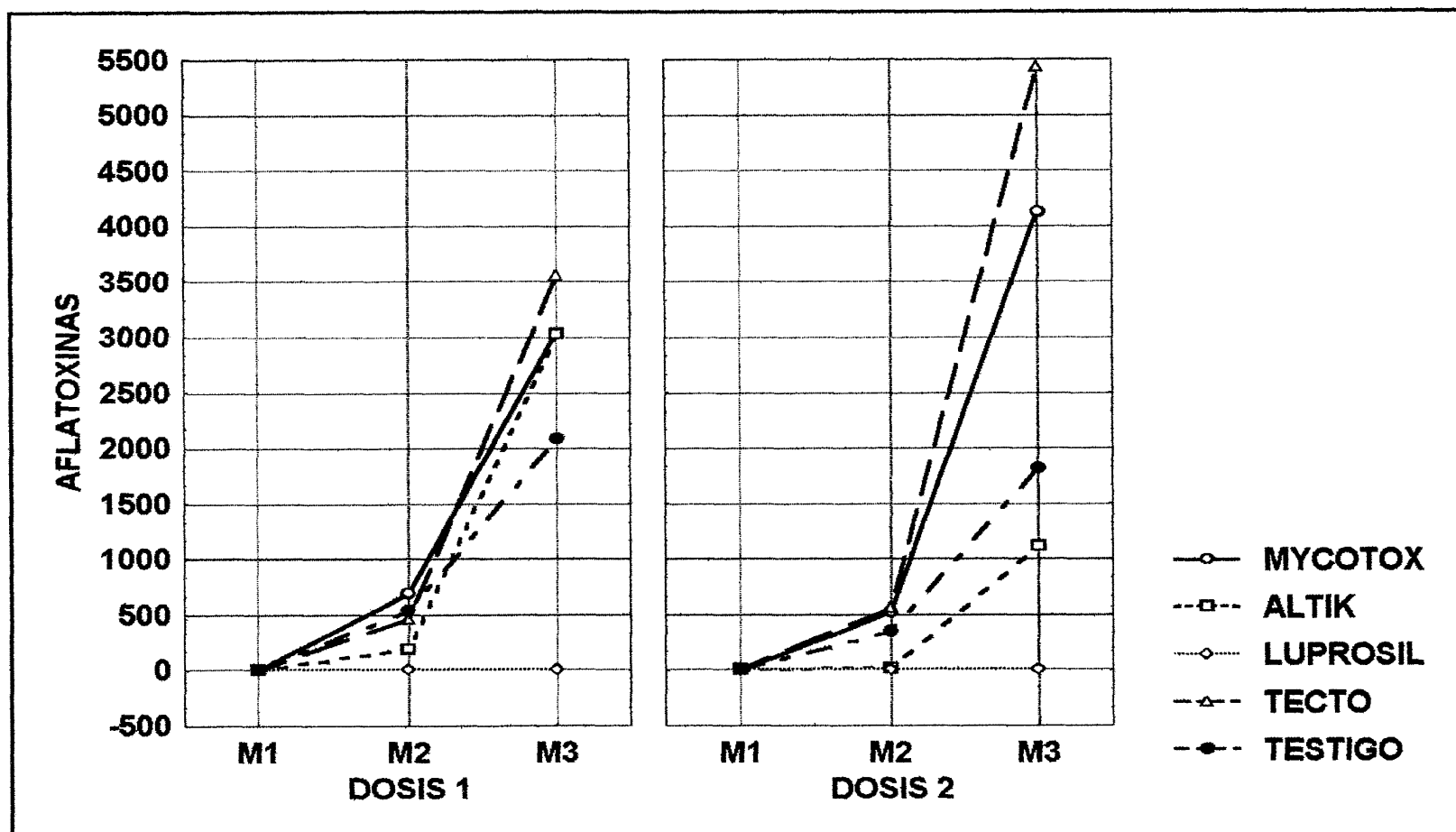


Figura 4.2 Interacción de dosis de los fungistáticos por muestreos en la producción de aflatoxinas en maíz con una humedad del 20 por ciento.

En la Figura 4.3 se presenta la interacción de las dosis de los fungistáticos por muestreos en la producción de aflatoxinas, en donde se observa que el testigo con inóculo se incrementó en todos los muestreos de 0 hasta cerca de 3,000 ppb en la dosis baja a través de los dos contenidos de humedad, mientras que en la dosis alta se incrementó muy poco, no siendo así a los 20 días en donde llegó hasta 900 ppb. El Thiabendazol presentó valores similares durante los primeros dos muestreos incrementándose a los 20 días en ambos niveles de humedad hasta alcanzar valores superando 3,500 ppb en la dosis alta y contenidos de humedad. El Mycotox se comportó con valores muy similares a partir del segundo muestreo en ambas dosis de 350 ppb hasta 2,000, lo que indica que no tiene efecto alguno en estas humedades. Para el

Altik en la dosis baja sube de 100 a 1,500 ppb durante los 10 a los 20 días de almacenamiento, mientras que en la dosis alta se mantiene estable la producción de aflatoxinas durante el muestreo a los 10 días, no siendo así al llegar a los 20 días en donde llega a tener 500 ppb, reflejando así un ligero efecto con esta dosis en ambas humedades, por último el fungicida Luprosil NC es el que presentó mejor efecto en la interacción de todos estos factores, ya que en ambas dosis mostró efectos similares llegando a bajar la producción de aflatoxinas en la dosis alta lo que permite un buen control en la producción de aflatoxinas.

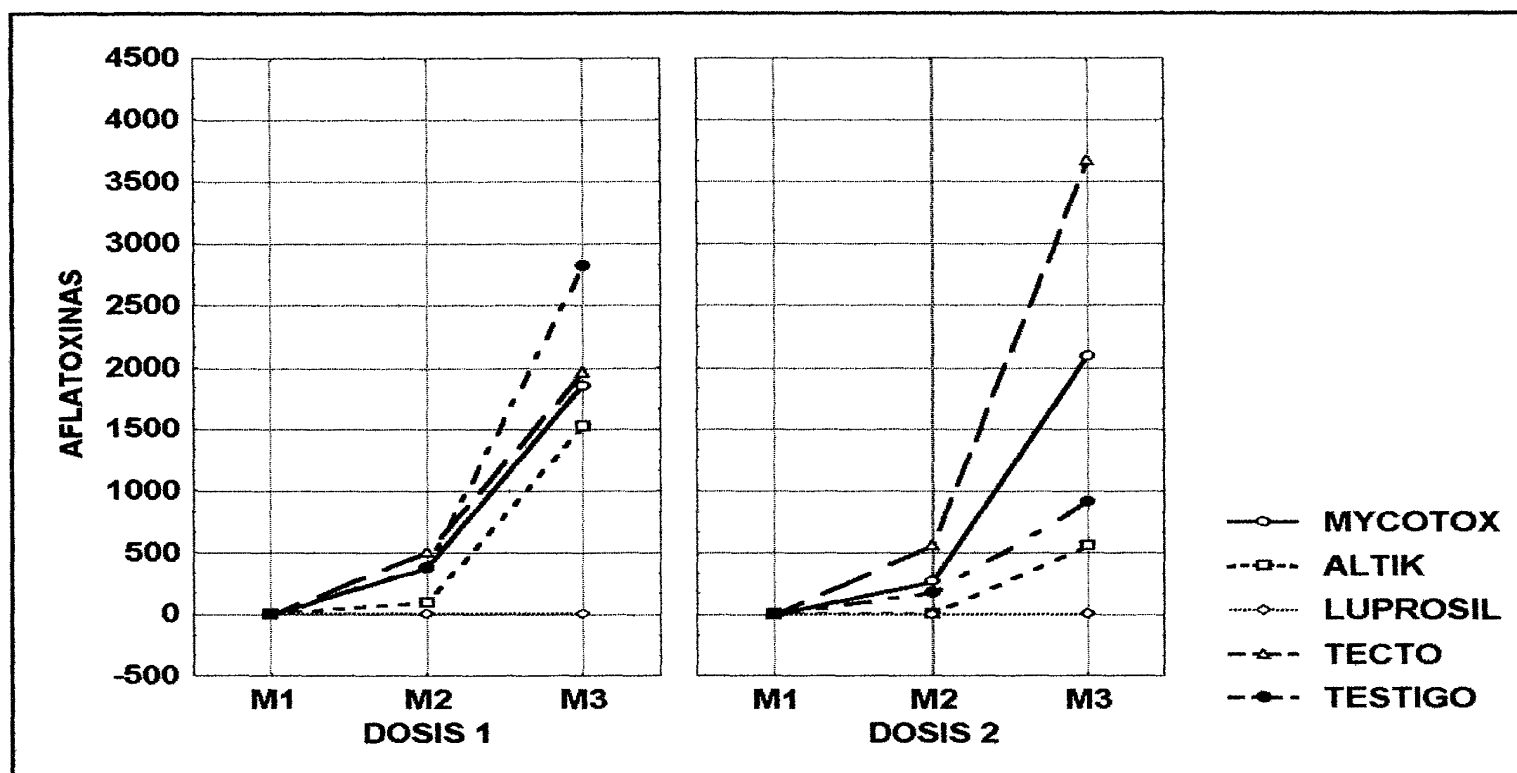


Figura 4.3. Interacción de las dosis por muestreos por fungistáticos en producción de aflatoxinas a través de las dos humedades en grano de maíz.

### Presencia de *Aspergillus flavus*.

Al observar la comparación de medias (Duncan al 0.05) en los dos contenidos de humedad (17 y 20 por ciento), se observaron valores muy similares en la incidencia de *A. flavus* con 10.16 y 10.94 por ciento, lo que indica que las diferencias se mantuvieron con poblaciones estables, como lo

muestra el Cuadro 4.5 con grupos estadísticos muy similares; respecto a los fungistáticos, el Luprosil NC resultó con la cantidad más baja con 1.2 por ciento, seguido del Altik y el Thiabendazol en otro grupo de significancia. El Mycotox presentó la mayor cantidad de *A. flavus*. Al analizar la interacción entre estos dos factores es importante observar que el Luprosil reduce la presencia del hongo de 1.5 a 0.94 por ciento, al igual que el Thiabendazol y el testigo, lo que indica que en el nivel de humedad al 20 por ciento éstos fungistáticos presentaron un buen control.

Cuadro 4.5 Comparación de medias de los fungistáticos y contenido de humedad e interacción en la incidencia de *Aspergillus flavus* en grano de maíz.

FUNGISTATICOS	HUMEDADES				MEDIAS	
	17 por ciento		20 por ciento			
1 Mycotox	17.333	B	21.055	A	19.194	A
2 Altik	3.222	G	9.833	F	6.528	D
3 Luprosil NC	1.500	H	0.944	I	1.222	F
4 Thiabendazol	11.777	E	9.555	F	10.667	C
5 Testigo	17.000	C	13.333	D	15.167	B
MEDIAS	10.167	A	10.944	A		

Valores seguidos por la(s) misma(s) letra(s), no difieren estadísticamente (Duncan), 0.05)

Al evaluar las dosis; la alta resultó con una cantidad menor de incidencia que la baja, con valores de 7.88 y 13.22 respectivamente del hongo *A. flavus*, tal como se observa en el Cuadro 4.6, en donde el Luprosil NC presentó la cantidad mas baja (1.22) comportándose además con la dosis alta una tendencia a bajar la presencia del mismo de 1.44 a 1.00. Mientras que el Altik, Thiabendazol y el Mycotox presentaron la misma tendencia a bajar con la

dosis alta, como el Altik de 9.94 a 3.11, el Thiabendazol de 12.83 a 8.50 y el Mycotox con un 21.00 a 17.38, además el testigo presentó esta tendencia a bajar de 20.88 a 9.44, lo que refleja que la dosis alta fue la mejor para controlar la presencia del hongo.

Cuadro. 4.6. Dosis y fungistáticos e interacción para *Aspergillus flavus* en grano de maíz almacenado.

FUNGISTATICOS	DOSIS		MEDIAS	
	BAJA	ALTA		
1 Mycotox	21.000	17.388	A	B
2 Altik	9.944	3.111	D	G
3 Luprosil NC	1.444	1.000	H	I
4 Thiabendazol	12.833	8.500	C	F
5 Testigo	20.888	9.444	A	E
MEDIAS	13.222	7.889	A	B

Valores seguidos por la (s) misma (s) letra (s), no difieren estadísticamente (Duncan, 0.05)

En el Cuadro 4.7 se presenta la comparación de medias de los muestreos para *A. flavus*, donde se observó que los resultados de las medias para el muestreo a 0 días son de 1.86 para los 10 días, es de 13.46 y a los 20 es de 16.33, lo que nos indica que el hongo se presentó y se desarrollo de acuerdo al avance de los muestreos, por otro lado entre los fungistáticos, el Luprosil NC presentó la cantidad de 1.22 que es muy baja, si lo comparamos con el más alto que fue el Mycotox con 19.19, seguido del Altik con 6.52, el Thiabendazol con 10.66 y por último el testigo con 15.16 con letras estadísticamente diferentes. Por otro lado, el comportamiento de acuerdo a los



muestreos, el Luprosil NC presentó valores de 0.83, 0.41 y 2.41; el testigo bajo a los 20 días de 22.41 a 20.50, no siendo así para el resto de los fungistáticos durante los muestreos, ya que presentaron valores en forma progresiva conforme a los muestreos realizados, indicando con esto que el comportamiento del hongo tiende a ser diferente en los muestreos.

Cuadro 4.7. Comparación de medias de muestreos y fungistáticos e interacción para *Aspergillus flavus* en grano de maíz almacenado.

FUNGISTATICOS	MUESTREOS						MEDIA	
	0		10		20 días			
1 Mycotox	4.333	H	25.166	B	28.083	A	19.194	A
2 Altik	0.583	KL	5.916	G	13.083	F	6.528	D
3 Luprosil NC	0.833	IK	0.416	L	2.416	I	1.222	E
4 Thiabendazol	1.000	J	13.416	F	17.583	E	10.667	C
5 Testigo	2.583	I	22.416	C	20.500	D	15.167	B
MEDIA	1.867	C	13.467	B	16.333	A		

Valores seguidos por la (s) misma (s) letras (s), no difieren estadísticamente (Duncan, 0.05)

En la Figura 4.4, se puede observar que la interacción de factores en la humedad al 17 por ciento, existe un comportamiento del testigo al incrementarse la presencia de *Aspergillus flavus* en la dosis baja de 9.0 por ciento a los cero días, mientras que a los 10 días presentó 30 por ciento, mostrando una tendencia a mantener este nivel de los 10 a los 20 días, sin embargo en la dosis alta mostró un comportamiento muy similar de los cero a los 10 días, no siendo así de los 10 a los 20 días. El Mycotox llegó al 30 por ciento en la dosis baja al tercer muestreo mostrando con esto un comportamiento similar al testigo, no siendo así en la dosis alta ya que del cinco por ciento en los cero días llegó a los 10 con un 14 por ciento pasando

se redujo de uno a menos de uno por ciento y se incrementó al 2.2 por ciento durante los tres muestreos reflejando un buen control de *Aspergillus flavus* con las dos dosis y bajo este contenido de humedad, ya que fue el que mostró los valores más bajos durante el experimento.

En la Figura 4.5 se puede apreciar que el Mycotox presentó resultados muy similares para el contenido de humedad al 20 por ciento a través de los tres muestreos en ambas dosis ya que de 4.0 en el primer muestreo se incrementa al 30 por ciento siguiendo una línea horizontal hasta los 20 días, lo que indica que no existe control alguno de las dos dosis para el hongo, en cambio, el testigo presentó un comportamiento de 1.0 al 25 por ciento y de ahí pasa al 30 por ciento de los cero a los 10 y 20 días, en cambio en la dosis alta parte de 0.0 llegó al cinco y sube hasta 17.5 por ciento, lo que podría ser debido a que en esta dosis el testigo podría tener cantidades muy bajas del hongo. En el caso del Thiabendazol este parte de 0.2 por ciento y llega hasta un 24 y baja al 17 por ciento a los 10 y 20 días de almacenamiento presentando una ligera inhibición del hongo, en cambio en la dosis alta, el valor más alto es de un 13 por ciento a los 20 días, lo que indica que existe buen efecto en los muestreos realizados ya que los valores fueron relativamente bajos. Para el Altik presentó un valor de cero al 18 por ciento y tiende a subir al 30 por ciento, no presentando efecto alguno en la dosis baja, por otro lado, en dosis alta su efecto fué más marcado ya que se mantiene hasta en uno por ciento en los dos muestreos y sube a los 20 días con 8.6 por ciento siendo más funcional en esta

dosis. Por último el Luprosil NC baja ligeramente del cero por ciento a los 10 días y de los 20 hasta un cuatro por ciento en la dosis baja y en la dosis alta se mantiene igual hasta los 10 días y a los 20 días tres baja la presencia del hongo al cero por ciento, presentando un buen control.

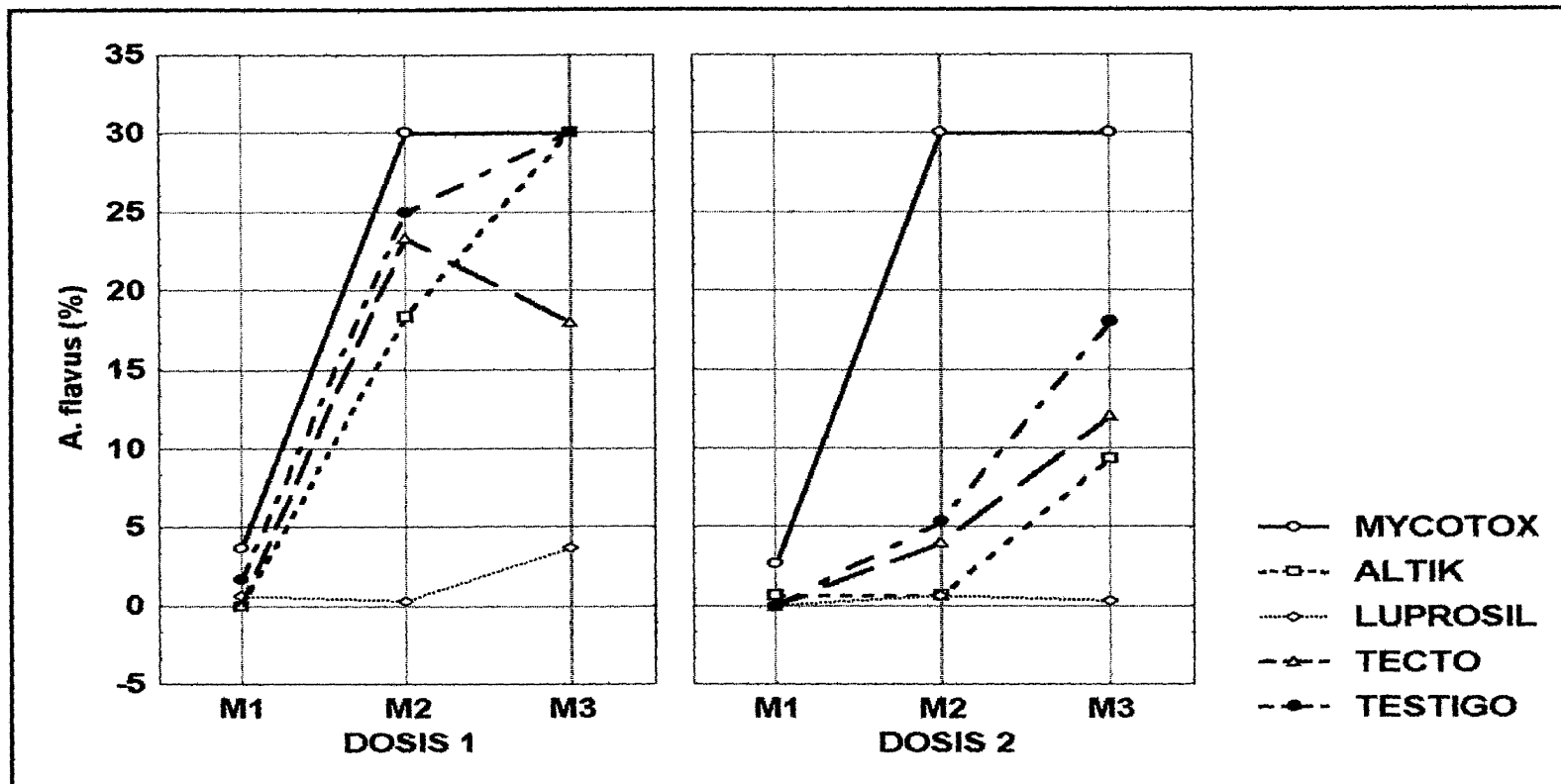


Figura 4.5. Interacción de las dosis por muestreo por fungistáticos en la humedad del 20 por ciento para *A. flavus* en grano de maíz

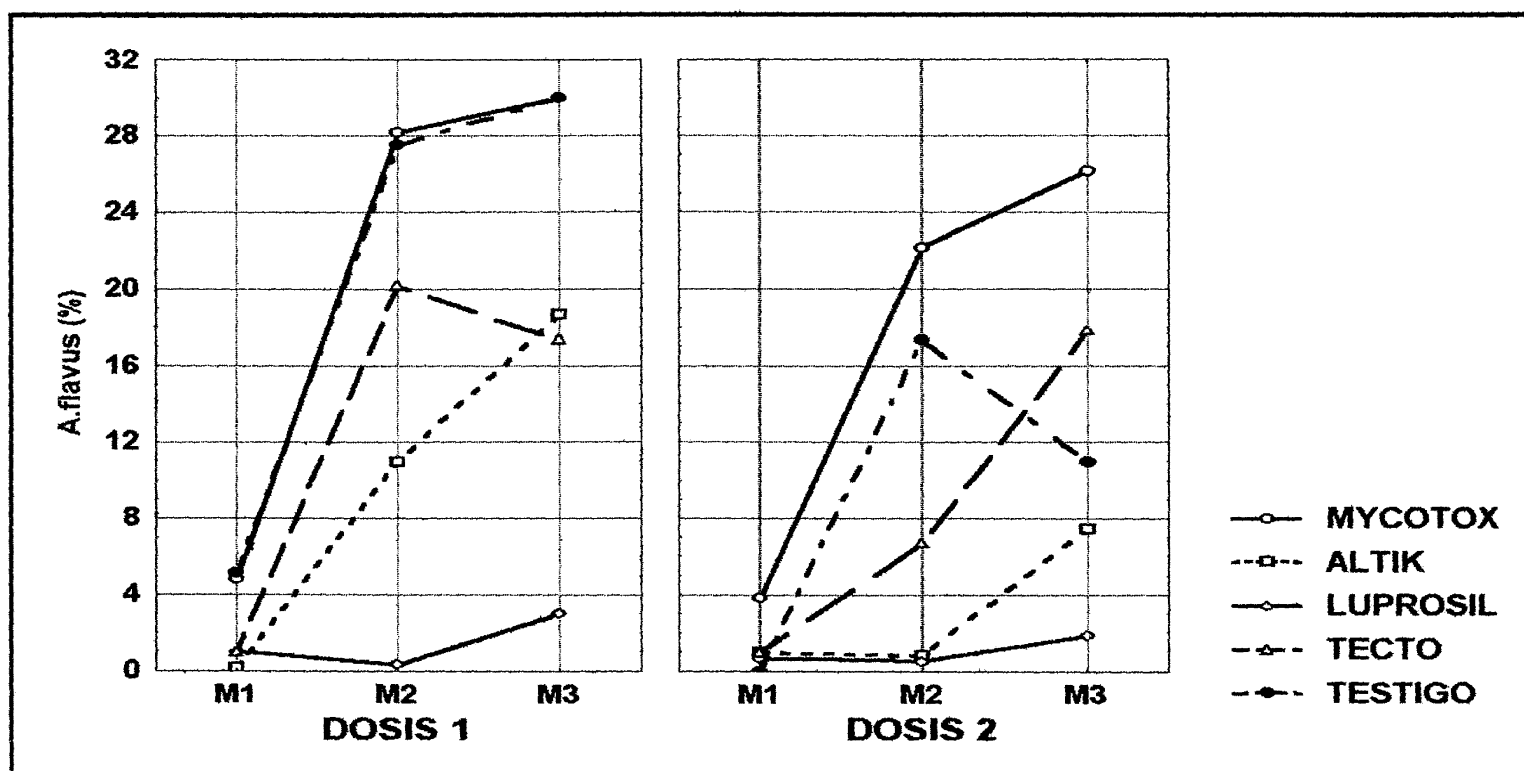


Figura 4.6. Interacción de dosis por muestreo por fungistáticos a través de las dos humedades del 17 y 20 por ciento en grano de maíz almacenado.

Para la interacción de las dosis por los muestreos por fungistáticos a través de las dos humedades, el Mycotox en la dosis baja mostró un comportamiento a través de los tres muestreos a incrementar la presencia del hongo como se puede apreciar en la Figura 4.6, ya que de un 5 por ciento a los 0 días se eleva al 28 por ciento a los 10 días y sube a un 30 por ciento a los 20 días, en cambio en la dosis alta de un 4 por ciento sube a un 22 a los 10 días y a los 20 días se eleva hasta un 27 por ciento, lo que indica que en esta última dosis mostró un ligero efecto. El testigo mostró un resultado similar en la dosis baja al Mycotox en los tres muestreos al llegar a un 30 por ciento a los 20 días, no siendo así en la dosis alta ya que a los 20 días se eleva de 0 por ciento a un 17 y baja hasta un 11 por ciento a los 20 días, lo que indica que en la dosis baja se eleva la cantidad del hongo debido a que estaba inoculado y en la dosis alta posiblemente a la muestra del grano que haya presentado alta cantidad del hongo. Por otro lado el Thiabendazol en la dosis baja se elevó de un 1 al 20 por ciento a los 10 días, bajando ligeramente al 17 por ciento a los 20 días, esto puede indicar que es más efectivo de acuerdo al incremento del tiempo de muestreos. En la dosis alta no se incrementa a los mismos niveles, ya que sube a un 7 por ciento a los 10 días y se eleva aún más a un 18 por ciento a los 20 días, esto indica que la cantidad de inóculo presente es definitiva para que este producto ejerza un buen efecto en los muestreos realizados. En el caso del Altik, éste presentó un valor de 11 por ciento a los 10 días, subiendo aún más al 19 por ciento a los 20 días, no presentando

efecto alguno con esta dosis en los tres muestreos realizados, en cambio en la dosis alta se mantiene estable con valor del uno por ciento hasta los 10 días, subiendo al siete por ciento a los 20 días, esto refleja que la dosis alta es la adecuada para que se pueda observar un buen control. Por último, el Luprosil NC en su dosis baja, baja la presencia del hongo del uno a 0.3 por ciento subiendo a los 20 días a un tres por ciento, valor que no es significativo, comportamiento similar mostró en la dosis alta, sólo que se incrementó a los 20 días subió a un valor del dos por ciento mostrando un efecto muy importante, éste tratamiento fue el más efectivo para inhibir la presencia del hongo bajo los dos contenidos de humedad y a través del tiempo de los muestreos, resultados similares fueron encontrados por Moreno *et al*.,(2000), en donde la presencia de *A. Flavus* se redujo del tres al dos por ciento a los 10 y 20 días de almacenamiento.

## CONCLUSIONES

- -El Luprosil NC , presentó buen control de *Aspergillus flavus* (Link) y la producción de aflatoxinas en dosis de 5.5 y 7.5 kg/ton. en grano de maíz almacenado a contenidos de humedad del 17 y 20 por ciento, con un nivel de aflatoxinas de 2.1 ppb, permitido que el grano de maíz sea destinado para consumo humano.
- -El Altik a dosis de 1.5 y 2.5 kg/ton inhibe la presencia de *Aspergillus flavus* (Link) a contenidos de humedad del 17 y 20 por ciento y en la producción de aflatoxinas rebasa los límites aceptables de 20 ppb.
- -El thiabendazol en grano de maíz con humedades del 17 y 20 por ciento en ambas dosis no presentó un control favorable para *Aspergillus flavus* (Link) y la producción de aflatoxinas, al igual que el Mycotox.
- La mayor producción de aflatoxinas en grano inoculado con 5,000 conidios/ml. se dio a humedades del grano con 20 por ciento y de los 10 a los 20 días de almacenado el grano con una temperatura de 27°C, de 277.5 a 1,868.25 ppb.

## RESUMEN

Se evaluaron cuatro fungistáticos a base de ácido propiónico para ver el efecto sobre la presencia de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas, cada uno con dos dosis (alta y baja), además de dos testigos en grano de maíz almacenado durante 20 días, el cual se inoculó con una suspensión de 5,000 conidios/ml de una cepa productora de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* (Link) con dos contenidos de humedad (17 y 20 por ciento) y una temperatura de 27 ° C. Los fungistáticos fueron: Mycotox, Altik, Luprosil NC y Thiabendazol.

Para la presencia de *Aspergillus flavus* (Link), el Luprosil NC presentó la incidencia más baja, reduciendo además su presencia de 1.5 a 0.94 por ciento, el Altik siguió al Luprosil NC con 6.52. El Thiabendazol redujo de 11.77 a 9.55 por ciento, no siendo así para el Mycotox quien superó al testigo con 19.19 y 15 por ciento respectivamente, siendo la dosis alta la más efectiva que la baja, el Luprosil presentó la población más baja durante los muestreos inhibiendo al hongo, no siendo igual para el resto, ya que presentaron una tendencia a incrementarse progresivamente. La humedad del 20 por ciento

permite inhibir el desarrollo de *Aspergillus flavus* (Link) siendo el Luprosil NC el que mejor funciona, el Thiabendazol y Mycotox no presentaron efecto alguno sobre la incidencia del hongo, mientras que el Altik presentó un buen control en la dosis alta.

En la producción de aflatoxinas, el Luprosil NC presentó el valor más bajo con 2.1 ppb, Altik con 364.1, el testigo fue superado por el Mycotox con 762.7 y el Thiabendazol con 1114.7 ppb, en la interacción, el Luprosil reduce la producción de aflatoxinas de 2.33 a 1.94 ppb en la humedad del 20 por ciento.

El Luprosil NC fue el mejor fungistático para inhibir la presencia de *Aspergillus flavus* con un tres por ciento y la producción de aflatoxinas con 2.1 ppb en dosis de 5.5 y 7.5 kg/ton en humedades del 17 y 20 por ciento.



## LITERATURA CITADA

- Acosta N. S. 1994. Antecedentes históricos e importancia de la contaminación con aflatoxinas. Memoria I curso taller sobre aflatoxinas en maíz, Río Bravo Tamps. , México. pp 3-8
- Agrios N.G. 1991. Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. London.. pp. 408-409
- Chovrasia H.K. 1992. Control of aflatoxin production with fungicides. Nat. Acad. Sci. Letters, vol. 15, No 8 1992 pp.243-246
- Diener, U.L. and N.D. Davis. 1987. Biology of *Aspergillus flavus* y *A. Parasiticus* in maize. In: M.S. Zuber, E.B. Lillehoj and B.L. Renfro, eds. Proceedings of Workshop CIMMYT, April 1986. El Batan. México. pp. 33-40
- Duffus C. y C. Slaughter. 1992. Las Semillas y sus Usos 1ª-Reimpresión. A.G.T. Editor, S.A. México D.F. pp. 82-84
- Eley R.A. 1992. Intoxicaciones Alimentarias de Etiología Microbiana 1ªEdición. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 93,94-100
- Gatica V.M., Navarrete M.R., Rosas M.R., Reyes y Reyes C..A. 1992. Patogenicidad *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare, en Precosecha de Maíz. Memorias XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Saltillo, Coah, pp 147.
- Gatica V.M. Reyes M. A.C. Hernández A. M y Rosas R.M 1995. Uso de Fungicidas para la reducción de Aflatoxinas en Maíz, en Tamps. México. Memorias XXLL Congreso Nacional Fitopatología, Guadalajara, Jalisco. México, R. 24
- Ghosh, J. And Haggblom, P. 1985. Effect of sublethal concentrations of propionic or butyric acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus Flavus*. International Journal of food Microbiology. 2.6 pp. 323-330

- Guthrie, W.D., Bockholt, A.J., Manwiller, and M.D. Jellum. 1977. Cereal Chemistry. 54(4): 770-778.
- Montes B.R. Carvajal M.M. y Figueroa B.R. 1995. Extractos acuosos de plantas silvestres para el control de *Aspergillus flavus* en maíz. Memorias XXLL Congreso Nacional de Fitopatología, Guadalajara Jalisco, México. R.82
- Moreno M.E. 1988. Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados 1ª- Edición, Editorial de la UNAM. México D.F. pp. 10,25,31,41,63
- Moreno M.E. 1989 Formación de variedades resistentes: Una alternativa para reducir la producción de aflatoxinas. Revista ACOGRANOS, año 5(7) Bogotá, Colombia. pp. 35-39
- Moreno M. E. 1993. Tratamiento Químico de las semillas para el combate de los hongos 1ª-Edición UNAM. México D.F. pp. 56-57-58
- Moreno M. E., Navarrete M.R., Vázquez B.M.E. y Rodríguez A. 1992. Producción natural de aflatoxinas en diferentes genotipos de maíz cultivados en el Norte de Tamaulipas. Revista Mexicana de Fitopatología. 10: 161-165.
- Moreno, M.E., B.M.E. Vázquez y F. Facio P. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. Agrociencia. V. 34 N° 4, pp. 477-484.
- López J. M. Carvajal M. And B. Ituarte. 1995. Supervising Programme of aflatoxins in Mexican corn. Food Additives and Contaminants. Vol. 12, No-3 pp.297-312
- Ortíz C. A. 1992. Manual de procedimientos para el Analisis de Alfatoxinas. ANDSA. México. D.F. pp. 111-121
- Patkar, K.L., Usha, C.M., Shetty, H.S., Paster N and Lacey I. 1991. Modified atmosphere and propionic acid treatment to prevent storage fungi in groundnut. International Arachis Newsletter. No- 10, 20-21
- Pixton, S. W. 1982. The importance of moisture and equilibrium relative humidity in stored products. Tropical Stored Products information. 43:16-29
- Romero C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos 1ª- Reimpresión U.A.CH. México. pp. 294-302

- Shotwell, O. L., Hesseltine, C.W. and Goulden, M.L. 1973. Incidence of Aflatoxin of Southern Corn 1969-1979. *Cereal Science Today*. 18: 142-146.
- Sulaiman, E. D. and Husain, S.S. 1984. Chemical Control of *Aspergillus flavus* y *Penicillium cyclopium* in storage. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 27: 6 pp. 363-365.
- Tanboon E.K. 1988. International Symposium on Tropical Agriculture Research: Crop losses due to disease outbreaks in the tropics and countermeasures. Kyoto (Japan). 25-27 Aug.
- United States Department of Agriculture (USDA). 1976. Grain Experimental Manual G.R. 916-6 Federal Grain Inspection. Service Standardization Division, Richards-Debauer AFK, Kansas City, Mo.