



(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **14/09/2005** (51) Int. Cl. 7: **A01N 65/00, A23B 09/00**
(22) Fecha de presentación: **12/03/2004**
(21) Número de solicitud: **PA04002361**

(71) Solicitante:
**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N.
Av. I.P.N., 2508 07360 Distrito Federal MX**

(72) Inventor(es):
**GLORIA LAURA ANGUIANO RUVALCABA
Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-Leon,
Apartado Postal 629 Irapuato Guanajuato 36500 MX**

(74) Representante:
**MARTHA FIGUEROA PEREZ
Av. Instituto Politecnico Nacional numero
2508 Distrito Federal 07360 MX**

(54) Título: **METODO PARA CONTROLAR LA CONTAMINACION DE GRANOS POR HONGOS O MICOTOXINAS
MEDIANTE EL ACIDO NAFTALEN ACETICO.**

(54) Title: **METHOD FOR CONTROLLING GRAIN CONTAMINATION BY FUNGI OR MYCOTOXINS USING
NAPHTHALENEACETIC ACID.**

(57) Resumen

La presente invencion describe un metodo para controlar e inhibir el crecimiento, esporulacion y sintesis de micotoxinas por hongos en granos mediante el acido naftalen acetico, asi como cualquiera de sus sales. El metodo permite un control e inhibicion eficientes en la produccion de micotoxinas en granos basicos (maiz, trigo, arroz, sorgo, soya etc.) y granos de oleaginosas (cacahuete, nueces, pistaches, pinones, macadamia), tanto en su produccion, como en su almacenamiento, procesamiento y transportacion, sin alterar las propiedades del alimento.

(57) Abstract

The present invention describes a method for controlling and inhibiting growth, sporulation and synthesis of fungi mycotoxins in grains by naphthaleneacetic acid or any salt therefrom. The method effectively controls and inhibits the mycotoxins production in basic grains (corn, wheat, sorghum, soy, etc) and oleaginous grains (peanut, nuts, pistachios, pine nuts, macadamia), thereby preventing the same from the production, store, process and transportation of mycotoxins without altering the food properties.

Método para controlar la contaminación de granos por hongos o micotoxinas mediante el ácido naftalén acético.

Campo de la Invención.

- 5 La presente invención se relaciona con la conservación de alimentos almacenados, específicamente con el desarrollo de métodos para evitar y controlar la contaminación de granos por hongos ó micotoxinas.

Antecedentes de la invención.

- 10 Los alimentos en general durante su producción, almacenamiento y procesamiento se ven contaminados por microorganismos que pueden causar pérdidas importantes en la producción agrícola, ya sea por causar directamente enfermedades o por producir sustancias tóxicas llamadas micotoxinas que permanecen en el alimento. Dichas sustancias al ser ingeridas por los organismos superiores a través de los alimentos
- 15 contaminados, son capaces de inducir una reacción tóxica, cáncer o incluso la muerte.

A pesar de que se han descubierto alrededor de 200 micotoxinas hasta hoy, son realmente pocas las que se han encontrado en forma natural contaminando los alimentos. Estas micotoxinas son Aflatoxina B y G, Ochratoxinas, Zearelenona, Fumonosinas,

20 Vomitoxinas y toxinas tremorgénicas. Todas ellas tienen actividad tóxica en animales de granja, y representan un riesgo potencial para el hombre, sin embargo la aflatoxina B se ha reportado como la sustancia más cancerígena encontrada en la naturaleza. Las aflatoxinas B y G son producidas por algunas especies de hongos del género *Aspergillus* como son *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*. Estos hongos se encuentran

25 tanto en suelo como en el aire y contaminan a los granos de cereales y oleaginosas, así como a los alimentos en fase de procesamiento ó de almacenamiento fabricados con ellos. Cuando las condiciones de temperatura (28°-30°C) y humedad relativa (+80% RH) son propicias, los hongos crecen abundantemente y producen dichas toxinas, las cuales permanecen en los productos alimenticios.

30

Desde el descubrimiento de las micotoxinas se han realizado numerosos esfuerzos por encontrar métodos de control de crecimiento del hongo y de síntesis de éstas, debido

principalmente a la alta correlación positiva que se ha encontrado entre cáncer hepático en seres humanos y consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas.

Algunas de las estrategias que se han utilizado hasta hoy para el control de la contaminación por micotoxinas en granos han consistido en prevenir la contaminación o controlar a los hongos productores de micotoxinas en alimentos manipulando su ambiente, y en reducir la concentración de las micotoxinas a niveles bajos, "seguros" o degradando las micotoxinas a compuestos no tóxicos sin reducir el valor nutricional de los alimentos tratados.

10

Debido a lo anterior, los métodos de control han estado dirigidos a la prevención de la contaminación y crecimiento de los hongos productores de micotoxinas en los alimentos o bien a la detoxificación del grano o producto alimenticio.

15 Dentro de los métodos para prevenir la contaminación y crecimiento de los hongos se encuentran los siguientes:

- a) Manejo agrícola, como lo es la utilización de semilla no contaminada, control de insectos, riego, tiempos tempranos de siembra, etc.;
- b) El uso de agentes antifúngicos como son: óxido de propileno, ácido propiónico y ácido sórbico. Se ha intentado usar otros compuestos como insecticidas y herbicidas, sin embargo ambos compuestos incrementan la cantidad de aflatoxina producida en el campo;
- c) Selección de variedades vegetales resistentes a la síntesis de aflatoxinas por medio de mejoramiento tradicional o por transformación genética, y
- 25 d) Buenas condiciones de almacenamiento (baja humedad, baja temperatura, limpieza).

Los métodos para detoxificar involucran degradación, destrucción o inactivación de las micotoxinas presentes en los alimentos por medios físicos, químicos o biológicos. En éste sentido, los métodos hasta ahora implementados utilizan:

- 30 • Extracción con solventes, donde el material tratado con este método puede ser usado solo para alimento animal;

- Inactivación por calor, donde la temperatura debe ser de cerca de 250°C para inactivar efectivamente a las micotoxinas debido a su estabilidad al calor. La humedad presente en el producto puede ayudar efectivamente a la degradación por calor y se ha observado que las aflatoxinas se destruyen en un rango de 45 a 85%. Sin embargo, este método no es económicamente viable y además altera el valor nutritivo de los alimentos;
- Irradiación con luz ultravioleta o rayos gamma, donde los resultados han sido negativos ya que los alimentos así tratados han resultado ser más tóxicos;
- Absorbentes como los aluminosilicatos que absorben solo el 10% de la aflatoxina presente;
- Productos químicos como ácidos, bases, agentes oxidantes, aldehídos y gases bisulfitos. Los ácidos destruyen a las aflatoxinas así como también al alimento. El hidróxido de sodio se utiliza para obtener aceites refinados libres de aflatoxinas y reduce muy poco el nivel de aflatoxinas. Los aldehídos y amonios se han utilizado, sin embargo aumentan la producción de malos olores y sabores en el producto haciéndolo inservible para consumo humano y animal. El hidróxido de calcio (cal viva) de aplicación limitada al maíz de consumo humano y con desventajas tecnológicas, es utilizado solo durante la nixtamalización tradicional y destruye hasta el 90% de la aflatoxina presente en el maíz, obteniéndose un producto agradable y aceptable para consumo humano como es la tortilla, y
- Bacterias, Actinomycetes, levaduras, algas y otros hongos como *A. niger*, *A. mucor* y *A. rhizoopus*.

En general se reconoce que para que un método sea exitoso en el control de contaminación por micotoxinas, éste debe económico, capaz de eliminar las trazas de toxina, no dejar residuos tóxicos y no alterar la calidad nutricional de los alimentos.

Sin embargo, actualmente el control del crecimiento, esporulación y síntesis de las micotoxinas por hongos en granos básicos y alimentos procesados no ha sido exitosa. Algunos compuestos como los fungicidas o herbicidas retardan el crecimiento del hongo pero no evitan la síntesis de las micotoxinas; compuestos químicos como el sulfato de

amonio, la cal y el hidróxido destruyen a las micotoxinas presentes pero también alteran la calidad y propiedades de los alimentos.

De igual manera los métodos utilizados hasta ahora no presentan ninguna ventaja durante el almacenamiento de los granos básicos o de los alimentos procesados ya que al no tener ningún efecto sobre el crecimiento y esporulación del hongo, este puede iniciar el proceso de síntesis de micotoxinas cuando las condiciones de temperatura y humedad sean adecuadas. Así mismo los métodos que utilizan diversas sustancias químicas con la finalidad de lograr el control y la inhibición del crecimiento, esporulación y síntesis de micotoxinas por hongos micotoxigénicos, aumentan el costo de producción y procesamiento de los granos básicos y oleaginosas, aunado al hecho de que no son del todo efectivos.

Hasta antes de la presente invención no se había utilizado alguna hormona de plantas, así como algún regulador de crecimiento de plantas para controlar e inhibir el crecimiento de hongos productores de micotoxinas.

Breve descripción de las figuras.

Figura 1. Se observa el efecto de baja concentración de ácido naftalén acético sobre la germinación de esporas de *A. parasiticus*. Los datos mostrados representan la media de dos repeticiones. Se muestra el tiempo de observación (hrs.).

Figura 2. Se observa el efecto de alta concentración de ácido naftalén acético (ANA) sobre la germinación de esporas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Figura 3. Se observa el efecto de alta concentración de ácido naftalén acético (ANA) sobre el proceso de germinación de *A. parasiticus* durante una incubación de 2 a 6 horas. Se distinguen esporas hinchadas (H), germínulas (G) y esporas no hinchadas (NH).

Figura 4. Se observa el efecto de alta concentración de ácido naftalén acético (ANA) sobre el proceso de germinación de *A. parasiticus* durante una incubación de 8 a 12 horas. Se distinguen esporas hinchadas (H), germínulas (G) y esporas no hinchadas (NH).

Figura 5. Se observa el efecto de alta concentración (2M) de ácido naftalén acético (ANA) en solución sobre el nivel de aflatoxina y en las unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos mostrados representan la media de cinco repeticiones. Para este experimento el nivel basal de aflatoxina en maíz fue de 25.46 $\mu\text{g}/50\text{g}$.

Figura 6. Se observa el efecto de alta concentración (2M) de ácido naftalén acético (ANA) aplicado en polvo sobre el nivel de aflatoxina y en las unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos mostrados representan la media de cinco repeticiones, realizándose la prueba por duplicado. Para este experimento el nivel basal de aflatoxina en maíz fue de 1.35 $\mu\text{g}/50\text{g}$.

Figura 7. Se observa el efecto de baja concentración de ácido naftalén acético (ANA) aplicado en polvo sobre el hongo micotoxigénico *A. parasiticus* y sobre la síntesis de aflatoxina en maíz esterilizado. Los datos mostrados representan cinco repeticiones por tratamiento.

Figura 8. Se observa el efecto de alta concentración de ácido naftalén acético (ANA) aplicado en polvo sobre el hongo micotoxigénico *A. parasiticus* y sobre la síntesis de aflatoxina en maíz esterilizado. Los datos mostrados representan cinco repeticiones por tratamiento. El inóculo fue adicionado a 50 g de maíz esterilizado.

Objetivos de la invención.

Teniendo en cuenta los defectos de los métodos de control mencionados, es uno de los objetivos de la presente invención proporcionar un método para controlar y eliminar eficientemente la germinación, crecimiento, reproducción y esporulación de hongos productores de micotoxinas presentes en granos y en oleaginosas mediante el uso del ácido naftalén acético.

Es otro de los objetivos de la invención proporcionar un método para controlar y eliminar eficientemente la producción de micotoxinas presentes en granos y en oleaginosas mediante el uso del ácido naftalén acético.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención comprende la utilización del ácido naftalén acético para controlar y eliminar eficientemente la germinación, crecimiento, reproducción y esporulación de hongos productores de micotoxinas presentes en granos, así como para el control y
5 eliminación de la producción de micotoxinas.

El ácido naftalén acético es una hormona vegetal reguladora del crecimiento de plantas cuya utilización actualmente está confinada al cultivo de tejidos.

10 En contraste con los inconvenientes que presenta el uso de sustancias químicas para controlar la producción de micotoxinas, el método de la presente invención inhibe de manera eficiente el crecimiento del hongo productor de micotoxinas así como la germinación de sus esporas y su reproducción, inhibiendo con ello la síntesis de micotoxinas sin alterar la calidad alimenticia de los granos y oleaginosas así como de los
15 alimentos obtenidos con éstos. Aunado a lo anterior, el ácido naftalén acético no resulta ser tóxico para el consumidor en comparación con sustancias químicas que tienen una toxicidad elevada, alterando con ello la calidad y sanidad de los alimentos y su sabor; así mismo las sustancias químicas permiten que se sinteticen micotoxinas en los granos y oleaginosas debido a que inhiben solo de manera parcial el crecimiento de los hongos.

20

El método de la invención permite la inhibición del crecimiento de hongos productores de micotoxinas en aquellos granos que puedan contaminarse con los mismos. A manera de ejemplo y sin estar limitado a ello, se pueden mencionar granos de cereales tales como maíz, sorgo, arroz, trigo y otros, así como de oleaginosas tales como cacahuate, nuez,
25 pistache, almendra, piñón, macadamia y otros. Así mismo, el método de la invención puede aplicarse en las diferentes etapas de manejo de los granos, tanto en la producción, como en el procesamiento, transporte y almacenamiento de los mismos.

De manera general, el método de la invención comprende agregar a los granos ácido
30 naftalén acético en una proporción en peso ácido naftalén acético/grano de 1:50 en conjunto con una cantidad mínima de agua y homogeneizar de tal manera que todos los granos queden impregnados del compuesto. El tiempo de exposición del grano al ácido

naftalén acético debe ser el suficiente para evitar el crecimiento del hongo, aunque de 6 a 15 días es suficiente, preferentemente de 6 a 10 días. Los granos así tratados pueden ser almacenados a temperaturas que van desde 27 a 37°C durante varios días sin que presenten contaminación por micotoxinas. El agua mencionada se agrega en un 4% en volumen con respecto del peso del ácido naftalén acético.

En el método de la invención, el ácido naftalén acético puede ocuparse como tal o como cualquiera de sus sales, dentro de las cuales se prefiere la sal de potasio.

- 10 La contaminación de los alimentos por hongos y sus micotoxinas afecta negativamente a la producción agrícola e indirectamente a la salud humana y animal, por lo que la presente invención permitirá controlar y/o reducir la contaminación de los alimentos en cuestión. Sus principales usos serán en la producción agrícola, almacenamiento, procesamiento y transporte (marítimo ó terrestre) de los granos básicos y granos de oleaginosas anteriormente mencionados.
- 15

El método de la invención permite obtener ventajas específicas importantes, tales como las siguientes:

- No permite que las esporas de los hongos micotoxigénicos y no micotoxigénicos germinen y como consecuencia de ello los granos y alimentos procesados no se verán afectados en su calidad. De igual manera los hongos micotoxigénicos no crecerán y por lo tanto no producirán micotoxinas.
 - Detiene el crecimiento de los hongos, es decir que si los granos básicos, oleaginosas o alimentos ya tienen crecimiento fúngico al aplicarse éste, los hongos ya no crecen y en consecuencia no se producen micotoxinas.
 - Evita que el hongo se reproduzca y por lo tanto no habrá esporas. Como consecuencia de ello la población del hongo será muy escasa o nula.
 - El ácido naftalén acético no altera el sabor de los granos, ni de las oleaginosas ni de los alimentos. Así mismo el compuesto tiene una LD₅₀ de 1000 mg, con lo cual no es tóxico. En este aspecto los estudios de inocuidad en pollos de 5 días lo ilustran claramente.
- 20
- 25
- 30

- El método puede ser aplicado a los granos básicos, oleaginosas y alimentos procesados durante el transporte de los mismos.

Como una manera de ilustrar la presente invención, se presentan los siguientes ejemplos, sin que ello limite el alcance de la misma.

Ejemplo 1. Efecto de bajas concentraciones de ácido naftalén acético sobre la germinación de *A. parasiticus*.

Se realizaron experimentos en medios sintéticos y se utilizaron suspensiones de esporas concentradas obtenidas en el laboratorio. En este experimento se utilizaron dos tratamientos: sin adición de ácido naftalén acético para observar el crecimiento normal del hongo y con adición de ácido naftalén acético (1:50) para evaluar el efecto del compuesto. Los experimentos de germinación se realizaron de la siguiente manera: a cada 25 ml de medio contenidos en matraces de 250 ml se les adicionó una suspensión de esporas de *A. parasiticus* con una concentración de 2.5×10^7 esporas /ml.

Los tratamientos en este experimento fueron:

Control	Medio con esporas sin ácido naftalén acético (sal de potasio del ácido naftalén acético)
50mM	medio + 0.2804g de ácido naftalén acético + esporas
100mM	medio + 0.5608g de ácido naftalén acético + esporas

El ácido naftalén acético se adicionó al mismo tiempo que el inóculo y se incubaron en agitación a 30°C. Se realizaron observaciones y cuenta de las esporas a las 5, 19 y 24 hrs. de incubación. Los resultados pueden observarse en la figura 1.

Ejemplo 2. Efecto de alta concentración de ácido naftalén acético en otros hongos toxigénicos.

Un experimento similar al del ejemplo 1 se realizó utilizando inóculo de *Fusarium* (10×10^7 esporas/ml), *Penicillium* (30×10^7 esporas/ml) y otros *Aspergillus* (*A. flavus* 33×10^7 esporas/ml, *A. nidulans* 21×10^7 esporas/ml, *A. parasiticus* 5×10^7 esporas/ml), todos ellos productores de micotoxinas con concentraciones de 1M y 2M de ácido naftalén acético y las observaciones se realizaron a las 3, 6 y 21 hrs.

Durante todos los tiempos las esporas de *A. parasiticus* permanecieron hinchadas, las de *A. flavus*, *A. nidulans* y *Penicillium* no sufrieron ningún cambio, permaneciendo tal como fueron inoculadas. De igual manera se comportaron las esporas de *Fusarium*.

Estas observaciones indican que el compuesto ácido naftalén acético en altas concentraciones inhibe la germinación de las esporas de hongos micotoxigénicos.

Ejemplo 3. Efecto del ácido naftalén acético sobre la germinación de esporas de *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Se repitió el experimento del ejemplo 2 con inóculo de *A. flavus* y *A. parasiticus* y se usó una solución 1M de ácido naftalén acético. En este experimento las observaciones se realizaron 8:30 hrs. después de haber puesto las esporas en contacto con la solución de ácido naftalén acético y se contaron las germínulas (primer estadio de la germinación). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2, los cuales confirman el efecto inhibitorio de altas concentraciones de ácido naftalén acético en la germinación de las esporas.

15

Ejemplo 4. Efecto de ácido naftalén acético en el proceso de germinación.

Se realizó otro experimento utilizando ácido naftalén acético 100mM, en *A. parasiticus* con una concentración de inóculo de 1.4×10^7 esporas/ 25 ml de medio y se tomaron alícuotas para realizar observaciones y conteos cada 2 hrs. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3 y 4.

Los resultados de este experimento indican que el primer paso del proceso de germinación (hinchamiento de la espora) no se ve inhibido en hasta 5 ó 6 veces el tamaño de la espora. De cada 100 esporas solo 3 no se hinchan, 5% tienen el primordio de germinación y el 92% se hinchan hasta 5 u 8 veces su diámetro (figura 3).

25

Ejemplo 5. Efecto de altas concentraciones de las sales de potasio de ácido naftalén acético sobre los diferentes estadios de crecimiento de *A. parasiticus* y los hongos micotoxigénicos.

Debido a que las concentraciones de esporas de los hongos en los granos almacenados pueden llegar a ser muy altas y a que algunas de ellas podrían escapar al efecto inhibitorio del ácido naftalén acético durante la germinación, se determinó el efecto del compuesto a diferentes tiempos de crecimiento del hongo. El proceso de germinación se inicia cuando

30

la espora aumenta su tamaño (2 a 6 hrs.) para luego dar origen a la germínula (micelio) y a partir de allí el crecimiento de ese micelio es exponencial hasta obtener una masa micelial a las 12 ó 14 hrs. de crecimiento.

5 **Bajo nivel de inóculo y 1M de ácido naftalén acético.**

En este experimento se utilizó medio de cultivo líquido (25 ml) en matraces de 125 ml y se inoculó con una suspensión de esporas de *A. parasiticus* de 1×10^7 /ml.

Sin adición de ácido naftalén acético el crecimiento de *A. parasiticus* a diferentes tiempos de incubación fue el siguiente:

- 10
- 2 hrs., las esporas estaban hinchadas,
 - 6 hrs., la germínula tenía de 3 a 6 veces el diámetro de la espora,
 - 8 hrs., las germínulas formaban primordios de colonia,
 - 10 hrs., la germínula aumentó 15 veces el diámetro de la espora hasta formar micelio a 12 hrs. de incubación.

15

Para observar el efecto de ácido naftalén acético sobre el crecimiento de *A. parasiticus* adicionada a diferentes tiempos de germinación, se utilizó una molaridad más baja de 100mM. Los resultados demuestran que el ácido naftalén acético adicionado a:

- las 2 hrs., en donde la espora estaba hinchada, la emisión de la germínula se inhibió,
- 20 • las 6 hrs., el hongo tenía el tubo germinal y al agregarle ácido naftalén acético la germínula inhibe su crecimiento,
- las 10 y 12 hrs., cuando el ácido naftalén acético se agregó, no causó ninguna inhibición sobre el hongo, sin embargo el ácido naftalén acético fue capaz de detener el crecimiento.

25

Cuando se utilizó una molaridad de 1M el efecto a las 2 hrs. de incubación, solo se presentaron esporas hinchadas; a las 6, 8, 10 y 12 hrs. de incubación las esporas seguían hinchadas y fueron incapaces de emitir el tubo germinativo, lo que indicó que en presencia de ácido naftalén acético solo se hinchan las esporas.

30

Ejemplo 6. Efecto de altas concentraciones de sales de potasio de ácido naftalén acético (2M) en solución, aplicado a maíz naturalmente contaminado con aflatoxina y con hongos micotoxigénicos.

Habiendo observado que las altas concentraciones de ácido naftalén acético (100mM, 1M y 2M) inhibían germinación de las esporas y detenían el crecimiento fúngico, se determinó el efecto del compuesto en maíz naturalmente contaminado con aflatoxina y con los hongos micotoxigénicos.

En este experimento se utilizaron dos tratamientos:

10	Control	50g de maíz entero + 2 ml de agua destilada estéril.
	Sol. de ácido naftalén acético	50g de maíz entero (disolver 1g de ácido naftalén acético en 2 ml de agua destilada estéril antes de aplicar).
	Control H (de humedad)	50g de maíz entero + 2 ml de agua destilada estéril.

15 El maíz utilizado fue analizado previamente para determinar el nivel basal de aflatoxinas. Cada tratamiento se realizó con 5 repeticiones. Todos los matraces se incubaron a 37°C durante 6 días. Diariamente se les adicionaron 1 ml de agua destilada estéril para mantener una humedad de 17 – 19%. Después de la incubación se les determinó el nivel de aflatoxina y el número de unidades formadoras de colonias.

20

La aplicación de los tratamientos con ácido naftalén acético se realizó de la siguiente manera: se colocaron 50g de maíz entero en una bolsa de plástico y se adicionó el compuesto (ácido naftalén acético), se agitó vigorosamente hasta que todo el maíz quedó impregnado con el compuesto.

25

Todos los tratamientos con sus repeticiones fueron procesados de la siguiente manera:

Determinación de las unidades formadoras de colonias.

A cada matraz se le adicionan 20 ml de agua destilada estéril y se agita vigorosamente para resuspender las esporas de los hongos presentes. Se toma 1 ml de esta resuspensión de esporas y se pasa a un tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril de este tubo se toma 1 ml y se pasa a otro con la misma cantidad de agua como el

anterior haciendo diluciones de 10^{-1} a 10^{-5} de las cuales solo de la dilución 10^{-3} y 10^{-4} se toma 1 ml y se coloca por duplicado en cajas conteniendo MSA (medio de malta sal agar). Las cajas así sembradas se incuban a 37°C durante 6 días. Se realizan lecturas cada 24hrs y se cuentan las unidades formadoras de colonias a las 24 y 48hrs.

5

Determinación del nivel de aflatoxinas.

Los matraces conteniendo el maíz con los diferentes tratamientos y los 19 ml de agua destilada se les adiciona 5 ml de agua destilada más para obtener un volumen de 25 ml totales de agua destilada, estos junto con el maíz son molidos en una licuadora, de
10 manera individual y la mezcla es transferida a matraces de un litro de volumen para añadirles 25g de tierras diatomáceas y 250 ml de cloroformo. Esta mezcla es agitada en un agitador de muñeca durante 30 min. Esta mezcla se filtra en un embudo Büchner a través de papel Whatman No.1. El filtrado es tratado con 50 ml de una solución de sulfato de amonio saturado, agitado y reposado 15 min. Posteriormente es pasado a un embudo
15 de separación y se recupera la fase clorofórmica, la cual es filtrada a través de un embudo conteniendo alrededor de 10g de sulfato de sodio anhidro. El filtrado obtenido se evapora en baño maría hasta obtener 5 ml. Este concentrado se pasa por columna corta de sulfato de sodio anhidro-sílica gel 60-200mallas-sulfato de sodio anhidro (5:10:15). Después a la columna se le adicionan 5 ml de hexano y estas fracciones se desechan se le adiciona
20 ml de éter etílico y se desecha, para eluir las aflatoxinas se adicionan 5 ml de cloroformo-metanol (98:2) y se colectan en un tubo de ensayo. Esta fracción se evapora hasta sequedad en baño maría y se resuspende con 1 ml de metanol grado espectro. Para cuantificar las aflatoxinas se llevan a un HPLC.

25 La aplicación de ácido naftalén acético 2M en solución al maíz naturalmente contaminado no disminuye los niveles de aflatoxinas ya presentes, sin embargo disminuye las unidades formadoras de colonias en una orden de magnitud (figura 5).

El efecto de ácido naftalén acético se ve afectado negativamente por la cantidad de agua
30 que fue añadida diariamente al grano. El agua añadida diluye el compuesto y entonces los hongos pueden sobreponerse a la acción inhibitoria, dando como consecuencia una alta concentración de aflatoxinas.

Ejemplo 7. Efecto de la alta concentración de la sal de potasio del ácido naftalén acético (2M) en polvo aplicado a maíz naturalmente contaminado con aflatoxinas y con hongos micotoxigénicos.

En este experimento se utilizaron 2 tratamientos

5	Control	50g de maíz entero + 2 ml de agua destilada estéril.
	ácido naftalén acético de en polvo	50g de maíz entero + ácido naftalén acético(1g) + 2 ml agua (2M) destilada.

En este caso el polvo de ácido naftalén acético(1g) fue añadido directamente al grano el cual estaba contenido en una bolsa de plástico. Se mezcla vigorosamente por 2min y el maíz así tratado se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 500 ml de volumen, se añaden únicamente 2 ml de agua y se agita vigorosamente. Los matraces se incubaron a 37°C durante 6 días. Se realizaron 5 repeticiones de cada tratamiento. El número de unidades formadoras de colonias y la determinación del nivel de aflatoxinas se realizó como en el ejemplo 6.

Como se puede observar en la figura 6, el ácido naftalén acético aplicado en forma de polvo y con solo 2 ml de agua en una sola aplicación inicial disminuye la cantidad de aflatoxina presente en el maíz en un 85% y la cantidad de unidades formadoras de colonias. Esta disminución tanto de la aflatoxina como de las unidades formadoras de colonia representa un gran avance, ya que independientemente del mecanismo de acción de ácido naftalén acético el maíz no pierde sus propiedades nutritivas como ocurre con otros procedimientos.

25 Ejemplo 8. Evaluación del efecto de altas concentraciones de la sal de potasio de ácido naftalén acético "in vitro" en maíz esterilizado e inoculado con *Aspergillus parasiticus*.

Estos experimentos fueron realizados para verificar el efecto de las altas concentraciones de ácido naftalén acético sobre uno de los hongos más estables en la producción de aflatoxinas. El maíz utilizado fue esterilizado 15min a 15lb y después fue inoculado con una suspensión de esporas de *A. parasiticus*. Se utilizó una concentración de 1.7×10^7

esporas/ml de inóculo; se evaluaron 2 concentraciones del compuesto ácido naftalén acético y también se utilizaron dos formas de aplicación (solución y polvo).

Cada tratamiento tenía su control de maíz estéril sin inocular, con cinco repeticiones y se
5 realizaron de acuerdo al ejemplo 7. Los parámetros que se evaluaron fueron unidades formadoras de colonias y nivel de aflatoxinas en cada tratamiento.

En la figura 7 se puede observar que 50mM de ácido naftalén acético aplicada en seco disminuye el número de esporas presentes con respecto al tratamiento sin ácido naftalén
10 acético y de igual manera la cantidad de aflatoxina detectada es de 45% menos.

La alta concentración de ácido naftalén acético tiene un efecto de 100% de inhibición en el crecimiento de *A. parasiticus* y un 84% de inhibición de síntesis de aflatoxina, tal como se observa en la figura 8.

15

Estos resultados ilustran claramente que las altas concentraciones de ácido naftalén acético inhiben la germinación de aflatoxina. Además se puede ver claramente que si el maíz tenía un nivel de 55 µg/Kg de aflatoxina al inicio del experimento, la presencia de ácido naftalén acético redujo a 24 µg/Kg la cantidad de aflatoxina.

20

Reivindicaciones.

1. Un método para evitar, reducir o eliminar la contaminación de granos por hongos y micotoxinas, caracterizado porque comprende las etapas de:
 - a) Agregar a los granos un compuesto del grupo que comprende ácido naftalén acético, cualquiera de sus sales o combinaciones de los mismos, en una proporción en peso compuesto/grano de 1:50 en conjunto con agua en un 4% en volumen con respecto del peso del compuesto,
 - b) Homogeneizar la mezcla de tal manera que todos los granos queden impregnados del compuesto, y
 - c) Exponer el grano al compuesto de 6 a 15 días.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es ácido naftalén acético.
3. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto es la sal de potasio del ácido naftalén acético.
4. El método de la reivindicación 1 a 3, caracterizado porque los granos son granos almacenados, procesados y/o transportados.
5. El método de la reivindicación 4, caracterizado porque los granos se seleccionan del grupo que comprende cereales y oleaginosas.
6. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque los cereales comprenden maíz, trigo, sorgo, arroz y soya.
7. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque las oleaginosas comprenden cacahuate, nuez, pistache, piñón, almendra y macadamia.
8. El método de la reivindicación 1 a 7, caracterizado porque los granos se exponen de 6 a 10 días.
9. El método de la reivindicación 8, caracterizado porque los granos se exponen 6 días.
10. El método de la reivindicación 1 a 9, caracterizado porque los hongos son productores de micotoxinas.
11. El método de la reivindicación 10, caracterizado porque las micotoxinas se seleccionan del grupo que consiste de Aflatoxinas, Ochratoxinas, Zearelenona, Fumonosinas, Vomitoxina y toxinas tremorgénicas.
12. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque las aflatoxinas son B y G.

13. El método de la reivindicación 1 a 12, caracterizado porque no altera las propiedades organolépticas y alimenticias del grano.
14. El uso de un compuesto del grupo que comprende ácido naftalén acético, cualquiera de sus sales o combinaciones de los mismos, para evitar, reducir o eliminar la contaminación de granos por hongos y micotoxinas que comprende adicionar al grano una cantidad efectiva del mismo.
15. El uso de la reivindicación 14, caracterizado porque el compuesto se adiciona al grano en una proporción en peso compuesto/grano de 1:50 en conjunto con agua en un 4% en volumen con respecto del peso del compuesto.
16. El uso de la reivindicación 14 a 15, caracterizado porque el compuesto es ácido naftalén acético.
17. El uso de la reivindicación 14 a 15, caracterizado porque el compuesto es la sal de potasio del ácido naftalén acético.
18. El uso de la reivindicación 14 a 17, caracterizado porque los granos son granos almacenados, procesados y/o transportados
19. El uso de la reivindicación 18, caracterizado porque los granos se seleccionan del grupo que comprende cereales y oleaginosas.
20. El uso de la reivindicación 19, caracterizado porque los cereales comprenden maíz, trigo, sorgo, arroz y soya.
21. El uso de la reivindicación 19, caracterizado porque las oleaginosas comprenden cacahuate, nuez, pistache, piñón, almendra y macadamia.
22. El uso de la reivindicación 14 a 21, caracterizado porque los hongos son productores de micotoxinas.
23. El uso de la reivindicación 22, caracterizado porque las micotoxinas se seleccionan del grupo que consiste de Aflatoxinas, Ochratoxinas, Zearelenona, Fumonosinas, Vomitoxina y toxinas tremorgénicas.
24. El uso de la reivindicación 23, caracterizado porque las aflatoxinas son B y G.
25. El uso de la reivindicación 14 a 24, caracterizado porque no altera las propiedades organolépticas y alimenticias del grano.

Resumen.

La presente invención describe un método para controlar e inhibir el crecimiento, esporulación y síntesis de micotoxinas por hongos en granos mediante el ácido naftalén acético, así como cualquiera de sus sales. El método permite un control e inhibición eficientes en la producción de micotoxinas en granos básicos (maíz, trigo, arroz, sorgo, 5 soya etc.) y granos de oleaginosas (cacahuete, nueces, pistaches, piñones, macadamia), tanto en su producción, como en su almacenamiento, procesamiento y transportación, sin alterar las propiedades del alimento.

FIGURA 1

TRATAMIENTO	5 hrs.				19 hrs.				24 hrs.			
	ESPORAS											
	Hinchadas	Germinadas	Hinchadas	Germinadas	Hinchadas	Germinadas	Hinchadas	Germinadas	Hinchadas	Germinadas	Hinchadas	Germinadas
Control	100/100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	100/100	100/100
50 mM	19/100	0	19/100	0	19/100	0	0	29/100	0	29/100	27/100	27/100
100 mM	2/100	0	2/100	0	2/100	0	0	3/100	0	3/100	0/100	0/100

FIGURA 2

		ESPORAS	
		Sin germinar (%)	Germinadas (%)
<i>Aspergillus flavus</i>			
Control	(medio + esporas)	49	52
1M	(medio + esporas + ANA)	100	0
<i>Aspergillus parasiticus</i>			
Control	(medio + esporas)	4	96
1M	(medio + esporas + ANA)	99	1

FIGURA 3

TRATAMIENTO	2 hrs				4 hrs				6 hrs			
	Estadío de las esporas											
	H	G	NH	H	G	NH	H	G	NH	H	G	NH
Control (medio + esporas)	64	0	36	86	5	8	9	1		90		
ANA 100 mM	91	0	9	92	0	9	5	70	1			

FIGURA 4

TRATAMIENTO	8 hrs				10 hrs				12 hrs			
	Estadío de las esporas											
	H	G	NH	H	G	NH	H	G	NH	H	G	NH
Control (medio + esporas)	3	0	98	0	100	0	0	100	0	0	100	0
ANA 100 mM	1	97	0	0	97	0	0	100	0	0	100	0

FIGURA 5

ANA en solución	Aflatoxina en maíz		UFC
	µg/50g	µg/Kg	
0	27.75	515	3.16×10^5
2M	22.30	446	1.80×10^4

FIGURA 6

ANA en polvo (g)	Aflatoxina en maíz		Eficiencia de la actividad (%)	UFC
	$\mu\text{g}/50\text{g}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$		
0	4.19	83	82	Incontables
1	0.73	15		1×10^4

FIGURA 7

Inóculo de <i>A. parasiticus</i>	Sal de ANA (mM)	Esporas después del tratamiento ($\times 10^7$)	Aflatoxina 5 días después de tratamiento	
			$\mu\text{g}/50\text{g}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$
0	0	0	1.47	29
1×10^7	0	46.5	1930	38,600
1×10^7	50	11.2	870	17,600

FIGURA 8

Inóculo de <i>A. parasiticus</i>	Sal de potasio ANA (M)	Esporas después del tratamiento ($\times 10^4$)	Aflatoxina 5 días después de tratamiento	
			$\mu\text{g}/50\text{g}$	$\mu\text{g}/\text{Kg}$
0	0	7.8	2.7	55
8.7×10^7	0	Incontables	7.6	151
8.7×10^7	2	0	1.25	24