

Crecimiento de *Aspergillus flavus* en Maíz Tratado con Radiación Gamma y en Maíz Tratado con D-limoneno

Domínguez Sánchez A. M.¹, Rodríguez Neri S.^{1*}, Bañuelos Valenzuela R.², Vega Carrillo H. R.³ y Méndez Albores A.⁴

¹Unidad Académica de Ciencias Químicas, Campus UAZ-Siglo XXI,
Carr. a Guadalajara Km 6, Zacatecas, Zac. Mail*: srdzneri@hotmail.com.

²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Carr. Panamericana Km. 31.5 Calera de V. R., Zac.

³Unidad Académica de Estudios Nucleares, C. Cipres 10, Fracc. La Peñuela, Zacatecas, Zac.

⁴Unidad de Investigación de Granos y Semillas FES Cuautitlán, UNAM.,
Av Jorge Jiménez Cantú s/n. Colonia Atlamica CP 54729. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

RESUMEN:

Entre los diferentes métodos de descontaminación microbiana, se emplea la radiación gamma; sin embargo, este tipo de energía puede modificar la composición química; y por lo tanto, las propiedades biológicas de las especies vegetales. El D-limoneno es un terpeno natural. Se produce como metabolito secundario y es el componente principal de la cascara de la naranja y otros cítricos. Al D-limoneno se le han asociado propiedades antioxidantes y antifúngicas. Algunas especies de hongos están asociadas con enfermedades humanas. Otras causan enfermedades en animales. Otras son patógenas para las plantas y destruyen las cosechas y generan micotoxinas. Un representante de estas últimas es el *Aspergillus flavus* que produce aflatoxinas, particularmente en maíz; no existe método alguno de control del mismo en el maíz almacenado, solo medidas preventivas como vigilar la temperatura y la humedad en su almacenamiento. Entonces existe la necesidad de aplicar conservadores de origen natural, por lo que en este trabajo se pretendió determinar de manera comparativa el comportamiento del crecimiento del *Aspergillus flavus* en maíz tratado con radiación gamma y en maíz tratado con D-limoneno evaluado de forma indirecta a través de la cuenta viable.

ABSTRACT:

Among the different methods of microbial decontamination, gamma radiation is used; however, this type of energy can modify the chemical composition; and therefore, the biological properties of plant species. D-limonene is a natural terpene. It is produced as a secondary metabolite and is the main component of the orange peel and other citrus. D-limonene has been associated with antioxidant and antifungal properties. Some species of fungi are associated with human diseases. Others cause diseases in animals. Others are pathogenic to plants and destroy crops and generate mycotoxins. A representative of the latter is *Aspergillus flavus*, which produces aflatoxins, particularly in maize; there is no method of controlling it in stored maize, only preventive measures such as monitoring temperature and humidity in storage. There is therefore a need to apply conservers of natural origin, so that in this work we aimed to determine in a comparative way the growth behavior of *Aspergillus flavus* in maize treated with gamma radiation and in maize treated with D-limonene evaluated indirectly through of the viable account.

Palabras Clave (Key words): *Aspergillus flavus*, Desarrollo (Development), D-limoneno (D-limonene), Radiación gamma (Gamma radiation).

INTRODUCCIÓN

La irradiación gamma es una tecnología emergente segura y efectiva para la conservación de alimentos, al penetrarlos interactúa con los microorganismos presentes y lesiona su material genético (F. Gliemmo et al. 2012). El Codex Committee on Food Additives (CCFA) (1983) recomienda que la dosis máxima absorbida que se haya acumulado transmitida a un alimento no deberá exceder de 10 kGy como consecuencia de una irradiación repetida, excepto cuando ello sea necesario para lograr una finalidad tecnológica legítima, y no deberá comprometer la seguridad del consumidor ni la salubridad del alimento. Entre los diferentes métodos de descontaminación microbiana, se emplea la radiación gamma; sin embargo, se sabe que este tipo de energía puede modificar la composición química; y, por lo tanto, las propiedades biológicas de las especies vegetales. La dosis mínima de descontaminación es de 12-15 kGy para aerobios mesófilos y de 1-8 kGy para los hongos, dependiendo del ecotipo (J. Carrión et al. 2009).

El grupo más abundante de fitopatógenos lo forman los hongos, los que posiblemente aparecieron antes que las plantas en la tierra y a través de su evolución se relacionaron con todos los demás grupos de seres vivos (Montes, 2009). En un estudio mensual dirigido durante un año en frutas y hortalizas que se expendieron en el mercado de Xalapa Veracruz, México, se aislaron 27 especies de hongos que causan su deterioro, de ellas 24 se han reportaron como capaces de producir metabolitos bioactivos como antibióticos, antifúngicos, antivirales, bactericidas, citotoxinas, fitoalexinas, fitotoxinas, herbicidas, insecticidas y, sobre todo, micotoxinas, asimismo de estas especies 14 fueron capaces de sintetizar diferentes micotoxinas, perjudiciales para la salud del hombre y animales. Estos datos, indican que la presencia de dichos hongos puede representar un posible riesgo, cuando infestan frutas y hortalizas antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento. Un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxina, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud de la población de países importadores de alimentos que no controlan estos contaminantes (Trigos et al. 2008). En estudios sobre pérdidas en postcosecha de frutos de fresa realizados en los mercados de Nueva York y Chicago, EUA, éstas ascendieron a 28.8 y 41.2%, debidas a daños mecánicos y pudriciones causadas por hongos principalmente (Fraire et al. 2003). Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas producidas en regiones tropicales y subtropicales, como ya se mencionó, son metabolitos secundarios de los mohos que contaminan granos de cereales, principalmente de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus Parasiticus*. Las aflatoxinas son hepatocarcinógenas, también estos mohos causan pérdidas sustanciales de rendimiento y frecuentemente tiene un efecto perjudicial sobre la calidad del grano (Neeven et al. 2015).

Por otro lado, los aceites esenciales y extractos obtenidos a partir muchas plantas han adquirido recientemente una gran popularidad e interés científico como antimicrobianos. También se observa que la demanda de conservadores naturales aumenta, mientras que el aspecto de la seguridad de los aditivos químicos es cuestionada (Sumonrat et al. 2008). Los

aceites esenciales de canela y orégano son una alternativa de aplicación práctica en la inhibición de hongos que producen aflatoxinas en nuez almacenada. Estos aceites esenciales pueden ser usados como sustitutos de fungicidas químicos ya que son inocuos y biodegradables. La actividad antifúngica de estos aceites esenciales es debida a su contenido de eugenol y carvacrol respectivamente (García et al. 2006). Se ha probado que los terpenos son los principales compuestos de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Su efecto antimicrobiano está basado en su habilidad para dañar las biomembranas. En función de sus características lipofílicas interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren procesos vitales como la ósmosis y la síntesis de esteroides y fosfolípidos. Se conoce que el cineol reduce la división celular y que el D-limoneno, el α -pineno y el β -pineno inhiben el consumo de oxígeno (Montes, 2009). Estudios in-vitro muestran que el D-limoneno induce alteraciones en los ácidos grasos de la membrana en bacterias. Otras investigaciones encontraron que los aceites esenciales inhiben el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*, particularmente por afectación de las membranas mitocondriales (J. Liu et al. 2012). El D-limoneno es un terpeno monocíclico, es el compuesto predominante en la cascara de naranja, limón y mandarina; ha sido utilizado en diversos procesos industriales químicos, farmacéuticos y alimentarios, como solvente industrial, materia prima para la fabricación de otros compuestos químicos y componente aromático entre otros (Arias et al. 2007; Castellanos, 2007).

El aceite esencial de la cascara de lima, limón y naranja contiene más del 90 % de D-limoneno, componente mayoritario en su composición normal y además, en menor proporción poseen una gran cantidad de terpenos, su rendimiento promedio es del 0.2 al 1.5% (Yáñez et al. 2007; R. Juárez et al. 2010; Colecio et al. 2012).

En los aceites esenciales hay una correlación entre la actividad antifúngica y el porcentaje de algunos de los componentes mayoritarios. El aceite esencial de *Pinus pinea* se caracteriza por su relativo alto contenido de limoneno (54.1%), que podría ser responsable de la actividad antifúngica. De hecho se ha afirmado que la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de cítricos se debe a la presencia de limoneno (Amri et al., 2012).

Los frutos, los cereales, así como los alimentos procesados ricos en carbohidratos son los más susceptibles al ataque de los mohos. Para los primeros no existe método alguno de control de hongos, solo medidas preventivas como vigilar la temperatura y la humedad en su almacenamiento, para los segundos se utilizan conservadores químicos como los benzoatos y los sorbatos, existiendo la necesidad de desarrollar y aplicar antifúngicos de origen natural.

Los hongos en el almacenamiento de alimentos son comúnmente controlados por compuestos sintéticos, entre ellos se encuentran los pesticidas utilizados para proteger cultivos, los fungicidas han sido percibidos como relativamente seguros. La Academia Nacional de Ciencias (NAS) reportó (1987) acerca de los residuos de plaguicidas en alimentos, indicaron que los fungicidas poseen mayor riesgo cancerígeno que los insecticidas y herbicidas juntos. Por lo tanto, los fungicidas sintéticos deben reducirse al mínimo en la cadena alimentaria. Entonces la presión se ha incrementado para encontrar alternativas más seguras. Adicionalmente, la resistencia de los patógenos a los fungicidas los ha tornado ineficaces, creando la necesidad de desarrollar nuevos productos con modos alternativos de acción. Como resultado de la creciente conciencia pública sobre el efecto contaminante, residual, carcinogénico y fitotóxico de muchos fungicidas sintéticos, la importancia de productos indígenas alternativos para controlar hongos micotoxigénicos ha ganado popularidad. Hoy en día, el interés por el uso de antimicrobianos naturales está creciendo, especialmente los de hierbas, plantas y especias (o sus componentes), los cuales son ingredientes tradicionales o

potenciadores de sabor (R. Bluma et al., 2008; Valenzuela-Cota et al., 2014). En virtud de lo anterior, el objetivo general de este estudio fue determinar de manera comparativa el comportamiento del crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con radiación gamma y en maíz tratado con D-limoneno.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental que se ajustó para medir el crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con D-limoneno y con Radiación gamma fue en bloques completos al azar, en donde éste se evaluó en primer lugar a través del crecimiento del moho de manera sistemática sobre un sustrato natural (maíz triturado inoculado con *Aspergillus flavus*), tratado a diversas concentraciones de D-limoneno (ocho niveles o tratamientos). En segundo lugar, la medición igual del crecimiento, sobre el mismo sustrato natural, pero irradiado a diversas dosis de radiación gamma (ocho niveles o tratamientos), finalmente en cada nivel se realizaron tres observaciones ver Tabla 1. El grado de crecimiento del moho se determinó de manera indirecta a través de una cuenta viable (Aguirre, 2010; Fundibeq, 2015).

Tabla 1. Diseño experimental con dos bloques, 2 factores, ocho tratamientos y tres repeticiones.

Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en Presencia de D-limoneno									
	Concentración de D-limoneno (%)								
Muestras L	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	L01	L11	L21	L31	L41	L51	L61	L71	L81
	L02	L12	L22	L32	L42	L52	L62	L72	L82
	L03	L13	L23	L33	L43	L53	L63	L73	L83
Crecimiento de <i>Aspergillus flavus</i> en Presencia de Radiación gamma									
	Dosis de Radiación (kGy)								
Muestras R	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
	R01	R051	R11	R151	R21	R251	R31	R351	R41
	R02	R052	R12	R152	R22	R252	R32	R352	R42
	R03	R053	R13	R153	R23	R253	R33	R353	R43

La cepa del moho que se aplicó en la inoculación del sustrato natural fue adquirida por donación de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas, FESC-UNAM; donde fue clasificada como *Aspergillus flavus* 1231 y fue seleccionada por su capacidad de producir las aflatoxinas AFB1 y AFB2 (Méndez-Albores et al. 2009).

La cepa fue reactivada sembrándola por estría en Papa Dextrosa Agar (MCD-LAB) en tubos inclinados e incubados a 25 ° C por 6 días. A los tubos de cultivo anteriores se les adiciono una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % en agua destilada, invirtiéndolos 20 veces para homogenizar la distribución de las esporas. El número de esporas por mililitro en la solución se determinó a través del conteo microscópico de las mismas, utilizando una cámara de Neubauer (LO-Laboroptik). Realizado el recuento se hicieron las diluciones necesarias y cada muestra de 75 g depositada en bolsa de polietileno, quedo inoculada con 290,215 esporas/g (Mejia et al., 2008).

El sustrato natural que se usó para el desarrollo del hongo fue maíz variedad cónico norteño, se molió dos veces en un molino rustico (Victoria), posteriormente se esterilizo a 121 °C por 15 minutos y luego se deshidrato en un horno (Felisa) a 105 °C por 24 horas. Para favorecer el desarrollo del moho, al sustrato se le mezcló con una cantidad de agua destilada y se ajustó la cantidad de maíz para lograr una humedad en las muestras del 30%. Para el ensayo con D-limoneno el agua adicionada también sirvió como solvente para preparar las concentraciones de D-limoneno (Sigma-Aldrich). Las concentraciones utilizadas fueron 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 %. Para favorecer la dispersión del D-limoneno al agua destilada se le adicionó Tween 80 al 0.1 % como tensoactivo. El maíz triturado, humedecido, dosificado con el D-limoneno e inoculado fue depositado en bolsas de polietileno como ya se mencionó. Para el ensayo de irradiación gamma, las muestras se prepararon de forma similar pero sin adicionarles D-limoneno; se irradiaron en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) con un irradiador de ^{60}Co (Transelektro LG1-01), las dosis aplicadas fueron 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, y 4 KGy. El total de las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente entre 18 y 25 °C por 21 días. En este tiempo y para generar un ambiente de aerobiosis y así propiciar el crecimiento del moho, las muestras se abrieron por unos minutos a intervalos de 6 días dentro de una campana de flujo laminar (CHC biolus). Pasado el tiempo se mantuvieron en refrigeración a 2 °C hasta realizarles la cuenta viable. Para la cuenta viable se prepararon 6 diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y cada dilución se sembró por duplicado de acuerdo al Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Este método se complementa con los procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico, con la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico y con el método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (COFEPRIS, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos al aplicar el diseño experimental para medir el crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con D-limoneno y con radiación gamma se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente. La variable a correlacionar en ambos tratamientos fue el crecimiento del moho en UFC/g. Para obtener una visión integral del comportamiento de la variable ya mencionada se obtuvieron los logaritmos de los resultados promedio obtenidos, así como las gráficas correspondientes.

En la tabla 2 se muestran los resultados promedio de las UFC/g del crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con D-limoneno a concentraciones de 0 al 8 %. Los datos muestran que a las concentraciones 2, 3 y 4 % hay una estimulación del crecimiento del hongo, obteniéndose el máximo a la concentración del 2 % donde el crecimiento llega a ser de 27

veces comparado con el valor del testigo. Sin embargo, también se observa que en las concentraciones 1, 5, y 8 % hay una clara inhibición del crecimiento del moho, ocurriendo la mayor inhibición a las concentraciones del 5 y 8 %, en esta última la inhibición del crecimiento llega a ser del 99.9 % en relación al testigo. El comportamiento de los datos anteriores señala una progresiva inhibición del crecimiento del moho en función del incremento de la concentración de D-limoneno que se observa en la figura 1.

En la tabla 2, también se muestran los resultados del logaritmo promedio de las UFC/g del crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con radiación gamma a dosis de 0 a 4 kGy. Los datos muestran que a las dosis de 2, 2.5 y 3 kGy hay una estimulación del crecimiento del hongo, obteniéndose el máximo crecimiento a la dosis de 2 kGy, en donde éste llega a ser de 29 veces el valor del testigo. También se observa que a las dosis 0.5, 1, 1.5, 3.5 y 4 kGy se produce la inhibición del crecimiento del moho y que a las dosis de 0.5, 1.5 y 3.5 kGy la inhibición es de alrededor del 99.9 % en relación al testigo. El comportamiento grafico de los datos anteriores se presenta en la figura 2. En ella se observa que los máximos y mínimos en los resultados son similares conforme se incrementa la concentración de D-limoneno al igual que la dosis de radiación, particularmente a 4 y 6 % de D-limoneno y 2 y 3 kGy respectivamente. Sin embargo, el comportamiento es diferente a 7 y 8 % de D-limoneno, 3.5 y 4 kGy respectivamente, en donde se marcan en mayor grado las diferencias en los tratamientos y como el D-limoneno afecta más el crecimiento del moho por sobre la radiación gamma.

De acuerdo con el comportamiento logarítmico de la variable, el mejor de los dos tratamientos aplicados y que disminuye de mejor manera el desarrollo del *Aspergillus flavus* en maíz, es el D-limoneno, dado que reduce el crecimiento del moho conforme se incrementa su concentración, dicha reducción es progresiva como ya se mencionó. Lo anterior no ocurre con la radiación gamma.

Tabla 2. Crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con D-limoneno y en maíz tratado con radiación gamma.

Concentración de D-limoneno (%)	Promedio (UFC)/g	Log UFC/g	Dosis de radiación (kGy)	Promedio (UFC)/g	Log UFC/g
0	124318	5.09	0	124317	5.09
1	20083	4.30	0.5	13	1.11
2	3455731	6.54	1	630	2.80
3	259011	5.41	1.5	22	1.34
4	376179	5.58	2	3771761	6.58
5	6151	3.79	2.5	446503	5.65
6	64342	4.81	3	166830	5.22
7	47268	4.67	3.5	169	2.23
8	168	2.23	4	10100	4.00

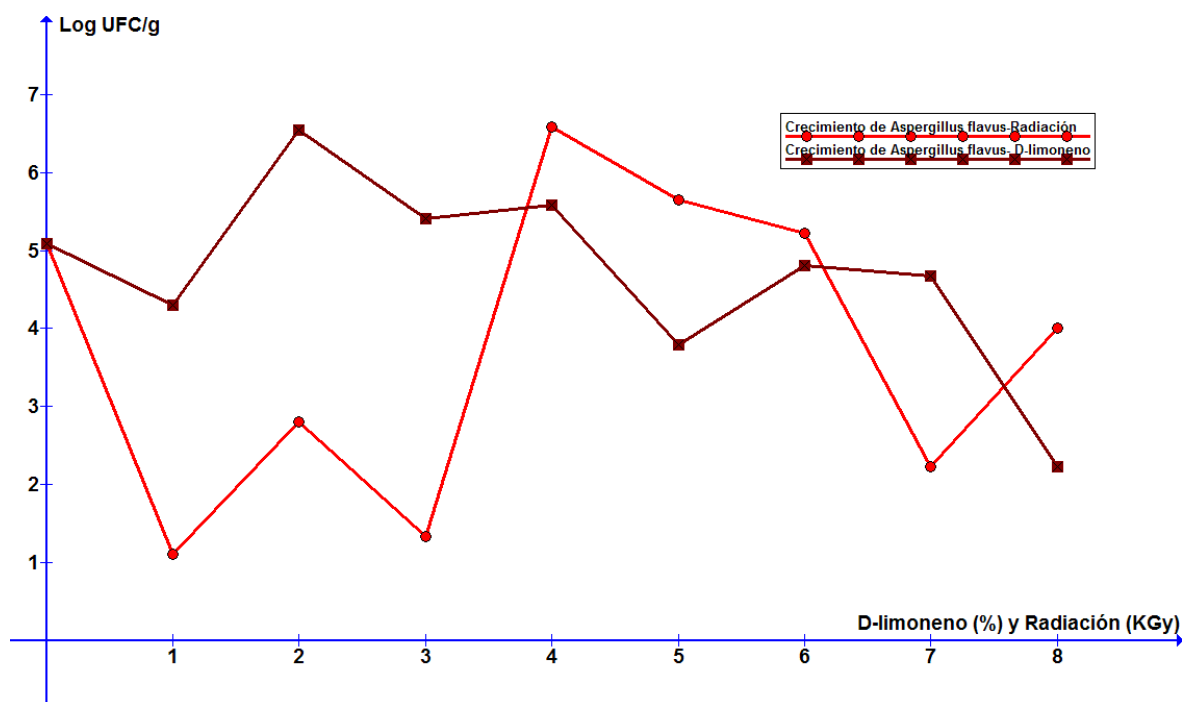


Figura 1. Crecimiento de *Aspergillus flavus* en maíz tratado con D-limoneno y en maíz tratado con radiación gamma.

CONCLUSIONES

La adición de D-limoneno a maíz a almacenar es un tratamiento químico natural, que controla de mejor manera que la radiación gamma el crecimiento del *Aspergillus flavus*

Se observó que ambos tratamientos disminuyen el desarrollo del moho pero con diferente intensidad, falta indagar en qué punto utilizando dosis y concentraciones más altas los dos coinciden en la eliminación del microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre H. V., (2010). Diseños experimentales: breve semblanza de su importancia en las ciencias naturales. Ciencia y Mar, XIV (40): 45-52.

Amri I., Gargouri S., Hamrouni L. Hanana M., Fezzani T. y Jamoussi B. (2012). Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil. J. Pest. Sci. 85:199-207.

Arias G. P., Stashenko E., Torres R. (2007) Biotransformación de terpenos D-limoneno, α -pineno y terpineno por medio de cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. Scientia et Technica. Vol XIII, número 033. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia pp 75-78.

Castellanos Molina F. E. (2007). Biotransformación de limoneno, α -pineno y aceites esenciales de naranja y mandarina empleando *Aspergillus niger*. Tesis de Maestría. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Bucaramanga.

Codex Committee on Food Additives (CCFA). CODEX STAN 106-1983. Norma General para Alimentos irradiados. CODEX ALIMENTARIUS, Normas Internacionales de los Alimentos OMS-FAO. <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/es/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CODEX> (Consultada 29/Marzo/2017).

<http://www.cofepris.gob.mx/Paginas/Inicio.aspx>. NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. NOM-109-SSA1-1994. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. (Consultada 02/10/2013)

Colecio-Juárez M C., Rubio-Núñez R E., Botello-Álvarez J E., Martínez-González G M., Navarrete-Bolaños J L., y Jiménez-Islas H (2012). Characterization of volatile compounds in the essential oil of sweet lime (*Citrus limetta* Risso). Chilean Journal of Agricultural Research 72(2) April-June.

Fraire-Cordero M. L., Yáñez-Morales M. J., Nieto Ángel D., y Vázquez-Gálvez G. (2003). Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología Volumen 21, Número 3: 285-291.

F. Gliemmo M., E. Latorre M., Narvaiz P., A. Campos C. y N. Gerschenson L. (2012). Effect of gamma irradiation and storage time on microbial growth and physicochemical characteristics of pumpkin (*Cucurbita Moschata* Duchesne ex Poiret) puree. Food Science and Technology International 20(1) 71–80.

<http://www.fundibeq.org> (Consultada 21/03/15)

García-Camarillo E.A., Quezada-Viay Y., Moreno-Lara J. Sánchez-Hernández G., Moreno-Martínez E., Y Pérez-Reyes M. C. J. (2006). Actividad Antifúngica de Aceites esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Oryganum vulgare* L.) y su Efecto Sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangerh) K. Koch]. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España Y Portugal. 1(24): 8-12.

J. Carrión., K. León., J. Santiago (2009). Actividad antioxidante de tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii walp*) Tratada con radiación gamma. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 12 N.º 2. Págs. 72-77.

J. Liu, Y. Zhu, G. Du, J. Zhou, and J. Chen (2012). Exogenous ergosterol protects *Saccharomyces cerevisiae* from D-limonene stress. Journal of Applied Microbiology 114, 482—491. The Society for Applied Microbiology

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Mejía-Agüero L. E., Amaury Martínez R. I, y Dorta B. (2008). Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Production in Stored Maize Grains Exposed to Volatile Compounds of *Trichoderma harzianum* RIFAI. *Interciencia*. VOL. 33 N° 3: 219-222).

Méndez-Albore A., Martínez-Bustos F., Véles-Medina J. J., Moreno-Ramos C., Del Río-García J. C. y Moreno-Martínez E. (2009). Efecto de La Adición de Ácido Cítrico Sobre la Degradación de las Aflatoxinas y las Propiedades Funcionales de Productos Extrudidos de Sorgo. *INTERCIENCIA*, VOL. 34 N° 4.

Montes B. R. (2009) Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 29:pp 74-82.

Neeven Fahmy Mohamed, Rasha Said Shams El-Dine, Metwally Aly Metwally Kotb and Aida Saber (2015). Assessing the Possible Effect of Gamma Irradiation on the Reduction of aflatoxin B1, and on the Moisture Content in Some Cereal Grains. *Am. J. Biomed. Sci.* 7(1), 33-39.

R. Bluma, M.R. Amaiden, J. Daghero and M. Etcheverry (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 105, pp 203–214.

R. Juárez J., J. Castro A., F. Jaúregui J., V. Lizano J., Carhuapoma M., F. Choquesillo F., M. Félix L., A. Cotillo P., P. López J., R. Jaramillo M., I. Córdova A., R. Ruíz J. y J. Ramos N. (2010). Chemical composition, antibacterial activity of essential oil *Citrus sinensis* L. (Sweet orange) and formulation of a pharmaceutical form. *Ciencia e Investigación*; 13(1): 9-13.

Sumonrat Chanthaphon, Suphitchaya Chanthachum, y Tipparat Hongpattarakere (2008) Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus spp.* against food-related microorganisms. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.* 30 (Suppl.1), 125-131.

Trigos A., Ramírez K., Salinas A. (2008). Presencia de Hongos Fitopatógenos en Frutas y Hortalizas y su Relación en la Seguridad Alimentaria. *Revista Mexicana de Micología* 28: 125-129.

Valenzuela-Cota D. F., Buitimea-Cantúa G. V., Rosas-Burgos E. C., Cinco-Moyoqui F. J., Yépiz-Gómez M. S., Cortez Rocha M. O., Plascencia-Jatomea M. y Burgos-Hernández A. (2014). The antifungal effect of *Jacquinia macrocarpa* plant extracts on the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. *Revista Mexicana de Micología*. 39: 1-11.

Yáñez Rueda X, Lugo Mancilla L. L, Parada Parada D. Y (2007). Estudio del aceite esencial de la cascara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander Colombia). *BISTUA* vol. 5 No. 1 p 3-8.