



Artículo Científico

Efecto antifúngico del aceite esencial de clavo y sus componentes principales sobre hongos aislados de tortillas de maíz

Ana Patricia Ibarra-Valenzuela, Rosalba Troncoso-Rojas, Alma Rosa Islas-Rubio, Elizabeth Peralta, Herlinda Soto-Valdez*, Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46. Col. La Victoria, CP. 83304, Hermosillo, Sonora, México; **Hayati Samsudin**, Food Technology Division, School of Industrial Technology, Universiti Sains Malaysia 11800 USM, Pulau Pinang, Malaysia.

*Autor de correspondencia:

Herlinda Soto-Valdez
hsoto@ciad.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
09 Abril, 2024

Aceptado:
16 Diciembre, 2024

Publicado:
31 Diciembre, 2024
Adelantada, 2025

Cita:

Ibarra-Valenzuela AP, Troncoso-Rojas R, Islas-Rubio AR, Peralta E, Soto-Valdez H *et al.* 2025. Efecto antifúngico del aceite esencial de clavo y sus componentes principales sobre hongos aislados de tortillas de maíz. Revista Mexicana de Fitopatología 43(1): 50. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2404-4>



RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. Las tortillas de maíz, alimento básico en México, presentan una vida útil de 1-2 días a 25 °C debido al crecimiento fúngico. Una alternativa para extender la vida de anaquel de las tortillas es adicionar aceite esencial de clavo (AEC), sus componentes mayoritarios: eugenol (E), isoeugenol (I) y acetato de eugenilo (AE). El objetivo fue evaluar el efecto antifúngico del AEC sobre hongos identificados en tortillas de maíz.

Materiales y Métodos. Se adquirieron muestras de un kg de tortillas de maíz de las capitales de cinco estados del país (Sonora, Nuevo León, Michoacán, Oaxaca y Yucatán). Los hongos se identificaron por su morfología y por biología molecular. Además, se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a AEC. El efecto de E, I y AE sobre *Aspergillus niger* (previamente identificado) se evaluó con el modelo de Gompertz.

Resultados. Se obtuvieron dos aislados fúngicos de las tortillas de Nuevo León, Sonora, Yucatán y Michoacán y un aislado de Oaxaca, mismos que se identificaron por biología molecular: *Aspergillus longivesica* y *Curvularia spicifera* de Nuevo León; *Aspergillus niger* y *Penicillium brevicompactum* de Sonora; *Aspergillus sp.* de Oaxaca; *Mucor sp.* y *Aspergillus flavus* de Yucatán; *Penicillium herquei*, y *Curvularia racemosus* de Michoacán. Las CMIs fueron 200, 400, 800, 400, 800, 400, 800, 800 y 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. AEC, E e I a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ retardaron la fase exponencial de crecimiento de *Aspergillus niger*, mientras que AE no mostró efecto.

Conclusión. El AEC podría ser una alternativa natural para prolongar la vida útil de tortillas de maíz.

Palabras clave. Eugenol, isoeugenol, acetato de eugenilo, *Aspergillus niger*.

INTRODUCCIÓN

México forma parte del continente americano, se ubica entre las latitudes 14° 32' 27" norte y 32° 43' 06" sur, por lo que puede presentar aridez al norte y climas húmedos al sur del país (Hernández Cerda *et al.*, 2018). A lo largo del territorio mexicano se encuentran 32 entidades federativas, cada una con sus diversas características y costumbres, pero que comparten un alimento esencial en común: las tortillas de maíz. Este alimento también se consume ampliamente en Estados Unidos de América y países centroamericanos (Rooney y Serna-Saldivar, 2016). Las tortillas de maíz son consideradas una comida étnica, su origen se reporta desde el siglo V a.C y hasta el día de hoy es de alto consumo en México, cuyo valor nutricional y versatilidad para elaborar distintos platillos las hacen un componente básico en la dieta mexicana (Serna-Saldivar, 2015). El consumo anual per cápita de este alimento oscila desde los 75 hasta los 120 kg (CONEVAL, 2012).

Las tortillas de maíz se envasan en porciones de 1 a 2 kg en papel revolución, papel kraft o bolsas de polietileno de alta densidad (PEAD). Una vez que las tortillas llegan a los hogares, las conservan en su envase original y también suelen ser depositadas en tortilleros (plástico, poliestireno u hojas de palma) (Secretaría de Salud de México, 2002). Algunos factores que contribuyen al consumo de este alimento son la costumbre, la tradición cultural, el ingreso y también por las cualidades mismas de la tortilla, es decir, el sabor, la textura y el aroma. Se estima que cada mexicano consume en promedio 67.5 kg de tortillas de maíz, suponiendo que el total de habitantes mayores a 15 años de edad en México consuman esta cantidad por año, se estarían produciendo cerca de siete millones de t de tortillas cada año (CONEVAL, 2012; INEGI, 2020).

Las tortillas de maíz tienen un porcentaje de humedad del 45-50 % y una a_w de 0.98, por lo que su composición y tipo de envasado hacen de este el medio apto para la proliferación de microorganismos que limitan su vida de anaquel (Heredia-Sandoval *et al.*, 2021). Existen pocos reportes que evidencien géneros y especies fúngicos específicos responsables de limitar la vida de anaquel de las tortillas de maíz; sin embargo, se conoce que los principales géneros de hongos que proliferan en los granos de maíz pertenecen a *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. (Martínez Padrón *et al.*, 2013; Wall-Martínez *et al.*, 2019). El desarrollo de diferentes géneros fúngicos en el maíz se relaciona directamente con las características

ambientales (temperatura y humedad relativa del entorno), donde se siembra, cosecha y almacena el grano (Wall-Martínez *et al.*, 2019). Además, el desarrollo fúngico también se relaciona con la higiene, es decir, la presencia de las esporas de hongos que se encuentren alrededor o dentro de las tortillerías y el tipo de envase que se utilice para las tortillas de maíz. Para disminuir el desarrollo fúngico se han adicionado diversos conservadores artificiales como el propionato de sodio y el sorbato de potasio (Flores-Farías *et al.*, 2002). La incorporación de los conservadores artificiales, además de prolongar la vida de anaquel de las tortillas, modifica sus características, ya que la adición de sorbatos o propionatos (dependiendo de la concentración) ocasiona que las tortillas cambien a un color blanquecino; en otras ocasiones, puede modificar su sabor y color (Báez-Aguilar *et al.*, 2022). En México, la NOM-187-SSA1/SCFI-2002 indica el máximo permitido para el sorbato de potasio en las tortillas de maíz o harinas de maíz en México el cual es de 2,000 mg kg⁻¹ (Secretaría de Salud de México, 2002). Aun así, en 2002 se reportó que la concentración de aditivos en harinas de maíz comercial alcanzó hasta 4,000 mg kg⁻¹ de sorbato de potasio, y si lo multiplicamos por la cantidad de tortillas de maíz ingeridas en un año, su consumo podría tener efectos adversos a la salud (Flores-Farías *et al.*, 2002).

Hoy en día los consumidores solicitan alimentos mínimamente procesados y que contengan compuestos naturales, por ello se estudia la posibilidad de añadir aditivos naturales directamente en alimentos. López Ortiz, (2016) evaluó el efecto de la adición de aceite esencial de azahar (AEA), de aceite esencial de naranja (AEN) y extracto de cúrcuma al 1% en la vida de anaquel de las tortillas de maíz almacenadas a 5 °C. La adición de AEA y AEN extendieron la vida de anaquel de las tortillas de maíz por 11 y 2 días más, respectivamente, comparado con las tortillas de maíz sin ningún aditivo (15 días).

Otra manera de adicionar estos compuestos naturales es directamente en el envase alimentario. De esta manera, se evaluó el efecto de dos envases antimicrobianos adicionados con AEA en la vida de anaquel de tortillas de maíz. El resultado del estudio fue que ambos envases alargaron la vida de anaquel del producto por 8 y 10 días más, respectivamente, comparado con el control (15 días) (Ibarra-Valenzuela, 2019). Otro ejemplo es el aceite esencial de clavo (AEC), que posee en su composición a eugenol (E), iso Eugenol (I) y acetato de eugenilo (AE) en mayor proporción. Estos compuestos han evidenciado tener propiedades antifúngicas contra géneros fúngicos que se desarrollan en el maíz (Abbaszadeh *et al.*, 2014).

Para evaluar el efecto de agentes antimicrobianos adicionados directamente a las tortillas de maíz o al material de envase, se realizan estudios de vida de anaquel en los que se les da seguimiento al crecimiento de los microorganismos que se desarrollan en este alimento. Existen diversos modelos de crecimiento microbiano cuyo supuesto es el crecimiento hasta un punto máximo, donde la velocidad de

crecimiento disminuye y el desarrollo siguiente es constante. El modelo bifásico se emplea para evaluar el crecimiento sobre tratamientos térmicos, el modelo Whiting analiza las curvas de supervivencia microbiana en la inactivación de microorganismos, mientras que el modelo de Gompertz se utiliza ampliamente para estudiar curvas sigmoideas asimétricas de crecimiento e inactivación del desarrollo microbiano (Bevilacqua *et al.*, 2015). Existen diversos programas que contienen aplicaciones para analizar datos con modelos de predicción. El modelo dinámico de ajuste (DMFit) es una herramienta de Excel, con la cual se pueden analizar datos con el modelo de Gompertz. DMFit proporciona tres variables (μ_m -velocidad de crecimiento máxima, λ -fase de latencia y A -crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria) con las cuales se puede evaluar el efecto de la adición de agentes antifúngicos sobre el crecimiento de hongos. El primer objetivo de este trabajo fue identificar a los principales hongos presentes en tortillas de maíz procedentes de las capitales de cinco estados de México. El segundo objetivo fue determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEC frente a esos hongos. El tercer objetivo fue evaluar el efecto antifúngico del AEC, E, I y AE sobre el crecimiento de micelial de *Aspergillus niger* identificado en esta investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron cinco estados distribuidos sobre el territorio del país (Sonora, Nuevo León, Michoacán, Oaxaca y Yucatán). Se adquirió un kg de tortillas de maíz de una tortillería de cada capital localizadas en los cinco estados en 2021. Los criterios de inclusión para seleccionar las tortillerías adecuadas fueron: ser una tortillería local que incluyera la mayor cantidad de nixtamal para la elaboración de las tortillas de maíz. Esto aseguró que se utilizara la menor cantidad de conservadores artificiales incluyendo harinas comerciales. Las tortillas permanecieron en su envase original hasta su análisis (36 h), cada pieza se re-ensavó en una bolsa de polietileno, se enfriaron a 25 °C y se colocaron en una hielera de poliestireno con dos bloques de gel para congelar. Las tortillas frías en la hielera se enviaron por servicio de paquetería y se recibieron al día siguiente en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) ubicado en Hermosillo, Sonora (Son). Después del análisis las tortillas se almacenaron a -20 °C.

Aislamiento de hongos en tortillas de maíz

Los paquetes con las tortillas de maíz provenientes de los cinco estados de México se abrieron y se dejaron atemperar a 25 °C. Las muestras se prepararon y se realizaron diluciones según la NOM-110-SSA1-1994, se sembraron en agar papa dextrosa (PDA), las placas se incubaron a 25 °C por 72 h (Secretaría de Salud

de México, 1994). Se sembraron tres muestras por cada paquete de tortillas de maíz por triplicado. Después del periodo de incubación (72 h) se prosiguió a la resiembra de cada colonia fúngica hasta lograr el aislamiento de cada una. Una vez que las colonias fueron aisladas se siguió la técnica de la “cinta adhesiva” y tinción con azul de algodón para observar la estructura fúngica al microscopio óptico Amscope B020c® a 40 X (Guerra *et al.*, 2019). Para llegar a la identificación de cada género fúngico, se compararon las características macro y micro de cada hongo con la bibliografía reportada (Barupal *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2020; Rangel-Muñoz *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2021).

Identificación molecular de hongos

Para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se siguió la metodología que reportaron González-Mendoza *et al.* (2010). Se recolectó y liofilizó el micelio de cada hongo después de siete días de crecimiento. Se pesaron 20 mg de micelio y se le añadieron 200 µL de Buffer de lisis (SDS 3%, Tris-HCl 0.1 mM, pH 8.0, EDTA 0.5 mM, pH 8.0, NaCl 1 M) y la mezcla se agitó por 30 min. Se adicionaron 200 µL de cloroformo/fenol (1/1) y se incubó a 65 °C por 5 min en un baño seco, después se centrifugó a 4 °C por 5 min a 10,000 g. El sobrenadante se vertió en otro tubo al que se adicionó el mismo volumen de etanol puro. El contenido se mezcló lentamente, se enfrió a -20 °C por 20 min y centrifugó a 4 °C por 5 min a 10,000 g. Se descartó el sobrenadante, el resto se re-suspendió en etanol al 75% y se centrifugó a 4 °C por 5 min a 10,000 g. Nuevamente se descartó el sobrenadante y al volumen restante se le añadieron 30 µL de agua Millipore®. Finalmente, se realizó electroforesis en gel agarosa al 1.5% para verificar la extracción de ADN de cada aislado.

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final para identificar a cada aislado. Para la amplificación se utilizaron iniciadores con la región interespecífica (ITS)1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La mezcla final de la reacción fue de 25 µL: 12.5 µL de PCR Master mix (Promega®), 1 µL de platinum Taq polimerasa (Invitrogen®), 1.5 µL de ITS1, 1.5 µL de ITS4, 2 µL de ADN y 6.5 µL de agua Millipore®. La reacción de amplificación se empezó 30 s a 95 °C, seguido por 35 ciclos de la siguiente forma: 1 min a 95 °C, 30 s a 50 °C y 1 min a 72 °C, la fase final duró 5 min a 95 °C (Kim *et al.*, 2020). Cada amplificación se cuantificó, se purificó y se analizó en el laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental ubicado en San Luis Potosí. Las secuencias se compararon con las publicadas en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2023).

Concentración mínima inhibitoria (CMI) del AEC frente a los hongos aislados

Para evaluar la CMI de AEC sobre hongos filamentosos, se siguió la propuesta de “Clinical Laboratory Standard Institute” con algunas modificaciones (Standards Clinical and Laboratory Institute, 2018). El AEC comercial utilizado se adquirió de Young Living®. Se emplearon las siguientes concentraciones de AEC: 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 y 1,600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el medio de cultivo que se utilizó fue PDA. Cada aislado fúngico se resembró y al 5° día de crecimiento se tomó para cuantificar en cámara de Neubauer y se ajustó a 2,500 conidias mL^{-1} . Una vez que se estandarizó el inóculo, se procedió a depositar 100 μL de AEC y 100 μL de inóculo en tubos eppendorf de 2 mL, por triplicado. Lo anterior se incubó a 25 °C durante 24 h para las especies de *Mucor* spp. y durante 48 h para el resto de los géneros fúngicos. Después del tiempo de incubación se cuantificaron las unidades formadoras de colonia (UFC) por vaciado en placa y la concentración en la cual no se observó crecimiento fúngico se tomó como CMI y se reportó como $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 250 conidias.

Efecto del AEC, E, I y AE sobre el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*

Uno de los hongos aislados por su prevalencia (*Aspergillus niger*) se eligió para evaluar el efecto de AEC, E, I y AE sobre su crecimiento micelial. Para este ensayo se siguió el procedimiento de Díaz-García *et al.* (2024) con algunas modificaciones. Inicialmente, se estandarizó el inóculo a una concentración de 1×10^6 esporas mL^{-1} . De éste se tomaron 100 μL equivalentes a 100,000 conidias, las cuales se depositaron en un pocillo de 0.9 cm de diámetro ubicado en el centro de cada placa Petri con PDA. Posteriormente, en un segundo pocillo se depositaron 100 μL de cada uno de los agentes antifúngicos AEC, E, I y AE a cuatro concentraciones (2,000, 4,000, 8,000 y 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), de tal modo que se evaluó un compuesto y una concentración por placa Petri y por triplicado. Además, se incluyeron un control con agua y otro con etanol puro para descartar la posible actividad antifúngica del diluyente. Todas las placas se incubaron a 25 °C durante 96 h, se midió el diámetro del micelio cada 12 h durante las primeras 48 h y después cada 24 h. Se consideró que las mediciones finales serían un día después de que los diámetros de los controles agua y etanol comenzaran a estacionarse. La medición de cada diámetro del micelio se realizó en la dirección vertical de los pocillos, iniciando en el límite derecho de pocillo central y hasta el límite izquierdo hasta donde se extendió el crecimiento del hongo. Los resultados del crecimiento micelial y el porcentaje de inhibición de cada compuesto se calcularon con las ecuaciones 1 y 2:

$$\text{Crecimiento micelial (\%)} = \frac{\text{diámetro del crecimiento del hongo en el tratamiento}}{\text{diámetro del control negativo}} \times 100$$

Ecuación 1

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \text{crecimiento (\%)}$$

Ecuación 2

Los parámetros cinéticos (λ : fase de latencia, μ_m : velocidad máxima de crecimiento, A : crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria) del efecto de AEC, E e I se estimaron con la herramienta DMFit de Excel. La herramienta se alimentó con los datos del diámetro micelial (cm) que se obtuvieron en cada tratamiento y cada tiempo de muestreo (12, 24, 48, 72 y 96 h). El modelo de Gompertz permite obtener cada variable cinética y comparar el efecto de cada compuesto sobre λ , μ_m y A . El modelo de Gompertz se basa en la ecuación 3 (Bevilacqua *et al.*, 2015; Soro *et al.*, 2021; Zwietering *et al.*, 1990).

$$y = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m + \epsilon}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Ecuación 3

Donde y es el diámetro micelial en un tiempo determinado de incubación, t es tiempo y μ_m es la velocidad de crecimiento máximo, λ es la fase de latencia y A es el crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria. Las fases de latencia (λ) y crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria (A) se analizaron en el paquete estadístico NCSS 2023 y se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$) (NCSS, 2023).

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de hongos en tortillas de maíz

Uno de los dos aislados fúngicos de las tortillas de maíz de Monterrey, Nuevo León (N.L.) (Figura 1B), Hermosillo, Son (Son) (Figura 1H), Mérida, Yucatán (Yuc) (Figura 1E) y el único aislado de Oaxaca, Oaxaca (Oax) (Figura 1C), se observaron similitudes morfológicas al género de *Aspergillus*. Este género se caracteriza por tener hifas hialinas en las que se encuentra un conidióforo circular uniforme, el cual presenta conidias en toda su superficie, las que se desprenden para formar otra colonia fúngica. La coloración de las colonias de *Aspergillus* spp. en medio de cultivo gelificado puede ser blanca, negra o verde (Figura 2 B, C y E) (Ibarra-Valenzuela, 2019; Rangel-Muñoz *et al.*, 2020).

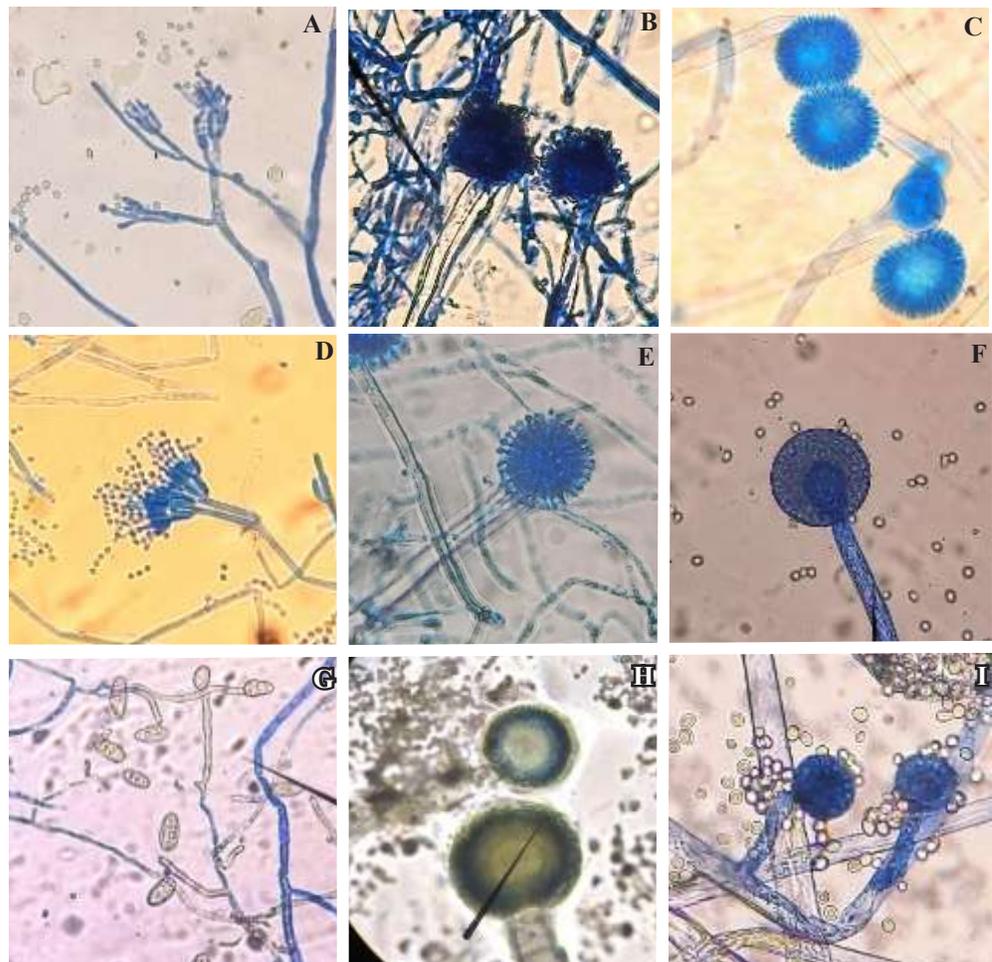


Figura 1. Estructura fúngica por microscopía óptica (40X), aisladas de las tortillas de maíz de Morelia, Mich (A: *Penicillium* sp. y F: *Mucor* sp.), Monterrey, N.L. (B: *Aspergillus* sp. y G: *Curvularia* sp.), Oaxaca, Oax (C: *Aspergillus* sp.), de Hermosillo, Son (D: *Penicillium* sp. y H: *Aspergillus* sp.) y Mérida, Yuc (E: *Aspergillus* sp. y I: *Mucor* sp.).

Por otro lado, un aislado fúngico (de dos) de las tortillas provenientes de Morelia, Michoacán (Mich) y Hermosillo, Son (Figuras 1A y 1D, respectivamente), se encontró la presencia del género *Penicillium*. Las colonias suelen ser planas aterciopeladas con circunferencia blanca en colores verdes que se tornan café oscuro durante su maduración (Ibarra-Valenzuela, 2019; Yin *et al.*, 2021).

También se encontró *Curvularia* en uno de los dos aislados de las tortillas de Monterrey, N.L. (Figura 1G). Este género presenta hifas septadas con microconidias ovaladas y macroconidias de 3 a 5 divisiones en forma curva. Las colonias de estos géneros van desde verde oliváceo a marrón oscuro y se consideran dematiáceos debido a que poseen una coloración café debido a la producción propia de melanina (Barupal *et al.*, 2019).

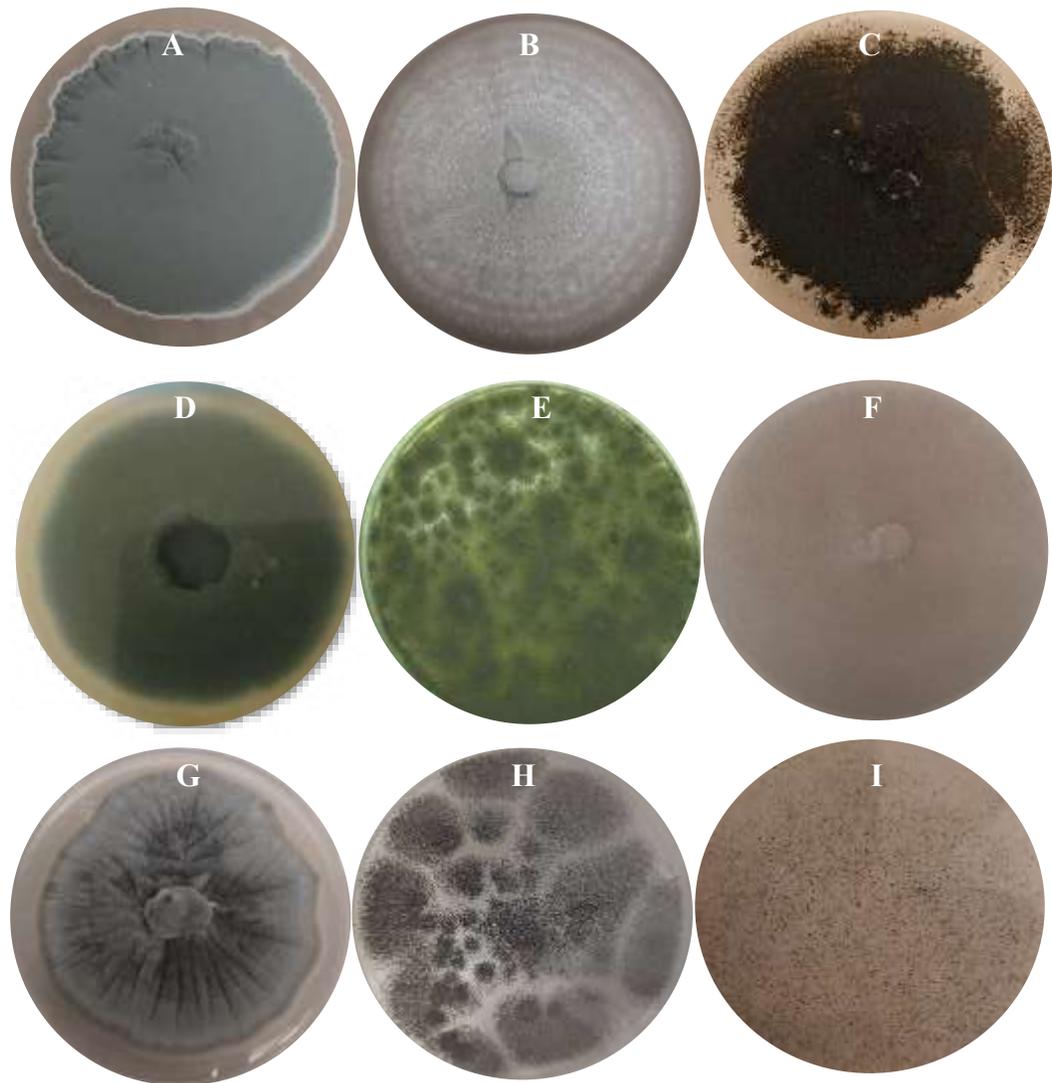


Figura 2. Crecimiento de hongos en PDA aisladas de las tortillas de maíz de Morelia, Mich (A, *Penicillium* sp. y F, *Mucor* sp.), de Monterrey, N.L. (B, *Aspergillus* sp. y G, *Curvularia* sp.), de Oaxaca, Oax (C, *Aspergillus* sp.), de Hermosillo, Son (D, *Penicillium* sp. y H, *Aspergillus* sp.) y de Mérida, Yuc (E, *Aspergillus* sp. y I, *Mucor* sp.).

Mucor spp. se encontró en uno de los dos aislados de las tortillas provenientes de Morelia, Mich (Figura 2F) y Mérida, Yuc (Figura 2I). Este género presenta hifas hialinas que se encuentran unidas al conidióforo circular uniforme y a diferencia del resto de hongos mencionados, produce y conserva a cada conidia dentro del conidióforo. Una vez que el conidióforo llega a su punto máximo de maduración es cuando la pared celular de este se rompe y libera cada conidia para formar una colonia nueva. Las colonias de este género fueron algodonosas de color café a gris

y con la característica de llenar completamente la placa de cultivo en un periodo máximo de 48 h, además, debido a su rápida proliferación la mayoría de pruebas que se le realizan deben hacerse a las 24 h (Nguyen *et al.*, 2020).

Identificación molecular de hongos aislados de tortillas de maíz

Durante la amplificación de las ITS se obtuvieron fragmentos de ADN con un tamaño de entre 500 y 750 pb. Las secuencias que se obtuvieron corroboraron el género de cada hongo, además permitió conocer la especie de cada uno. Se identificaron a *M. racemosus* y *P. herquei* en los aislados de Morelia Mich con un 100 % de identidad. Posteriormente se identificaron a *A. longivesica* y *C. spicifera* en los aislados de Monterrey, N.L. con un 100 % de identidad. Después se identificaron a *A. niger* y *P. brevicompactum* en los aislados de Hermosillo, Son con un 100 % de identidad. Se identificó a *A. flavus* en uno de los dos aislados de Mérida, Yuc con un 94.23 % de identidad, mientras que la secuencia del segundo aislado que corresponde a *Mucor* sp. no se encontró en la base de datos del NCBI. Finalmente, el aislado de Oaxaca, Oax que se identificó como *Aspergillus* sp. no logró amplificarse con los ITS's utilizados.

CMI del AEC frente a los hongos en las tortillas de maíz

Las CMIs de los hongos aislados de Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Sonora y Yucatán fueron desde los 200 hasta los 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esta cantidad corresponde de 20 a 80 μg de AEC añadido para inhibir el crecimiento de 250 conidias (Cuadro 1). El hongo menos resistente a AEC fue *A. longivesica* ya que solo requirió de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para inhibir su crecimiento, después, *M. racemosus*, *P. herquei*, *C. spicifera*

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceite esencial de clavo sobre hongos (250 conidias) aislados de tortillas de maíz.

Estados	Hongos	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Michoacán	<i>M. racemosus</i>	400 \pm 0
	<i>P. herquei</i>	400 \pm 0
Nuevo León	<i>A. longivesica</i>	200 \pm 0
	<i>C. spicifera</i>	400 \pm 0
Oaxaca	<i>Aspergillus</i> sp.	800 \pm 0
Sonora	<i>A. niger</i>	800 \pm 0
	<i>P. brevicompactum</i>	400 \pm 0
Yucatán	<i>A. flavus</i>	800 \pm 0
	<i>Mucor</i> sp.	800 \pm 0

y *P. brevicompactum* con una CMI de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Finalmente, los hongos más resistentes a AEC fueron *Aspergillus* sp., *A. niger*, *A. flavus* y *Mucor* sp. con una CMI de 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *Aspergillus* sp. fue el género más prevalente en las tortillas de maíz y, además, el género más resistente a AEC con la CMI más alta. Por lo que, el control de este género es fundamental para garantizar la seguridad y calidad de las tortillas de maíz.

Efecto del AEC, E, I y AE sobre el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*

Posterior al periodo de incubación se observó que AEC (4,000 y 2,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) presentó el mismo efecto fungistático que E (8,000, 4,000 y 2,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e I (16,000, 8,000, 4,000 y 2,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a las 24 h, estos se encuentran en mayor proporción en este aceite (Figura 3). El mayor porcentaje de inhibición lo produjo AEC a 16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, el efecto fungicida de esta concentración se mantuvo por al menos 96 h (Figura 4). El AEC (16,000 y 8,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y E (16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) produjeron los mayores porcentajes de inhibición (100, 57.1 y 67.3 %), respectivamente. La inhibición de AEC (4,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 27.6%), E (8,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 34.7% y 4,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 21.4%) e I (16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 22.4% y 8,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 22.4%) no presentaron diferencias significativas entre sí. Mientras que, la adición de AEC y E (16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) disminuyeron cinco y seis veces la velocidad de crecimiento de *Aspergillus niger* respecto a los controles de agua y etanol, respectivamente. Por otro lado, ninguna de las concentraciones de AE presentaron un efecto antifúngico sobre el crecimiento micelial de *A. niger*.

DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de hongos en las tortillas de maíz

Las tortillas de maíz son un alimento de consumo diario en todo México; sin embargo, existe escasa evidencia sobre especies fúngicas que limitan su vida de anaquel. El desarrollo fúngico de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. en alimentos es importante porque estos producen diversas micotoxinas. La incidencia de estos hongos en el maíz no se elimina con las condiciones de procesamiento de las tortillas, por lo que se desarrollan una vez que se adaptan a las condiciones de almacenamiento del producto a nivel doméstico.

Aspergillus spp. y *Penicillium* spp. se encuentran en el maíz desde la cosecha (Ullah *et al.*, 2010), mientras que *Curvularia* spp. y *Mucor* spp. se relacionan a una contaminación durante el proceso de elaboración del alimento, por lo que pueden contaminar las tortillas al momento de ser envasadas. *Curvularia* spp. no se habían

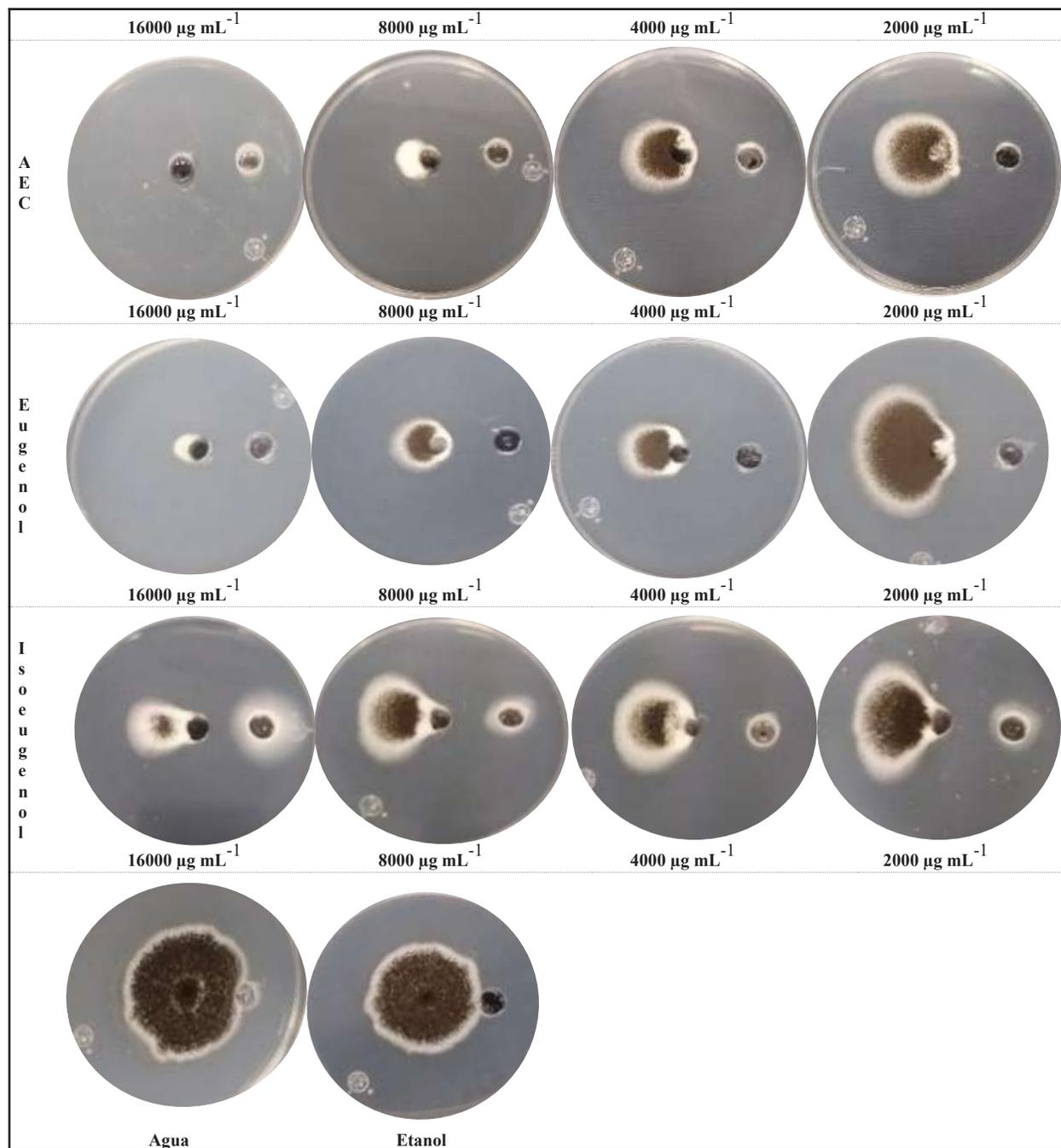


Figura 3. Efecto antifúngico de AEC, E e I sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en PDA a las 96 h de incubación a 25 ± 1 °C.

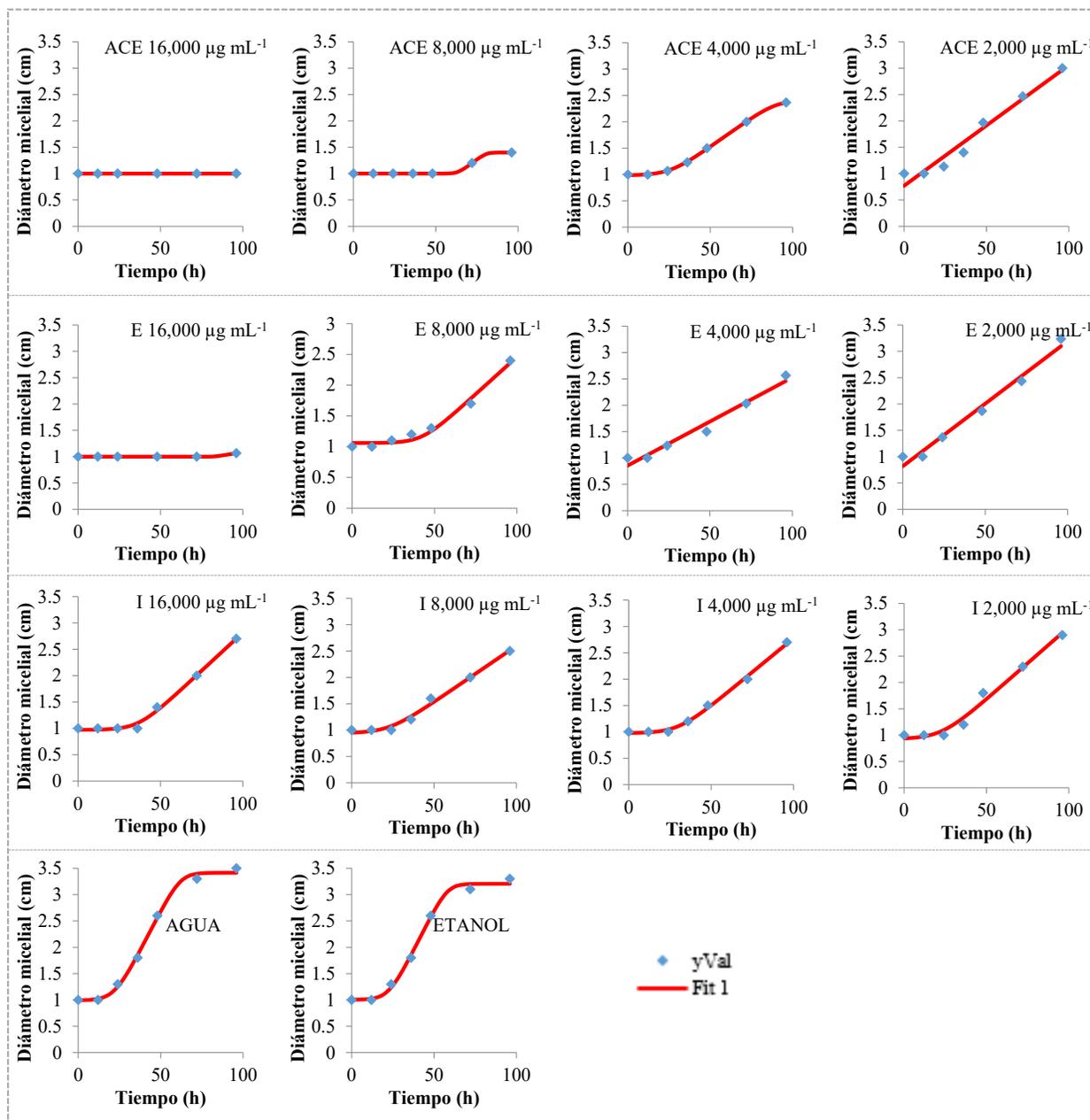


Figura 4. Cinética del crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en PDA durante 96 h de incubación a 25 ± 1 °C. yVal=valores de y; Fit 1=curva con datos ajustados.

relacionado con las tortillas de maíz o pérdida de la vida de anaquel de este alimento, pero sí como causantes de infectar al grano de maíz, mientras que, *Mucor* spp. se identificó en tortillas de maíz elaboradas a partir de cinco razas diferentes de maíz (López-Morales *et al.*, 2023). *Curvularia* spp. se asocia con la contaminación de almacenes y silos para granos de maíz, por su parte *Mucor* spp. ha sido aislado de silos con granos de maíz durante su almacenamiento, ya que este último es considerado un género fúngico contaminante del ambiente y no propio del maíz (Akwuobu *et al.*, 2019; García-Leaños *et al.*, 2007).

CMI del AEC frente a los hongos en tortillas de maíz

El efecto antifúngico del AEC se debe a los componentes terpénicos contenidos en este aceite, específicamente E e I son compuestos con carácter lipofílico que modifican la membrana fúngica e interrumpen el intercambio de iones, lo que produce lisis celular (de Oliveira Pereira *et al.*, 2013). Los resultados de la CMI (200-800 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que se obtuvieron para *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. frente a AEC se encuentran en la misma magnitud de la CMI (350-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que reportaron para *Aspergillus* sp. y para *Penicillium* sp. frente a E (Abbaszadeh *et al.*, 2014). Para *Curvularia spicifera* no se encontraron reportes comparables con el AEC, pero sí con otros aceites esenciales, por ejemplo, el aceite de *Psidium guajava* (0.2 %) que tiene limoneno (29 %) y cariofileno (15%) en mayor proporción, este aceite inhibió el 53 % de *Curvularia Lunata* (Chaturvedi *et al.*, 2019). Heer *et al.* (2017) evaluaron el efecto de *Cinnamomum tamala* que contiene E (52%) frente a *Curvularia lunata*, la CMI del extracto frente a *Curvularia lunata* fue de 2,117 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Hasta el momento no existen reportes sobre el efecto de AEC, E, I o AE frente a *Mucor* spp. que hayan empleado la técnica descrita en la sección de materiales y métodos, pero sí existen dos reportes de la CMI de E frente a *Rhizopus oryzae*, la cual fue de 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Prajapati *et al.*, 2023) y 350 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Abbaszadeh *et al.*, 2014). Debido a la importancia de mantener alimentos libres de cualquier hongo y sus metabolitos secundarios, es importante tener una alternativa natural como el AEC para disminuir el desarrollo de estos en alimentos. Los resultados de la CMI del AEC frente a cada especie fúngica sugieren que 1,600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ son suficientes para ejercer una actividad fungicida en cada caso.

Efecto del AEC, E, I y AE sobre el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*

El crecimiento de los diámetros de los controles (agua y etanol) disminuyeron a las 72 h, por lo que se consideró terminar las mediciones a las 96 h. *Aspergillus niger* empezó a desarrollarse en los controles de agua y etanol a las 17 y 22 h, respectivamente; mientras que en AEC (16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y en E (16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) tardaron ≥ 96 y 87.43 h, respectivamente. La concentración más alta de AEC

impidió el crecimiento del hongo durante todo el periodo de incubación (96 h). Pereira *et al.* (2013) y Tarhan (2021) reportaron que el efecto antifúngico de AEC se debe a E, puesto que se encuentra en mayor proporción en este aceite. No obstante, los resultados obtenidos sobre el efecto de AEC, E e I en el crecimiento de *Aspergillus niger*, sugieren que existe un mayor efecto antifúngico por AEC que por E e I separados en las mismas concentraciones. Esto ocurre porque en AEC se dan los mecanismos de acción de E e I que ejercen un efecto sinérgico, es decir, por su lado E se reporta que interacciona con la molécula de ergosterol en la membrana fúngica, mientras que I inhibe la formación de componentes de la matriz extracelular fúngica (Gupta *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2013). Los grupos hidroxilos de E e I promueven un efecto antifúngico sinérgico cuando se encuentran combinados en AEC. Consecuentemente, al aplicar una concentración menor de AEC (4,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se obtiene el mismo efecto sobre la fase de latencia (λ) que al adicionar una concentración mayor de E (8,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o I (16,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por separado (Cuadro 2).

Los controles de agua y etanol empezaron a desarrollarse al mismo tiempo que las bajas concentraciones de AEC y E; sin embargo, estas concentraciones disminu-

Cuadro 2. Parámetros cinéticos del efecto del aceite esencial de clavo (AEC), eugenol (E) e isoeugenol (I) sobre el crecimiento micelial de *Aspergillus niger* incubado a 25 ± 1 °C durante 96 h, obtenidos con DMFit 3.5 de Excel.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	λ (h)	μ_m (cm h ⁻¹)	A (cm)	R ² (%)
AEC	16,000	$\geq 96 \pm 0.00^b$	$0.00 \pm 0.00 \times 10^{-2a}$	1.00 ± 0.00^a	100.0 ± 0.00
	8,000	63.33 ± 0.00^b	$2.25 \pm 0.05 \times 10^{-2bd}$	1.40 ± 0.00^a	100.0 ± 0.00
	4,000	25.17 ± 6.82^{ab}	$2.31 \pm 1.27 \times 10^{-2bd}$	2.36 ± 0.88^b	98.83 ± 0.83
	2,000	26.05 ± 5.02^{ab}	$2.94 \pm 0.77 \times 10^{-2b}$	3.01 ± 0.29^b	97.39 ± 3.20
E	16,000	87.43 ± 7.42^b	$0.43 \pm 0.40 \times 10^{-2ad}$	1.06 ± 0.05^a	100.0 ± 0.00
	8,000	34.55 ± 9.07^{ab}	$1.84 \pm 0.65 \times 10^{-2abd}$	2.11 ± 0.29^b	98.10 ± 0.62
	4,000	$31.07 \pm 2.65^{*ab}$	$2.26 \pm 1.32 \times 10^{-2bd}$	2.47 ± 0.37^b	93.64 ± 5.56
	2,000	27.03 ± 7.70^{ab}	$3.22 \pm 0.04 \times 10^{-2b}$	3.21 ± 0.04^b	98.64 ± 0.01
I	16,000	30.15 ± 8.70^{ab}	$2.26 \pm 0.90 \times 10^{-2bd}$	2.53 ± 0.24^b	95.61 ± 0.07
	8,000	27.04 ± 3.82^{ab}	$2.26 \pm 0.19 \times 10^{-2bd}$	2.52 ± 0.08^b	98.39 ± 0.01
	4,000	32.91 ± 3.59^{ab}	$2.60 \pm 0.25 \times 10^{-2b}$	2.64 ± 0.08^b	97.57 ± 0.02
	2,000	23.36 ± 0.57^{ab}	$2.71 \pm 0.49 \times 10^{-2b}$	3.00 ± 0.21^b	95.44 ± 0.06
AGUA		17.56 ± 4.06^a	$5.56 \pm 0.68 \times 10^{-2c}$	3.47 ± 0.08^b	99.22 ± 0.00
ETANOL		22.34 ± 0.01^a	$6.17 \pm 0.01 \times 10^{-2c}$	3.17 ± 0.06^b	99.01 ± 0.00

λ = fase de latencia del hongo (h); μ_m = velocidad de crecimiento máximo (cm h⁻¹); A = crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria (cm). Valores son media \pm desviación estándar de triplicados. *= resultado estimado del promedio del triplicado con DMFit. Literales diferentes por columna indica diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

yeron la velocidad de crecimiento de *Aspergillus niger* desde 1.6 hasta a 2.3 veces respecto al control de agua. Esto muestra que la adición de AEC y E a bajas concentraciones tienen un mayor impacto sobre la velocidad de desarrollo y sobre el diámetro máximo del hongo comparado con el impacto que ejercen sobre el tiempo de adaptación durante el periodo de incubación. Es decir que bajas concentraciones de estos compuestos tienen un mayor efecto en el desarrollo de hifas y conidióforos, comparado con el menor efecto que ejercen sobre las conidias del hongo. Al escalar la posible adición de AEC como aditivo alimentario, es justo mencionar que este compuesto podría tener la capacidad para disminuir la velocidad de crecimiento de los hongos presentes en las tortillas de maíz. La adición de AEC ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) en tortillas de maíz podría prolongar su vida de anaquel por lo menos 63 h más a temperatura ambiente, puesto que este tratamiento retrasa el desarrollo del hongo durante este tiempo. Los ensayos del efecto antifúngico se realizaron a 25°C y las tortillas de maíz se almacenan a 5°C , por lo que la adición de AEC en este alimento en conjunto con las bajas temperaturas de su almacenamiento podrían potenciar el efecto antifúngico que podría prolongar la vida de anaquel de las tortillas de maíz por un tiempo mayor a 63 h.

El efecto de AEC, E e I sobre el crecimiento máximo de *Aspergillus niger* presentaron un comportamiento diferente en la fase de latencia (λ). Después de las 96 h de incubación AEC ($16,000$ y $8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) y E ($16,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) presentaron mayor efecto antifúngico ($p \leq 0.05$) sobre el crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria (A). Lo anterior, seguido de AEC ($4,000 \mu\text{g mL}^{-1}$), E ($8,000$ y $4,000 \mu\text{g mL}^{-1}$), I ($16,000$, $8,000$ y $4,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) similares entre sí. Finalmente, AEC ($2,000 \mu\text{g mL}^{-1}$), E ($2,000 \mu\text{g mL}^{-1}$), I ($2,000 \mu\text{g mL}^{-1}$), agua y etanol no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$). Los resultados sugieren que cada molécula cumple una función en el efecto antifúngico frente a *Aspergillus niger*, aunque en la fase de latencia (λ), I ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) no presenta diferencias con respecto a E ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Una vez transcurren 22.04 h el efecto antifúngico disminuye. Consecuentemente a las 96 h el crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria (A) en I ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) es similar a AEC ($2,000$ y $4,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) y es mayor a AEC ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) y E ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$). La fase de latencia (λ) es importante en el estudio del efecto antifúngico de AEC sobre *Aspergillus niger*, pero tiene mayor importancia sobre el crecimiento micelial, puesto que al reducir el crecimiento de hifas se puede reducir la producción de micotoxinas presentes (Hua *et al.*, 2014; Mirza Alizadeh *et al.*, 2022). Allam *et al.* (2012) reportaron una disminución de crecimiento micelial y erradicación del 100% de ocratoxina A, micotoxina producida por *Aspergillus niger*, al usar una concentración de $250 \mu\text{L L}^{-1}$ de AEC.

Previo a la búsqueda de compuestos naturales como el AEC para el control fúngico en alimentos, se han utilizado diversos conservadores convencionales como

los sorbatos y propionatos para controlar el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas en tortillas de maíz. La NOM-247-SSA1-2008 establece el límite máximo de algunos conservadores para tortillas de maíz como el ácido sórbico ($1,000 \text{ mg kg}^{-1}$) y el ácido benzoico ($1,000 \text{ mg kg}^{-1}$) (Secretaría de Salud de México, 2009). Mientras que el “Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias” (Diario Oficial de la Federación de México, 2012) publicó una lista de aditivos para diversos alimentos. Ésta establece el límite máximo a añadir de otros conservadores como el benzoato de calcio ($1,000 \text{ mg kg}^{-1}$) y sorbato de potasio ($2,000 \text{ mg kg}^{-1}$) en tortillas preenvasadas. La adición de cada conservador y su consumo prolongado puede tener efectos adversos a la salud, por ello, una alternativa natural puede ser la adición de compuestos naturales como el AEC. Tratando de hacer una equivalencia, el tratamiento de AEC ($8,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) en placas de PDA (15 g de agar) resulta en una concentración menor (53.3 mg kg^{-1}) a la concentración máxima de conservadores artificiales establecida para tortillas de maíz ($1,000\text{-}2,000 \text{ mg kg}^{-1}$). Por lo tanto, el AEC podría ser una alternativa natural para disminuir el crecimiento de hongos en las tortillas de maíz y con ello prolongar su vida de anaquel.

En este estudio se identificó la presencia del género *Aspergillus* en tortillas de maíz, en la industria de las tortillas de maíz se aplican aditivos artificiales principalmente sorbato de potasio y propionato de sodio; sus límites permitidos se encuentran en normas oficiales mexicanas (Secretaría de Salud de México, 2009). La incorporación de cualquier aditivo es capaz de modificar las características propias del alimento y la tortilla no es la excepción, ya que la adición de sorbatos o propionatos causa que esta cambie, dependiendo de la concentración de aditivos alimentarios, puede modificar su sabor y color (Báez-Aguilar *et al.*, 2022). La Secretaría de Salud de México, (2002) incluye el límite máximo permitido para el sorbato de potasio en las tortillas de maíz o harinas de maíz el cual indica un límite de $2,000 \text{ mg kg}^{-1}$; sin embargo, en 2002 se evaluó la concentración de aditivos en harinas de maíz comerciales y se encontró que la harina de maíz MASECA® contenía $4,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de sorbato de potasio (Flores Farías *et al.*, 2002).

Debido a las modificaciones que sufren las tortillas de maíz al ser aditivadas con conservadores artificiales como el sorbato de potasio y los efectos adversos a la salud por su consumo es que se buscan compuestos naturales que ejerzan la misma propiedad antimicrobiana (Jarkvist *et al.*, 2020; Pepper *et al.*, 2020). En el presente trabajo se encontró que se requieren concentraciones de AEC inferiores al límite permitido de conservadores artificiales (sorbato de potasio, $2,000 \text{ mg kg}^{-1}$) para disminuir la velocidad de crecimiento máximo (μ_m) y disminuir el crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria (*A*). Además, la dosis mínima letal media aguda oral (DL 50) de AEC ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$) es superior al DL 50 de E ($1,930$

mg kg⁻¹) e I (1,560 mg kg⁻¹), es decir, se necesita ingerir una mayor cantidad de AEC para que pueda ocasionar algún efecto secundario, por lo que AEC podría ser una alternativa con menor toxicidad (Parvitra, 2024; Roth, 2024). Con respecto al precio del AEC en el mercado (MXN\$3.7/g), es 2.3 y 4.1 veces menor respecto al precio de E e I (MXN\$8.6/g y MXN\$15.2/g), respectivamente (Sigma-Aldrich, 2023a, 2023b, 2023c). Lo anterior muestra que AEC es más asequible y con mayor efecto antifúngico que E o I, por lo que tiene una mayor capacidad para disminuir la cantidad de hongos presentes y prolongar la vida de anaquel de las tortillas de maíz.

CONCLUSIONES

Se identificaron nueve hongos en las tortillas de maíz de cinco estados de México por microscopía óptica, siete de los cuales se confirmaron molecularmente. Se encontró a *Mucor racemosus* y *Penicillium herquei* en Morelia, Mich, *Aspergillus longivesica* y *Curvularia spicifera* en Monterrey, N.L., *Aspergillus* sp. en Oaxaca, Oax, *Aspergillus niger* y *Penicillium brevicompactum* en Hermosillo, Son, *Aspergillus flavus* y *Mucor* sp. en Mérida, Yuc. La aplicación de AEC frente al crecimiento de *Aspergillus niger* demostró ser más eficaz para incrementar la fase de latencia (λ), disminuir el crecimiento máximo del hongo en la fase estacionaria (A) y la velocidad de crecimiento máximo (μ_m), con respecto E, I y AE. Además, la DL 50 y el precio del AEC en el mercado es menor que el de cada uno de sus componentes, lo que incrementa su potencial para controlar el crecimiento de hongos en tortillas de maíz y con ello prolongar su vida de anaquel.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a CONAHCYT por la beca otorgada a Ibarra-Valenzuela para la realización del posgrado. También agradecemos al Dr. Tomás Jesús Madera Santana, Dra. Citlali Colín Chávez, Dr. Marcos Morales y M.C. Joel Gerardo Cervantes Ramírez, quienes nos hicieron llegar las tortillas de maíz de cada estado.

REFERENCIAS

- Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR and Abbaszadeh A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale* 24(2): 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Akwuobu CA, Antiev WS and Ofukwu RA. 2019. Fungal contaminants of smoke-dried fish sold in open markets in Makurdi, Benue State. *Scientific Research Publishing* 10: 290–297. <https://doi.org/10.4236/fns.2019.103022>
- Allam NG, El-shanshoury AER, Emara HA and Zaky AZ. 2012. Decontamination of ochratoxin-A producing *Aspergillus niger* and ochratoxin A in medicinal plants by gamma irradiation and essential oils. *Journal of International Environmental Application*

- and Science 7(1): 161–169. https://www.researchgate.net/profile/Nanis-Allam/publication/266944166_Decontamination_of_Ochratoxin-A_Producing_Aspergillus_niger_and_Ochratoxin_A_in_Medicinal_Plants_by_Gamma_Irradiation_and_Essential_Oils/links/543fa14d0cf23da6cb5b5839/Decontamination-
- Báez-Aguilar ÁM, Arámbula-Villa G, Prinyawiwatkul W, López-Espíndola M, Ramírez-Rivera EJ, Contreras-Oliva A and Herrera-Corredor JA. 2022. Effect of calcium hydroxide mixed with preservatives on physicochemical characteristics and sensory shelf-life of corn tortilla. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 102(2): 688–695. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11399>
- Barupal T, Meena M and Sharma K. 2019. Inhibitory effects of leaf extract of *Lawsonia inermis* on *Curvularia lunata* and characterization of novel inhibitory compounds by GC–MS analysis. *Biotechnology Reports* 23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00335>
- Bevilacqua A, Speranza B, Sinigaglia M and Corbo M. 2015. A focus on the death kinetics in predictive microbiology: benefits and limits of the most important models and some tools dealing with their application in foods. *Foods* 4(4): 565–580. <https://doi.org/10.3390/foods4040565>
- Chaturvedi T, Singh S, Nishad I, Kumar A, Tiwari N, Tandon S, Saikia D and Verma RS. 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of senescent leaves of guava (*Psidium guajava* L). *Natural Product Research* 35(8): 1393–1397. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1648462>
- CONEVAL, Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. 2012. Construcción de las líneas de bienestar. https://www.coneval.org.mx/Informes/Coordinacion/INFORMES_Y_PUBLICACIONES_PDF/Construccion_lineas_bienestar.pdf (consulta, enero 2024).
- de Oliveira Pereira F, Mendes JM and de Oliveira Lima E. 2013. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. *Medical Mycology* 51(5): 507–513. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.742966>.
- Diario Oficial de la Federación de México. 2012. Aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5437267&fecha=16/05/2016#gsc.tab=0 (consulta, enero 2024).
- Díaz-García E, Valenzuela-Quintanar, A I, Sánchez-Estrada A, González-Mendoza D, Tiznado-Hernández M E, Islas-Rubio A R and Troncoso-Rojas R. 2024. Phenolic Compounds Synthesized by *Trichoderma longibrachiatum* Native to Semi-Arid Areas Show Antifungal Activity against Phytopathogenic Fungi of Horticultural Interest. *Microbiology Research*, 15(3): 1425–1440. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microbiolres15030096>
- Flores Farías R, Martínez Bustos F, Salinas Moreno Y and Ríos E. 2002. Characterization of commercial nixtamalized maize flours. *Agrociencia* 36: 557–567. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30236507.pdf>
- García Leañón ML, Aguirre Gómez JA, Narro Sánchez J, Cortés Baheza E and Rivera Reyes JG. 2007. Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en Guanajuato, México. *Agricultura Técnica En México* 33(3), 231–239. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172007000300002
- González-Mendoza D, Argumedo-Delira R, Morales-Trejo A, Pulido-Herrera A, Cervantes-Díaz L, Grimaldo-Juarez O and Alarcón A. 2010. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research* 9(1): 162–166. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20198572/>
- Guerra FL, Lopes W, Cazarolli JC, Lobato M, Masuero AB, Dal Molin DCC, Bento FM, Schrank A and Vainstein MH. 2019. Biodegradation of mortar coating in historical buildings : microclimatic characterization , material , and fungal community. *Building and Environment* 155: 195–209. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.03.017>
- Gupta L, Sen P, Bhattacharya AK, and Vijayaraghavan P. 2022. Isoeugenol affects expression pattern of conidial hydrophobin gene RodA and transcriptional regulators MedA and SomA responsible for adherence and biofilm formation in *Aspergillus fumigatus*. *Archives of Microbiology* 204(4): 214. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02817-w>
- Heer A, Guleria S and Razdan VK. 2017. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities and characterization of bioactive compounds from essential oil of *Cinnamomum tamala* grown in north-western Himalaya. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 26(2): 191–198. <https://doi.org/10.1007/s13562-016-0381-7>
- Heredia-Sandoval NG, Santiaguin-Padilla AJ, Granados-Nevarez MC, Scheuren-Acevedo SM, Islas-Rubio AR, Mazorra-Manzano MA, García-Sánchez G and Ramírez-Suarez C. 2021. Supplementation of corn tortilla with freeze-dried jumbo squid muscle flour : physicochemical properties and microbiological stability during storage. *Biotecnia*, 23(2), 9. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v23i2.1420>

- Hernández Cerda EM, Ordoñez Díaz JM y Giménez de Azcárate J. 2018. Análisis comparativo de dos sistemas de clasificación bioclimática aplicados en México. Investigaciones Geográficas 95. <https://doi.org/https://doi.org/10.14350/ig.57451>
- Hua H, Xing F, Selvaraj JN, Wang Y, Zhao Y, Zhou L, Liu X and Liu Y. 2014. Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. PloS One 9(9): 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108285>
- Ibarra Valenzuela AP. 2019. Evaluación de la actividad antimicrobiana de dos envases activos con aceite esencial de azahar (*Citrus aurantium*). En *Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A.C.* <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/browse?type=author&value=ANA+PATRICIA+IBARRA+VALENZUELA>
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2020. Censo de población y vivienda. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/ResultCenso2020_Nal.pdf.
- Jarkvist J, Brockow K y Gülen T. 2020. Low frequency of IgE-mediated food hypersensitivity in mastocytosis. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice 8(9): 3093–3101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaip.2020.05.044>
- Kim W B, Park C, Cho S Y, Chun, H S and Lee D G. 2020. Development of multiplex real-time PCR for rapid identification and quantitative analysis of *Aspergillus* species. Plos One, 15(3): e0229561. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229561>
- López-Morales F, Aragón-García A, Pérez-Torres B C, Vásquez-Carrillo G, Castillo-Hernández, D and Aragón Sánchez M. 2023. Identificación de hongos extraídos de tortillas de diferentes razas de maíz (*Zea mays* L.). Ecosistemas y Recursos Agropecuarios: 10(3). <https://doi.org/10.19136/era.a10n3.3453>
- López Ortiz D. 2016. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales en la vida de anaquel de tortillas de maíz.* Universidad Tecnológica de Tehuacán.
- Martínez Padrón HY, Hernández Delgado S, Reyes Méndez CA y Vázquez Carillo G. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. Revista Mexicana de Fitopatología 31(2): 126–146. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61231509005.pdf>
- Mirza Alizadeh A, Golzan SA, Mahdavi A, Dakhili S, Torki Z and Hosseini H. 2022. Recent advances on the efficacy of essential oils on mycotoxin secretion and their mode of action. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 62(17): 4726–4751. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1878102>
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2023. Information. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#sort_mark (consulta, junio 2022).
- NCSS, Number Cruncher Statistical Systems. 2023. Software NCSS. <https://doi.org/https://www.ncss.com/software/ncss/>
- Nguyen TTT, Jeon YJ, Mun HY, Goh J, Chung N and Lee HB. 2020. Isolation and characterization of four unrecorded *Mucor* species in Korea. Mycobiology 48(1): 29–36. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1703373>
- Parvitra. 2024. *Aceite esencial de clavo.* http://www.parvitra.com/img/Materias/Material16/file_safety_sheet16.pdf
- Pepper AN, Sriaroon P and Glaum MC. 2020. Additives and preservatives : Role in food allergy. Journal of Food Allergy USA 1: 119–123. <https://doi.org/10.2500/jfa.2020.2.200014>
- de Pereira Pererira F, Mendes JM and de Oliveira Lima E. 2013. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. Medical Mycology 51(5): 507-513. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.742966>
- Prajapati J, Rao P, Poojara L, Acharya D, Patel SK, Goswami D and Rawal RM. 2023. A comprehensive in vitro and in silico assessment on inhibition of cyp51b and ergosterol biosynthesis by eugenol in *Rhizopus oryzae*. Current Microbiology 80(1): 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03108-9>
- Rangel-Muñoz EJ, Valdivia-Flores AG, Moreno-Rico O, Hernández-Delgado S, Cruz-Vázquez C, de Luna-López MC, Quezada-Tristán T, Ortiz-Martínez R y Máyek-Pérez N. 2020. Caracterización de *Aspergillus flavus* y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México Introducción. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias 11(2): 435–454. <https://doi.org/https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.5686>
- Rooney LW and Serna-Saldivar SO. 2016. Tortillas. In Encyclopedia of Food Grains: 90–96. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00124-8>
- Roth. 2024. Eugenol e isoeugenol. <https://www.carlroth.com/medias/SDB-8662-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNzAyOTJ8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oMwUvaGMzLzkwNDIwOTU1MzgyMDYucGRmfGUxZTI2MDExOTIzNzQyYQyMzQ1OWRlYzU1Y2I3ZWU5MTdjYmlyYjU1O-TJINjAxNTRjYzNk>

- Secretaría de Salud de México. 1994. Norma oficial mexicana NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>.
- Secretaría de Salud de México. 2002. Norma oficial mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002. Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. *Métodos de prueba*. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/187ssa1scfi02.html>
- Secretaría de Salud de México. 2009. Norma oficial mexicana NOM-247-SSA1-2008. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009#gsc.tab=0
- Serna-Saldivar SO. 2015. History of corn and wheat tortillas. Tortillas: wheat flour and corn products. 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-1-891127-88-5.50001-3>
- Sigma-Aldrich. 2023a. Aceite esencial de clavo. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/search/aceite-de-clavo?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=ACEITE DE CLAVO&type=product>
- Sigma-Aldrich. 2023b. Eugenol. https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/e51791?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=10640610204&utm_content=113553655908&gclid=CjwKCAiA5L2tBhBTEiwAdSxJX252Q7QqtXZny3R4b06wSz2uGubFIfMZ8Xf-3KPyLPeMRnrEyDnluxoCPXkQAvD_BwE
- Sigma-Aldrich. 2023c. Isoeugenol. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/i17206>
- Soro AB, Oliveira M, Donnell CPO and Tiwari BK. 2021. Ultrasonics Sonochemistry Ultrasound assisted modulation of yeast growth and inactivation kinetics. *Ultrasonics Sonochemistry* 80. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105819>
- Standards Clinical and Laboratory Institute. 2018. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m38/>
- Tarhan İ. 2021. A robust method for simultaneous quantification of eugenol, eugenyl acetate, and β -caryophyllene in clove essential oil by vibrational spectroscopy. *Phytochemistry* 191. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112928>
- Ullah H, Simpson TJ, Alam S, Fatima K and Perveen S. 2010. Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley , North West Frontier Province of Pakistan. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1111–1116. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.02.004>.
- Wall-Martínez HA, Ramírez-Martínez A, Wesolek N, Brabet C, Durand N, Rodríguez- Jimenes GC, García-Alvarado MA, Salgado-Cervantes MA, Robles-Olvera VJ and Roudot AC. 2019. Risk assessment of exposure to mycotoxins (aflatoxins and fumonisins) through corn tortilla intake in Veracruz City (Mexico). *Food Additives and Contaminants: Part A* 36(6): 929–939. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1588997>
- Yin G, Zhao H, Pennerman KK, Li WMJ, Fu M, Bu L, Guo A and Bennett JW. 2021. Genomic analyses of *Penicillium* species have revealed patulin and citrinin gene clusters and novel loci involved in oxylipin production. *Journal of Fungi* 7(9): 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jof7090743>
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM and Van 't RK. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6): 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>