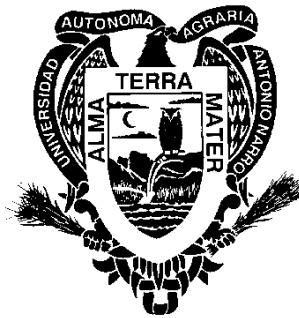


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**



**Hongos Micotoxigénicos y Aflatoxinas en Granos de Maíz de  
Diferentes Orígenes Geográficos de la República Mexicana.**

Por:

**VERÓNICA VEGA ORTIZ**

**TESIS**

Presentada como requisito parcial para  
obtener el título de:

**Ingeniero Agrónomo Parasitólogo**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

**Mayo 2012**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”**

**División de Agronomía**

**Departamento de Parasitología**

**Hongos Micotoxigénicos y Aflatoxinas en Granos de Maíz de  
Diferentes Orígenes Geográficos de la República Mexicana.**

**Por:**

**VERÓNICA VEGA ORTIZ**

**T E S I S**

**Presenta como requisito parcial para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

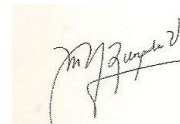


**Dr. Alberto Flores Olivas  
Asesor Principal**



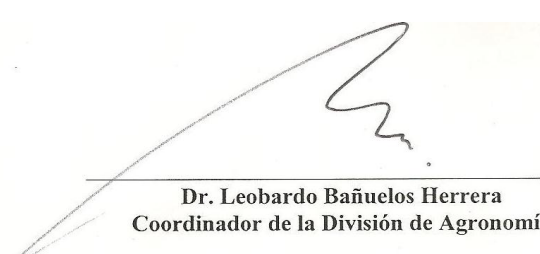
---

**MC. Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga  
Coasesor**



---

**Dra. Martha Yolanda Quezada  
Viay  
Coasesor**



---

**Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.  
Mayo 2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UAAAN, por la misión tan afortunada que tiene ante México, la educación.

A los profesores que influenciaron en mi formación.

A mi familia que me alentó y apoyo durante todos estos años; a mi papá por su inagotable comprensión, a mi mamá por su sinceridad, y a mis hermanos, Gracias! :)

A mis abuelitos, por compartir abundantemente su frecuencia inamovible en amor.

Y a todos mis tíos.

Con admiración, a la M.C. Andrea Arrúa, por contagiarme su emoción hacia el estudio de estos hongos y por su alegría siempre transmitida, por su apoyo y dedicación. Dicen que viajando, se fortalece el corazón... y eso fue lo que sucedió en México.

A la Doctora Martha Quezada, por abrirme con sinceridad las puertas para trabajar este tema, fue muy grato convivir.

Al Doctor Alberto Flores O.

A mis compañeros, por las alegrías compartidas: Alfonso, Mayo, Jonathan, Gabriel, Eduardo, Roberto, Braulio, José Luis y Oscar.

Al cosmos, las energías que se unieron para lograr esto, y a quienes las movimos.

## DEDICATORIA

Con asombro para *Aspergillus*, ya que en el maravilloso mundo microscópico, es un guerrero, es impresionante la belleza que se esconde en esas minúsculas formas de vida tan evolucionadas.

Porque solo me toco descubrir lo grandioso que son, con qué derecho tratar de destruirlos, si solo hacen lo que vinieron a hacer, si ellos estuvieron mucho antes que nosotros, somos los mismos minerales...

Con su pequeñez, reflejan su grandeza!

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INDICE DE CONTENIDO.....	v
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE GRÁFICAS.....	x
INDICE DE APENDICES.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
El maíz en México.....	4
Pérdidas causadas por hongos en el cultivo del maíz.....	4
Micotoxinas.....	5
Micotoxinas en México.....	9
Aflatoxinas.....	10
Toxicología.....	12
Toxicidad de las aflatoxinas.....	13
Toxicidad aguda.....	13
Toxicidad crónica.....	13
Ingesta diaria.....	14
<i>Aspergillus</i> en maíz.....	14
Aflatoxinas en México.....	15
Identificación de especies de <i>Aspergillus</i> productoras de aflatoxinas.....	16
Morfología.....	16
Otros métodos de identificación de <i>Aspergillus</i> .....	18
Métodos basados en la utilización de medios de cultivo diferenciales.....	18
Métodos de análisis de aflatoxinas.....	18
Ciclo de vida de <i>Aspergillus flavus</i> .....	20

Factores que condicionan la presencia de aflatoxinas.....	23
Temperatura y humedad.....	23
El hongo y la microbiota asociada.....	24
Sustrato.....	24
Control de la contaminación por aflatoxinas.....	25
En campo.....	25
En almacén.....	25
Gases.....	26
pH.....	26
Revestimiento de semillas con harina de roca y ceniza.....	26
Destoxificación.....	27
Tratamiento físico.....	28
Tratamiento químico.....	28
Nixtamalización.....	28
Tratamientos biológicos.....	28
Legislación.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Muestreo.....	31
Micobiotas.....	31
Obtención de cultivos monospóricos.....	32
Identificación de especies de <i>Aspergillus</i> y caracterización de cepas.....	32
Detección de aflatoxinas.....	33
Identificación del tipo de aflatoxina.....	33
Cuantificación de aflatoxinas.....	33
Diseño estadístico.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Presencia de hongos potencialmente micotoxigénicos en granos de maíz.....	35
Caracterización de aislados de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> y aflatoxinas.....	38
Morfología.....	38
Producción de aflatoxinas.....	40

Fluorescencia bajo luz UV en ACY.....	40
Identificación del tipo de toxina por cromatografía en capa fina.....	41
Cuantificación de aflatoxinas por el método VICAM.....	42
Análisis estadístico.....	43
CONCLUSIONES.....	44
LITERATURA CITADA.....	45
APENDICES.....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Micotoxinas en la historia.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Efectos tóxicos agudos y crónicos observados en vertebrados superiores.	8
<b>Cuadro 3.</b> Incidencia de micotoxinas por zonas geográficas.....	9
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de micotoxinas de acuerdo al riesgo que presentan para la salud humana.....	12
<b>Cuadro 5.</b> Límites establecidos en la NOM (Norma Oficial Mexicana)-187-SSAI/SCFI-2002.....	29
<b>Cuadro 6.</b> Límites permitidos por la FDA de los EU para aflatoxinas en alimentos.	29
<b>Cuadro 7.</b> Límites máximos de aflatoxinas admitidos por la Unión Europea.....	30



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura química de AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> y AFG <sub>2</sub> .....	11
<b>Figura 2.</b> <i>Aspergillus flavus</i> en maíz.....	14
<b>Figura 3.</b> Conidióforos de <i>Aspergillus</i> .....	16
<b>Figura 4.</b> Ornamentación de las esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. flavus</i> y la cabezuela conidial monoseriada de <i>A. parasiticus</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Infección heterogénea de <i>A. flavus</i> en maíz.....	20
<b>Figura 6.</b> Ciclo de infección del maíz por <i>A. flavus</i> en campo.....	22
<b>Figura 7.</b> Zonas de colecta.....	31
<b>Figura 8.</b> Conidióforo de <i>Penicillium</i> , cabezuelas de <i>Aspergillus parasiticus</i> , cabezuelas de <i>A. flavus</i> y conidias de <i>Fusarium</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> Caja Petri con AFPA, indicando presencia de <i>A. flavus</i> .....	38
<b>Figura 10.</b> Esclerocios tipo S y L.....	39
<b>Figura 11.</b> Cepa altamente productora de esclerocios y cepa no productora.....	39
<b>Figura 12.</b> Cabezuelas conidiales mono y biseriadas de <i>Aspergillus flavus</i> .....	40
<b>Figura 13.</b> Placas cromatográficas con fluorescencia indicativa de AFG y AFB bajo luz UV.....	41
<b>Figura 14.</b> Placa cromatográfica con fluorescencia verde indicativa de AFG bajo luz UV.....	41

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	<b>Pág.</b>
<b>Grafica 1.</b> Hongos con potencial micotoxigénico presentes en muestras de 14 puntos geográficos de la República Mexicana.....	35
<b>Grafica 2.</b> Cepas de hongos con potencial micotoxigénico aisladas, por origen geográfico.....	37
<b>Grafico 3.</b> Producción de aflatoxina por cepa.....	42
<b>Grafica 4.</b> Distribución del tipo de esclerocios.....	43

## ÍNDICE DE APÉNDICES

	<b>Pág.</b>
<b>Apéndice 1.</b> Hongos con potencial toxigénico identificados en muestras provenientes de los 14 orígenes geográficos en estudio.....	55
<b>Apéndice 2.</b> Claves designadas a las cepas del género <i>Aspergillus</i> aisladas.....	56
<b>Apéndice 3.</b> Características morfológicas y toxicológicas de las cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> aisladas.....	57
<b>Apéndice 4.</b> Tipo de toxinas presentadas.....	62
<b>Apéndice 5.</b> Cantidad de aflatoxina por cepa.....	64

## RESUMEN

Los hongos con potencial micotoxigénico pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, éstos producen metabolitos secundarios capaces de causar síndromes llamados micotoxicosis en el hombre y en los animales. Las aflatoxinas, producidas por el género *Aspergillus*, pueden contaminar grano de maíz en diferentes etapas, estas toxinas en concentraciones muy bajas tienen efectos negativos en la salud del hombre y los animales.

Para detectar la presencia de hongos con potencial micotoxigénico y aflatoxinas en maíz, de diferentes puntos geográficos de México, se obtuvieron muestras de maíces en campo, silos y restos de cultivo de: Chiapas, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas. Se encontró que los hongos potencialmente toxigénicos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Fusarium* y *Penicillium*, están ampliamente distribuidos en los 14 estados analizados. El patógeno con mayor incidencia fue *Fusarium* con un porcentaje de 76.99 %, seguido de *A. flavus* 11.72 %, *Aspergillus parasiticus* 0.57 % y *Penicillium* 0.53 %.

65 cepas aisladas que presentaron características típicas del género *Aspergillus*, se sembraron en el medio diferencial *Aspergillus Flavus* and *Parasiticus* agar (AFPA), donde fue confirmada la presencia de este género y las especies *A. flavus* y *A. parasiticus*. Se realizó su caracterización morfológica macro y microscópicamente, siguiendo claves taxonómicas para su identificación, donde 62 fueron identificadas como *A. flavus*, y 3 como *A. parasiticus*.

Estas cepas se sembraron en medio agar czapek con extracto de levadura (ACY) para observar la presencia de aflatoxinas bajo luz ultravioleta (UV). Todas las cepas dieron resultados positivos, por lo que se procedió a identificar el tipo de aflatoxina producida con el uso de placas cromatográficas, 65 cepas mostraron fluorescencia azul, indicativa de Aflatoxina B (AFB) y las tres cepas de la especie *A. parasiticus* presentaron además fluorescencia verde indicativa de aflatoxina G (AFG).

La cuantificación de aflatoxinas se realizó por el método Aflatest de Vicam, modificado, donde todas las cepas rebasaron los límites máximos permitidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSAI/SCFI-2001 establecidos en 20 ppb, para harinas y cereales, ya que las concentraciones de aflatoxinas variaron de entre 22 y 2250 ppb.

A los 10 días de crecimiento, las cepas que presentaron esclerocios fueron analizadas, se cuantificó, midió y determinó la forma de los mismos. De 65 cepas aisladas, 54 produjeron esclerocios; en 33 cepas, los esclerocios fueron del tipo L, con un promedio de  $451 \pm 35.53$   $\mu\text{m}$  de diámetro, en 21 cepas los esclerocios fueron del tipo S, con un diámetro promedio de  $294 \pm 71.64$   $\mu\text{m}$  y 11 cepas, no produjeron esclerocios.

El análisis estadístico de datos arrojó una correlación positiva entre la cantidad de aflatoxina, con el tipo y número de esclerocios, ya que a mayor producción de estos, mayor cantidad de aflatoxina, y a medida que los esclerocios disminuyen su tamaño, la cantidad de aflatoxina aumenta.

## INTRODUCCIÓN

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social (Barkin, 2003). Durante su desarrollo, procesamiento y almacenamiento, se ve expuesto al ataque de hongos micotoxigénicos. Estos hongos producen metabolitos secundarios con propiedades carcinogénicas, oncogénicas, teratogénicas, embriotóxicas y hepatotóxicas, afectando también los sistemas hormonales, respiratorio e inmunológico, por lo que se consideran de alto riesgo para la salud humana y de los animales (Soriano 2007; Murray *et al.*, 2006; Miller, 1994). Los principales hongos productores de toxinas se encuentran en los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Resnik, 1997).

Las micotoxinas más importantes desde el punto de vista económico y toxicológico son las aflatoxinas, producidas por hongos del género *Aspergillus*, ya que entre sus metabolitos tóxicos, se encuentra la Aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>), considerada como la sustancia con potencial carcinogénico más elevado que existe en la naturaleza. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* son los principales productores (Rodrigues *et al.*, 2007; Ruíz y Font, 2007).

La ubicación geográfica de México, favorece la infección y síntesis de micotoxinas de *Aspergillus*, ya que la contaminación por aflatoxinas en maíz en campo, se presenta especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales (Bucio *et al.*, 2001), esta situación, generalmente es un proceso aditivo; puede iniciarse en el campo, aumentar durante la cosecha y operaciones de secado y continuar acumulándose durante el almacenamiento (Bogantes *et al.*, 2004).

En el país se ha reportado presencia de aflatoxinas en tortillas, leche, cerveza, masa, cacahuates, dulces, chocolates, refresco de cola, etc. (Carvajal 2010; Moreno, 2005). El alto consumo de maíz por los mexicanos, estimado en 74 kg per cápita anuales (SIAP, 2011) pone en riesgo la salud de la población, ya que no existe ningún umbral de aflatoxinas por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos (Unión Europea).

Debido a la importancia que representa la contaminación por estos hongos, a la gran incidencia de estos en las muestras analizadas, y a la escasa información sobre el tema en el país que nos mantiene débiles ante la situación, el presente trabajo se realizó con el objetivo de incrementar el conocimiento sobre su presencia y capacidad toxigénica en granos de maíz de muestras colectadas en distintos puntos de la República Mexicana.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Caracterizar morfológica y toxicológicamente cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* provenientes de maíces de diferentes orígenes colectados en 14 puntos geográficos de la República Mexicana.

### Objetivos específicos

- Determinar la incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en granos de maíz.
- Caracterizar la morfología de los hongos, tanto de las colonias como de estructuras específicas de importancia taxonómica.
- Determinar el potencial toxigénico de las cepas aisladas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* para producir aflatoxinas.
- Determinar la relación existente entre la cantidad de aflatoxina, con la producción de esclerocios.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### **El maíz en México**

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. (Barkin, 2003). Este cultivo en el año 2007 ocupó 8.07 millones de hectáreas, lo que equivale al 50.3% de la superficie agrícola sembrada. (SIAP, 2007).

México se caracteriza por la producción de una amplia gama de variedades, por lo que es posible generar una gran cantidad de productos finales: tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, dextrosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustible, etc. (SIAP, 2007).

### **Pérdidas causadas por hongos en el cultivo del maíz**

Los cambios producidos por el ataque de hongos pueden ser de naturaleza nutricional y/o cualitativa como: pigmentación, decoloración, pudrición, desarrollo de malos olores y sabores desagradables. Sin embargo, la consecuencia más notable de su presencia, es la contaminación del producto por hongos productores de micotoxinas (Kozakiewicz, 1989).

Las micotoxinas son los contaminantes naturales de los alimentos más extendidos a nivel mundial. Las principales cepas productoras de toxinas se encuentran en los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas poseen efectos carcinogénicos, oncogénicos, teratogénicos, embriotóxicos y hepatotóxicos. Afectan el sistema hormonal, respiratorio e inmunológico. Debido a su gran variedad de efectos tóxicos, y sobre todo a su extrema resistencia al calor (termorresistencia), la presencia de las micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de los animales. (Soriano 2007; Murray *et al.*, 2006; Miller, 1994; Resnik 1997).

La contaminación fúngica de los alimentos puede ocurrir en diferentes etapas de su procesamiento, ya sea en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento. El cacahuete y el

maíz son productos que se contaminan con facilidad por hongos del género *Aspergillus* (Bogantes *et al.*, 2004)

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) estima que más de un 25% de la producción de alimentos en el mundo está contaminada en un cierto grado con micotoxinas (Lawlor *et al.*, 2001).

La mayoría de los hongos crecen en cereales, produciendo sus toxinas cuando las condiciones son favorables. Se estima que entre 25 y 40% de los cereales puede estar contaminado con una o varias toxinas (Pittet, 1998). Sin embargo, la incidencia y concentración de las micotoxinas en los productos es variable y esporádica en diferentes años y localizaciones geográficas, debido en parte a la variación de condiciones climáticas (CAST, 1989).

## **Micotoxinas**

Micotoxina, deriva de las palabras griegas: *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente. Algunos hongos, durante su fase estacionaria, son capaces de producir metabolitos secundarios tóxicos, que tienen efectos nocivos en la salud humana y animal. Estos agentes tóxicos son generalmente llamados micotoxinas (Fokunang *et al.*, 2006; Soriano, 2007). Dado su carácter inevitable e imprevisible, la contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad de los alimentos (Lopez-Garcia *et al.*, 1999).

La presencia de hongos potencialmente micotoxígenos no indica que el sustrato esté contaminado con micotoxinas. Los requerimientos fisiológicos y nutricionales relacionados a la producción de micotoxinas, son por lo general mucho más específicos que aquellos relacionados con el crecimiento del hongo. Además, en muchas especies, no todos los individuos son capaces de producir toxinas (Soriano, 2007)

Las micotoxinas han causado enfermedades, muertes y grandes pérdidas económicas desde la antigua Grecia (Cuadro 1). La historia de las aflatoxinas es más reciente, descubiertas en 1960, cuando 100,000 pavos de Inglaterra murieron al ser alimentados con cacahuete de Brasil contaminado con aflatoxinas.

Desde ese entonces a la fecha se han descubierto más de 3500 micotoxinas con diferentes niveles de toxicidad. Sin embargo, las aflatoxinas son las más frecuentes y dañinas, en cantidades traza ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  o partes por billón) (Carvajal, 2010).

**Cuadro 1.** Micotoxinas en la historia. (Soriano, 2007)

<b>Año</b>	<b>Acontecimiento</b>	<b>Causa</b>
<b>3000 AC</b>	China, utilizado en obstetricia	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>600 AC</b>	Asiria, descrito como una pústula nociva en el centeno responsable de la muerte de los primogénitos citada en la biblia	Causada probablemente por Tricotecenos
<b>430 AC</b>	Epidemia entre los espartanos	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>400 AC</b>	Persia, abortos y muertes durante el parto	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>Época del Imperio Romano</b>	Ignis sacer o Ignis marialis, ergotismo	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>Edad media</b>	Fuego de San Antonio, epidemias de ergotismo en Europa	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>1692</b>	Salem y 8 comunidades del condado de Essex en Massachusetts, EEUU, personas y animales intoxicados. Uno de los casos más famosos de la historia debido a que 30 personas fueron condenadas por brujería, de las cuales 18 fueron ahorcadas.	Alcaloides de <i>Claviceps</i> , probablemente ácido lisérgico, ingerido en pan de centeno contaminado con micotoxinas
<b>De 1785 a 1929</b>	Epidemias en Rusia,	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>1926</b>	Epidemias de Ergotismo en el norte y este de Europa y la ex URSS	Alcaloides de <i>Claviceps</i>
<b>1932</b>	Epidemias en Rusia, tasas de mortalidad en un 60%	Toxina T-2, primera micotoxicosis por Tricotecenos
<b>1960</b>	Muerte de 100,000 pavitos en Inglaterra	Consumo de cacahuates importados de Brasil contaminados con aflatoxinas

Continuación **Cuadro 1.**

<b>1976</b>	India, epidemia de hepatitis y muerte de 100 personas	Consumo de maíz con elevado nivel de aflatoxinas. Se detectaron elevados niveles de aflatoxina B1 en los hígados de los sujetos fallecidos
<b>1977-78</b>	Etiopia, muerte de 47 personas	Cereales contaminados con micotoxinas

Los cultivos que se contaminan frecuentemente con micotoxinas son: maíz, sorgo, cebada, trigo, centeno, arroz, cacahuates, nueces y semillas de algodón. La contaminación con micotoxinas en los granos generalmente es un proceso aditivo; puede iniciarse en el campo, aumentar durante la cosecha y operaciones de secado y continuar acumulándose durante el almacenamiento (Bogantes *et al.*, 2004).

La temperatura, la humedad y la actividad de diferentes insectos son factores ambientales que pueden favorecer la diseminación y crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas. Los hongos productores de micotoxinas pueden crecer de forma general en rangos entre -3 y 40°C, en un amplio intervalo de pH, normalmente entre 3 y 8, aunque habitualmente tienen su óptimo cercano a 5 y por encima de 0.77-0.99 de actividad de agua ( $a_w$ ). (D'Mello *et al.*, 1997, Erlich y Cotty, 2003, Soriano 2007)

Muchas especies fúngicas son capaces de producir más de una micotoxina y una micotoxina puede ser producida por más de una especie. Con frecuencia, diferentes toxinas pueden encontrarse dentro del mismo sustrato contaminado (Hussein *et al.*, 2001).

Hasta el momento, se han descrito alrededor 300 micotoxinas, de las cuales sólo unas pocas reciben una atención especial por el riesgo que representan para la salud animal y humana. Las que toman un especial interés biológico y económico son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisina y alcaloides ergóticos (D'Mello *et al.*, 1997; Resnik 1997; Carvajal, 2010; Soriano, 2007).

Los efectos tóxicos de las micotoxinas son variables (Cuadro 2), dependiendo de su estructura química, concentración, duración de exposición, sexo, edad y vulnerabilidad (Denli y Pérez, 2006). (Cuadro 2)

**Cuadro 2.** Efectos tóxicos agudos y crónicos observados en vertebrados superiores. Denli y Pérez, 2006)

Micotoxinas	Efecto
<b>Aflatoxina B<sub>1</sub></b>	Carcinogénica, hepatotóxica, teratogénica, mutagénica e inmunotóxica.
<b>Aflatoxina M<sub>1</sub></b>	Carcinogénica y hepatotóxica
<b>Ocratoxina A</b>	Nefrotóxica, carcinogénica, teratogénica e inmunotóxica
<b>Zearalenona</b>	Estrogénica, inmunotóxica e hiperoestrogénica
<b>Deoxinivalenol</b>	Factor emético y de rechazo del alimento
<b>Fumonisin</b>	Carcinogénicas, hepatotóxica y neurotóxica
<b>Diacetoxycirpenol y toxina T-2</b>	Dermatotóxica y neurotóxica
	Neurotóxica

El estudio de las micotoxinas se inició a partir de 1960, año en que se reportaron diversos casos de micotoxicosis en animales. El primero involucró la muerte de más de 100.000 pavitos (Bennett y Klich, 2003) alimentados con pasta de cacahuete contaminada con hongos. Debido a que la causa era desconocida en ese momento, los investigadores del Tropical Products Institute de Inglaterra la llamaron "Turkey X Disease" (Ayes *et al.*, 1980; Brout, 1961). Poco después, una enfermedad similar causó pérdidas severas en patos de Kenya (Carnaghan *et al.*, 1961).

Al mismo tiempo se reportaron casos de carcinoma hepatocelular (CHC), en truchas arcoiris de criaderos en Estados Unidos y en Europa. Los análisis del alimento revelaron que el hongo *Aspergillus flavus* producía una toxina que posteriormente se denominó aflatoxina (Sargeant *et al.*, 1961).

## Micotoxinas en México

México es el centro de origen del maíz, y su producción se caracteriza por una amplia diversidad de genotipos cultivados bajo distintas condiciones ambientales.

La mayor parte del maíz producido en el país se cultiva bajo condiciones de temporal. Del total de los productores de maíz, aproximadamente 90% tienen parcelas menores a cinco hectáreas y más del 80% utilizan semilla propia, la cual está adaptada a una enorme diversidad de situaciones geo-climáticas (SAGARPA, 2007). Esto indica que se cultiva principalmente en la agricultura de subsistencia de los campesinos para su propio consumo o para su venta en el mercado local.

La contaminación por aflatoxinas y fumonisinas es un problema frecuente en las regiones donde se cultiva maíz, sin embargo las desiguales condiciones ambientales y culturales determinan la gravedad del problema en cada región (Cuadro 3) (Plasencia, 2005), y cuando este cereal forma parte de los alimentos básicos, la contaminación por micotoxinas se traduce en alto nivel de exposición crónica.

**Cuadro 3.** Incidencia de micotoxinas por zonas geográficas. Devegowda *et al.*, 1998

Localización	Micotoxina
Europa occidental	Ocratoxina, Vomitoxina, Zearalenona
Europa (Este)	Zearalenona, Vomitoxina
América del Norte	Ocratoxina, Vomitoxina, Zearalenona, Aflatoxina
América del Sur	Aflatoxina, Fumonisina, Ocratoxina, Vomitoxina, T-2 Toxina
África	Aflatoxina, Fumonisina, Zearalenona
Asia	Aflatoxina
Australia	Aflatoxina, Fumonisina

Esto es particularmente cierto en las comunidades agrícolas de subsistencia donde las regulaciones para controlar la exposición a micotoxinas son inexistentes o prácticamente inaplicables, (Wild *et al.*, 2010) por lo que es prioritario ampliar el conocimiento de las micotoxinas, y con esto evitar la contaminación del grano y todos los riesgos que esto conlleva.

Utilizando pollos de 8 días de edad, se ha demostrado que 50 gramos de masa conteniendo 3.6 µg de AFB<sub>1</sub> al día durante 8 días no causa ni pérdida de peso ni muerte en los animales. Por el contrario, 50 gramos de masa conteniendo 30 µg de AFB<sub>1</sub> por día durante 8 días causa la muerte de los animales así tratados. Existen datos que ilustran que la ingestión de concentraciones bajas de AFB<sub>1</sub> durante largo tiempo puede causar cáncer de intestino, de piel y otras reacciones tóxicas (Guzmán, 2006).

## **Aflatoxinas**

*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, son las especies aflatoxigénicas de mayor impacto para la humanidad y están ubicadas en la sección *Flavi* (Peterson, 2008). Son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas, por lo que son las micotoxinas más estudiadas y controladas. Son producidas principalmente por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Ruíz y Font, 2007; Smith, 2005)

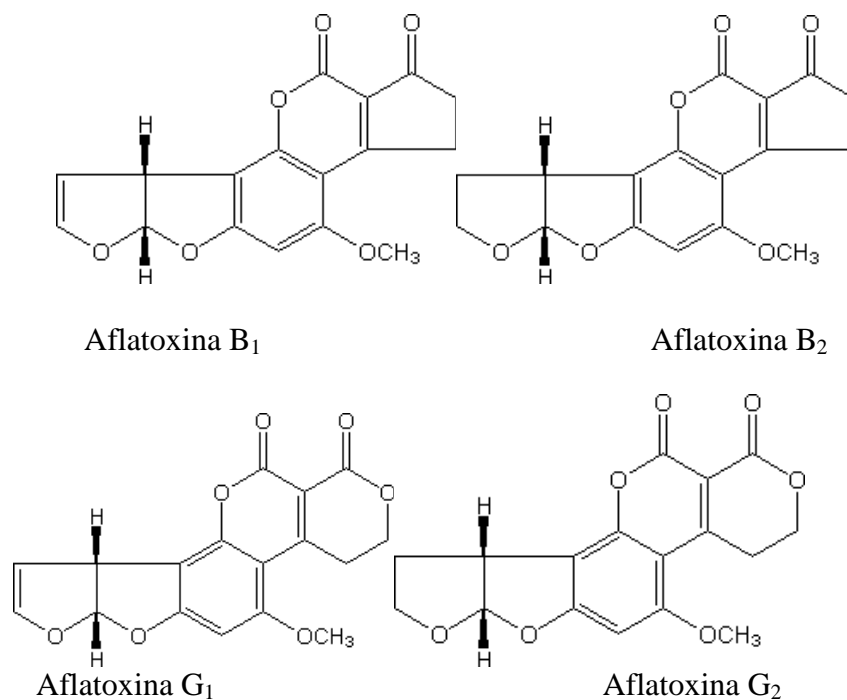
La importancia de las aflatoxinas radica en el riesgo que representan para la salud pública, así como las pérdidas económicas por la baja calidad del grano, limitaciones en las exportaciones, costos de manejo, análisis y eliminación de material contaminado (Acosta, 1994).

*Aspergillus flavus* produce aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y ácido ciclopiazónico. Según la cepa, puede producir todas las toxinas, alguna o ninguna; *A. parasiticus* y *A. nomius*, producen aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>; *A. pseudotamarii* aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y Ácido ciclopiazónico y a *A. bombycis* aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Rodrigues *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Pitt y Hocking, 1997; Horn y Greene, 1995). Las aflatoxinas suelen designarse con letras, que se refieren a una característica física o de otro tipo del compuesto, por ejemplo, las B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> presentan fluorescencia azul y las G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, fluorescencia verde cuando se exponen a radiación ultravioleta de onda larga (Bogantes *et al.*, 2004)

Son teratogénicas y mutagénicas. El órgano afectado principalmente es el hígado, donde producen daño hepático agudo, cirrosis; además inducen tumores, disminución de la eficiencia del sistema inmunitario, y afecciones a los pulmones. (IARC, 2006).

Al ingerir alimentos con aflatoxinas, éstas son absorbidas en la mucosa intestinal y pasan al torrente circulatorio, a través del cual llegan al hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan. En los animales se evidencia el daño en el hígado y en la disminución de la transformación del alimento en: carne, huevo o leche (Ortiz, 1992).

La AFB<sub>1</sub> se considera la aflatoxina más importante, al surgir con mayor frecuencia, mayor abundancia y ser la más tóxica. La AFB<sub>1</sub>, (Figura 1) es absorbida en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas hasta el hígado, mayoritariamente por la vía de la vena portal. Cuando hembras en lactancia ingieren en sus alimentos aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, las mismas son excretadas por la leche en forma de aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, que son metabolitos oxidantes, pero aun tóxicos. (Juan *et al.*, 2007; Galtier, 1999).



**Figura 1.** Estructuras químicas de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> (Juan *et al.*, 2007).



## Toxicología

Los efectos tóxicos de las aflatoxinas dependen de las dosis, duración de la ingestión, edad, especie, sexo y del estado nutricional de la persona o animal (Juan *et al.*, 2007). La Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (IARC), clasifica a las micotoxinas de la siguiente manera (Cuadro 4):

**Cuadro 4.** Clasificación de micotoxinas de acuerdo al riesgo que representan para la salud humana (Juan *et al.*, 2007).

Aflatoxinas	1
Aflatoxina M1	2B
Citrinina	3
Esterigmatocistina	2B
Fumonisina B1	2B
Ocratoxina A	2B
Patulina	3
Zearelanona	3
Deoxinivalenol	3
Nivalenol	3
Fusarenonan X	3
Toxina T-2	3

Dónde:

- 1 Agente carcinógeno en humanos
- 2B Agente posiblemente carcinógeno pero la evidencia en humanos es limitada y tampoco existe suficiente evidencia en animales de experimentación.
- 3 Agente no clasificable como carcinógeno en humanos.

Al ser sustancias genotóxicas, IARC clasifica a la AFB<sub>1</sub> en la categoría 1, en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre (SCO, 1996).

## **Toxicidad de las aflatoxinas**

### **Toxicidad aguda**

Se produce cuando se ingieren grandes cantidades de aflatoxinas. La presencia de aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que dará lugar a necrosis celular hepática. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas celulares lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición de la síntesis de carbohidratos y lípidos. Esto produce anorexia, depresión, ictericia, diarrea, fotosensibilidad y muerte. También producen efectos citotóxicos y la AFB<sub>1</sub> puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales. Experimentos realizados en animales han demostrado que los efectos agudos incluyen necrosis hepática, nefritis y congestión pulmonar (Juan *et al.*, 2007; Moss, 2002; IARC, 2002; Massey *et al.*, 2000).

Se han presentado casos de este tipo en 1974, en la India, donde 150 poblaciones de los estados de Gujarat y Rajastán, se vieron afectadas por un brote epidémico. 108 personas fallecieron siendo el total de intoxicados de 397. Se detectaron niveles de entre 6250 y 15600 µg/kg de aflatoxinas en granos de maíz contaminado. En el año 2004, en Makueni y Kiyui, Kenia, fallecieron 125 personas de las 317 intoxicadas con maíz contaminado con aflatoxinas, con niveles que variaron de 20 a 8000 µg/kg (Juan *et al.*, 2007; Krishnamachari *et al.*, 1975).

### **Toxicidad crónica**

Se produce debido al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas, meses o años. Los síntomas incluyen: daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad en modelos animales, reducción en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución en la producción de huevos o leche y mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades. (Massey *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 2007; Moss, 2002).

## **Ingesta diaria**

La Unión Europea indica que para este tipo de sustancias no existe ningún umbral por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos, por lo tanto no considera pertinente fijar una dosis diaria tolerable y ha seguido el criterio de fijar los límites legales en los niveles más bajos posibles. Así que admitiendo que actualmente no es posible la eliminación total de la presencia de aflatoxinas en los alimentos, la concentración permitida de AFB<sub>1</sub>, está establecida entre 2 y 8 µg/kg dependiendo de los diferentes géneros alimenticios (OJ, 2003).

## ***Aspergillus flavus* en maíz**

En semillas de maíz, las colonias de *A. flavus* son por lo general de color verde claro, verde amarillento claro, verde intenso, café oliváceo o café (Figura 2). Las semillas de maíz severamente afectadas son incoloras y arrugadas. En medio de cultivo, el color de la colonia varía de verde amarillento a verde oliváceo, micelio blanco, esclerocios marrón oscuro a negros, reverso incoloro, marrón claro o naranja, textura de la colonia lanosa o flocosa, pero la identificación macroscópica no basta para la identificación del hongo. (Abarca, 2000). A pesar de que estos patógenos se consideran principalmente hongos de almacenamiento, las infecciones pueden iniciarse a nivel de campo. El inóculo primario proviene de propágulos en el suelo, micelio que inverna en residuos vegetales, esclerocios, basura sobre el suelo e insectos (De la Garza, 1994).



**Figura 2.** *Aspergillus flavus* en maíz

## **Aflatoxinas en México**

La ubicación geográfica de México, favorece la infección y síntesis de micotoxinas de *Aspergillus*, ya que la contaminación por aflatoxinas en maíz a campo, se presenta especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales (Bucio *et al.*, 2001), es decir: entre el trópico de cáncer (al norte por México a la altura de la punta de Baja California hasta el Centro de Tamaulipas, México) y el Trópico de Capricornio (Al sur, pasa por Perú y Brasil).

A pesar de que estos patógenos se consideran principalmente hongos de almacenamiento, las infecciones pueden iniciarse a nivel de campo. El inóculo primario proviene de propágulos en el suelo, micelio que inverna en residuos vegetales, esclerocios, basura sobre el suelo e insectos (De la Garza, 1994).

En 1989, Tamaulipas reportó una contaminación por aflatoxinas en maíz, prácticamente en toda su cosecha; el nivel de aflatoxinas fue de 100 µg/kg. En la ciudad de Monterrey, se detectó la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub> en 36 de las 41 muestras de masa analizadas para la elaboración de tortillas con un rango de concentración de 5 - 465 µg/kg donde un 58% de las muestras, con una concentración mayor a la permitida (20 µg/kg); al analizar muestras de 50 tortillerías, se diagnosticó la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub> en el 72% de las muestras, con un rango de 5 a 500 µg/kg (Plasencia, 2004).

Se han encontrado aflatoxinas (de 1 a 100 µg/kg) en un 19% de las tortillas consumidas en la Ciudad de México en las Delegaciones de Cuahutémoc y Coyoacán; en un 40% de todas las presentaciones de cacahuete (natural, japonés, garapiñados, mazapán, mantequilla, dulces y chocolates como Tin Larín y Almonris, etc. (Carvajal, 2010).

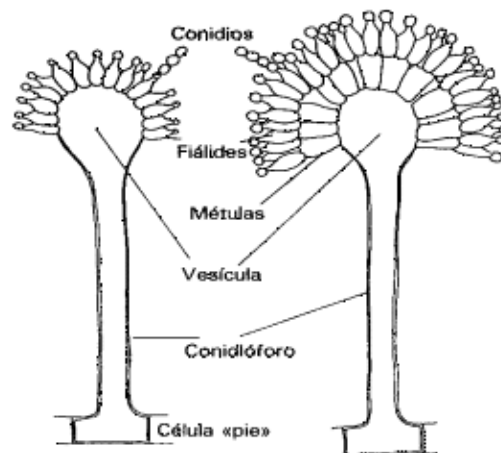
Se realizó el análisis de 600 litros de leche líquida pasteurizada en 1996 y 1997 en la Ciudad de México, de las marcas Lala, Alpura, Boreal, San Marcos, Volcanes, Aurrerá, etc. encontrándose un alto riesgo de ingestión de aflatoxinas en todas las marcas en las 4 estaciones del año. (Carvajal, 2010)

En México, se trabajó con 84 pacientes con diferentes tipos de cáncer (colorrectal, de hígado, pulmón, páncreas, pecho y cervicouterino) encontrándose aflatoxinas en todos los tejidos tumorales malignos y en algunos benignos (Carvajal, 2010)

## Identificación de especies de *Aspergillus* productoras de aflatoxinas

### Morfológica

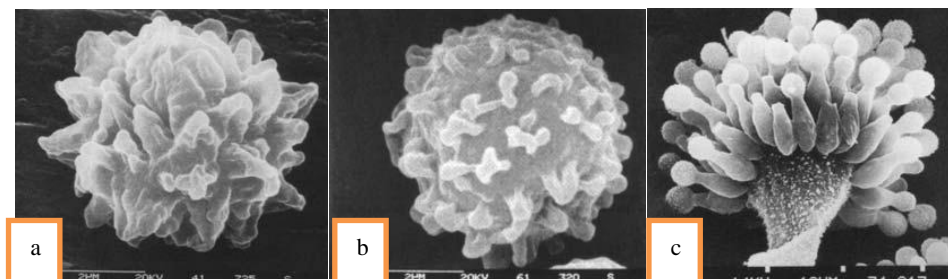
Algunas especies de *Aspergillus*, entre ellas *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, considerados como los principales productores de aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987) son mitospóricos, y se caracterizan por la producción de hifas especializadas denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las vesículas que originan las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), conidióforo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas. (Rodrigues *et al.*, 2007; Abarca, 2000; Rapper y Fennell, 1965). (Figura 3)



**Figura 3.** Conidióforos de *Aspergillus* (Alcalá *et al.*, 1997)

Debido a las características de los conidióforos, la identificación a nivel género es sencilla, pero a nivel especie es compleja debido a las similitudes presentes entre estos hongos. Para clasificarlos son utilizadas características macro y microscópicas. Macroscópicamente, se toma en cuenta: diámetro de las colonias, coloración del anverso y del reverso de las colonias, presencia de esclerocios, presencia de gotas de exudado, presencia de pigmento difusible, textura de las colonias y a nivel microscópico se considera: la disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula; longitud y anchura de los estipes; forma y diámetro de las vesículas; longitud y anchura de las métulas y fiálides; forma, diámetro, ornamentación y color de las conidias; forma, tamaño y color de las células de Hülle; forma, tamaño y color de las ascosporas (Rodrigues *et al.*, 2007; Abarca, 2000).

La separación entre especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* se realiza por la presencia de métulas y fiálides. *A. parasiticus* presenta fiálides uniseriadas mientras que *A. flavus* presenta fiálides uni y biseriadas. Debido a que estas características se presentan muy variables dentro de las especies, actualmente se considera la ornamentación de la conidia como punto principal en la separación. Las conidias de *A. flavus* tienen cabezuelas esféricas a elípticas y son finas a moderadamente ásperas, mientras que *A. parasiticus* presenta cabezuelas más esféricas y equinuladas a espinosas (Figura 4). La separación de *A. nomius* se complica, porque presenta características morfológicas similares a *A. flavus*, excepto que difiere en la producción de pequeños esclerocios en forma de bala, mientras que los de *A. flavus* son más globosos. Sin embargo no está claro si las cepas de *A. nomius* frescas produzcan esclerocios. La diferencia fundamental entre las tres especies se da en la producción de aflatoxinas B, G y ácido ciclopiazónico (Rodrigues *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Fotografía al microscopio electrónico que muestra la ornamentación de las esporas de *Aspergillus parasiticus* (a), *Aspergillus flavus* (b) y la cabezuela conidial monoseriada de *Aspergillus parasiticus* (c). (Rodríguez *et al.*, 2007).

Los criterios seguidos para clasificar las especies del género *Aspergillus*, son principalmente morfológicos. No obstante, se realizan además, estudios bioquímicos o moleculares encaminados a resolver algunos problemas planteados para su clasificación (Abarca, 2000).

## Otros métodos para la identificación de *Aspergillus*

### Métodos basados en la utilización de medios de cultivo diferenciales

Estos hongos pueden ser cultivados en diferentes medios tanto para su identificación como para conservarlos. El medio de cultivo Malta Sal Agar (MSA), se utiliza para aislar la mayoría de los hongos de almacén; el Czapek, Czapek con Extracto de Levadura y el Czapek con Sacarosa, se utilizan para la identificación de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*. El Medio Agar Coco (ACY), se utilizan para discriminar cepas toxigénicas de cepas no toxigénicas ya que al crecer las mismas y exponerlas a luz ultra violeta emiten fluorescencia. El AFPA, *Aspergillus Flavus Parasiticus* Agar, se utiliza para diferenciar a los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* de otras especies de *Aspergillus* Por lo general su sensibilidad no es muy elevada (Rodrigues *et al.*, 2007; Sepúlveda y Piontelli, 2005; Medina *et al.*, 2002).

### Métodos de análisis de aflatoxinas

Las metodologías de análisis son variadas dependiendo del objetivo del mismo y varían desde los más precisos y por lo general costosos a aquellos que solo indican la posibilidad de presencia de las aflatoxinas. Las aflatoxinas pueden analizarse utilizando pruebas de 3 tipos: a. presuntivas, que pueden realizarse a nivel de campo y sirven para determinar si deben o no realizarse pruebas cuantitativas; b. pruebas rápidas de escrutinio, sirven para definir la presencia o ausencia de aflatoxinas; c. métodos analíticos, que son aquellos que determinan en forma exacta el nivel de la toxina en un producto. (Soriano *et al.*, 2007).

A continuación se describen algunos de los análisis para aflatoxinas. Las pruebas presuntivas se basan en la propiedad de las aflatoxinas de emitir fluorescencia bajo luz ultravioleta de 365 nm. Esta prueba solo funciona en granos vivos, pero las toxinas pueden producirse en granos vivos y muertos. Cuando se presentan una o más partículas fluorescentes por kilogramo de muestra debe realizarse un análisis químico. Para evitar errores se recomienda el uso de una muestra patrón. (Moreno y Gil, 1991). Dos métodos rápidos han sido aceptados por la AOAC, el de Romer, recomendado para maíz blanco y amarillo con una sensibilidad de 15 ppb y el de Holaday-Velazco, para maíz, con una sensibilidad de 10 ppb. (Moreno y Gil, 1991). En el método de Holaday-Velazco, la muestra se hace pasar a través de una minicolumna de albúmina neutra, gel de sílice, florisil, CaSO<sub>2</sub> y fibra de vidrio, donde las aflatoxinas quedan retenidas en el florisil y se observan como una banda fluorescente bajo luz ultravioleta. El método Romer es presuntivo, en el mismo también se hace pasar la muestra por una columna de composición patentada donde las aflatoxinas quedan retenidas y también se observan como una banda fluorescente bajo luz ultravioleta.

Otro método todavía aceptado es el de la cromatografía en capa fina, TLC, en la misma, se pueden identificar aflatoxinas B y G, bajo luz UV de 365 nm. Se considera un análisis semicuantitativo. La Association of Official Analytical Chemist (AOAC), aprueba un método de cromatografía en capa fina para aflatoxinas en maíz, utilizando como solvente cloroformo agua 250:14. También en la AOAC se especifican los criterios para verificación de la calidad de los estándares (Soriano *et al.*, 2007; Moreno y Gil, 1991). Existen también métodos serológicos cuali y cuantitativos aceptados por varios países como oficiales dentro de sus normas fitosanitarias, entre ellos aflatest, ez-screen, agri-screen, minicolumnas, aflatox-20cup, sam-a, oxid, etc. (Moreno & Gil, 1991). Un análisis muy utilizado en la cuantificación de aflatoxinas es la cromatografía líquida de alta presión HPLC, que puede detectar concentraciones de hasta 100µg /100g de muestra, es el método más exacto y reproducible, pero es el más costoso y el que requiere de personal más capacitado (Soriano *et al.*, 2007; Ortiz, 1992; Moreno, 1988). La única prueba biológica que fue aceptada por la AOAC en 1984, es la de embrión de pollo para aflatoxina B1 (Moreno, 1988). La eficiencia en el análisis depende de varios factores como (Moreno y Gil, 1991): la calidad del muestreo, el



método de análisis escogido (calidad de estándares y reactivos, equipo, etc.) y conocimientos y destreza del analista (Moreno y Gil, 1991).

La distribución de las aflatoxinas es muy heterogénea (Figura 5) unos cuantos granos pueden contener una alta cantidad de toxina y sacar de norma un lote de granos de maíz. Shotwell *et al.*, 1974, encontraron en un solo grano de maíz 400 mil microgramos de aflatoxina. Cabe destacar que en productos molidos o líquidos la distribución de aflatoxinas es más homogénea. Para maíz se recomiendan muestras no menores a 5 kg. a mayor tamaño de muestra de un lote que se analice, la presencia de aflatoxinas tiende a adquirir una distribución normal (Ortiz, 1992; Moreno y Gil, 1991). El muestreo se deberá considerar como la etapa más crítica e importante de cualquier proceso encaminado al diagnóstico de aflatoxinas en alimentos (Ortiz, 1992).



**Figura 5.** Infección heterogénea de *A. flavus*

### **Ciclo de vida de *Aspergillus flavus***

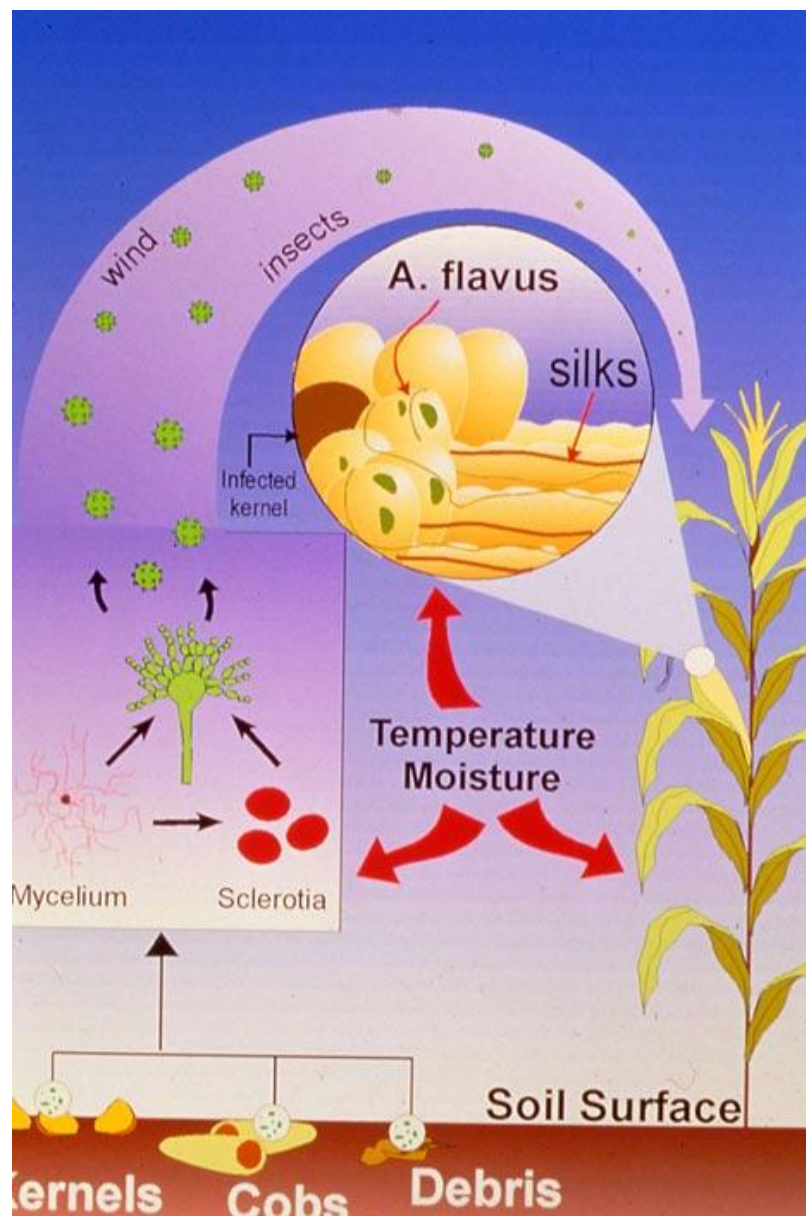
Payne *et al.*, (1998), caracterizaron y describieron el proceso de infección de *Aspergillus flavus* en maíz. Al ser un hongo del suelo, que se reproduce mediante conidias asexuales, la principal fuente de inóculo es el suelo, pero la estructura predominante de resistencia es desconocida. Payne, 1998, sugiere que el hongo sobrevive en conidias, micelio y esclerocios. Las conidias son las estructuras infectivas, capaces de colonizar a las plantas mediante el viento o los insectos.

*Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* pueden desarrollarse en tejidos vegetales vivos, en descomposición o en restos animales. Su población tanto en la planta como en el suelo, depende de su capacidad de competir con la micobiota presente (Payne, 1998).

Los granos de maíz se colonizan por *A. flavus*, cuando entra por los estigmas o pelos de la mazorca tierna y penetra a los ovarios como si fuera polen. La contaminación puede continuar y aumentar durante toda la temporada (Payne, 1998; Carvajal, 2010).

*Aspergillus flavus* puede invernar en el suelo como micelio, conidias o también puede producir esclerocios, capaces de germinar sobre el suelo. Los dos principales factores que influyen en la población de este hongo en el suelo, son la temperatura y la humedad (Payne, 1998).

Bajo condiciones de alta temperatura y baja actividad del agua, *A. flavus* se vuelve muy competitivo y puede convertirse en una de las especies dominantes de hongos en el suelo (Payne, 1998; Giorni 2007). En época de sequía la única fuente de agua del hongo son las plantas y ataca con más severidad que cuando los cultivos tienen riego, donde la contaminación por *A. flavus* disminuye. (Carvajal, 2010). No se conoce la etapa sexual de este hongo, pero se asume que la conidia es el inóculo primario. Desde el suelo, la conidia es transportada y depositada por el viento o insectos hasta los estigmas o granos si existe algún daño físico. (Figura 6) (Payne, 1998; Giorni *et al.*, 2007) (Figura 4).



**Figura 6.** Ciclo de infección del maíz por *A. flavus* en campo (Payne, 1998)

## **Factores que condicionan la presencia de aflatoxinas**

Los factores que condicionan la aparición de aflatoxinas en los cereales, está asociada, tanto a las condiciones de almacenamiento inadecuadas, como a la contaminación del producto en el campo. Los factores que afectan la contaminación de los granos, incluyen el hongo productor, la cantidad de esporas inoculadas, el sustrato, el contenido de humedad del ambiente, el contenido de humedad del sustrato, la temperatura del ambiente, la microbiota asociada, la tensión durante el crecimiento de las plantas, las poblaciones de insectos y ácaros, las variedades susceptibles o resistentes de las plantas, daño mecánico, daño por tormenta, daño por aves, la nutrición mineral de la planta, el oxígeno en la atmósfera de almacenamiento y el periodo de almacenamiento. (Moreno, 1988)

La sola presencia del hongo no implica la presencia de aflatoxinas o que las mismas vayan a producirse. Bajo condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos, la producción de aflatoxinas puede ser alta a las 24 horas. El máximo se alcanza a los 7 a 10 días y posteriormente el nivel de aflatoxinas fluctúa con el tiempo, pero bajo las condiciones en que normalmente se manejan los productos agrícolas, las mismas son muy estables, resistiendo las temperaturas de elaboración de los alimentos (Moreno, 1988).

La interacción entre la actividad del agua ( $a_w$ ) y la temperatura son los puntos más determinantes para el crecimiento fungoso (Ayerst, 1969) y para la producción de micotoxinas (Lacey *et al.*, 1991). Las condiciones para la producción de micotoxinas, generalmente son más restringidas que aquellas para el crecimiento, y pueden variar entre diferentes micotoxinas producidas por las mismas especies y entre hongos productores de la misma toxina. (Frisvad y Samson, 1991).

**Temperatura y humedad.-** Los *Aspergillus* pueden crecer a temperaturas de 8 a 55°C, siendo de 36 a 38°C las temperaturas óptimas de desarrollo y de 25 a 35°C las temperaturas óptimas de producción de aflatoxinas. No se producen aflatoxinas por debajo de 10°C y por encima de 45°C. El rango de producción es entre 12 y 40°C.

La humedad relativa mínima para el desarrollo de hongos aflatoxigénicos es de 85% no existiendo un límite superior de humedad para la producción de estas toxinas. La actividad del agua para producción de aflatoxinas varía de 0.82 a 0.99. (Soriano *et al.*, 2007; Moreno y Gil, 1991). Regiones de baja humedad relativa y temperatura son las más favorables para mantener bajos niveles de contaminación (Guzmán, 2006; Guzmán *et al.*, 1995). Por medio de modelos climáticos, se ha previsto un marcado descenso en las precipitaciones y aumentos en la temperatura de algunas áreas geográficas del mundo debido al cambio climático, lo que daría lugar a episodios de sequía acompañados de stress, lo que conlleva a una mayor susceptibilidad de las plantas al ataque por agentes micotoxigénicos, En época de sequía la única fuente de agua del hongo son las plantas y ataca con más severidad que cuando los cultivos tienen riego, donde la contaminación por *A. flavus* disminuye. (Magan, *et al.*, 2011; Carvajal, 2010).

**El hongo y la micobiota asociada.-** Los hongos aflatoxigénicos producen esporas en gran número y las mismas requieren para germinar una humedad relativa mínima de 83% y para establecerse el hongo requiere una humedad de 85%. *Aspergillus* es un hongo débil, y es mal competidor con otros hongos que crecen en el mismo sustrato bajo las mismas condiciones ambientales (Moreno y Gil, 1991) por lo cual invade con mayor facilidad plantas sometidas a condiciones de estrés como sequías, altas temperaturas (32 a 38°C), especialmente temperaturas nocturnas elevadas, ataques de insectos, ácaros, pájaros, tormentas o daño mecánico. Proliferan fácilmente en tejidos muertos ya que son más saprobios que parásitos (Mazzani *et al.*, 2004; Moreno y Gil, 1991; Moreno, 1988, Christensen, 1974). El porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas dependerá no solo del genotipo del hongo, sino además de factores ambientales que ejercen su influencia sobre el metabolismo y crecimiento del mismo. (Cabañes *et al.*, 2007).

**Sustrato.-** Prácticamente cualquier sustrato que permita el crecimiento de las especies toxigénicas es apto para la producción de aflatoxinas. Sustratos ricos en carbohidratos y ácidos grasos aumentan la producción de aflatoxinas. *A. flavus* presenta mayor actividad proteolítica y *A. parasiticus* mayor actividad lipolítica (Moreno, 2004; Gendy y Marth, 1980).

### **Control de la contaminación con aflatoxinas**

La mejor manera de evitar la contaminación con aflatoxinas es tomando precauciones desde el campo. (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno y Gil, 1991).

#### **En campo**

El manejo adecuado de los cultivos se considera el método ideal de control de la contaminación de las cosechas con micotoxinas. Sin embargo, en la práctica es difícil controlar factores ambientales como la temperatura y la humedad de los cultivos. (Denli *et al.*, 2002).

Uso de estrategias agronómicas: Reducción del estrés sufrido por las plantas (Denli y Pérez 2005). Manejo de datos epidemiológicos, de las condiciones del suelo y de riesgos (Moreno, 2004). Manejo adecuado de restos de cultivo, malezas y rotación de cultivos (Moreno, 2004). Uso de fungicidas y fungistáticos (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno y Gil, 1991). Control de insectos (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Uso de variedades resistentes (Denli y Perez 2005). Cosechar al punto de madurez fisiológica evitando dejar el grano en campo más tiempo del necesario (Moreno, 2004). Utilización de cepas atoxigénicas de hongos (Sanchis *et al.*, 2007; USDA 2005).

Se han realizado estudios de control biológico de aflatoxinas con diferentes extractos de plantas mexicanas y aceites esenciales, encontrándose que el clavo, canela y timol controlan bien a las aflatoxinas. La bacteria *Pseudomonas fluorescens*, tiene un buen efecto antagonico contra las aflatoxinas. Se buscó el principio activo y es de naturaleza proteica. (Carvajal, 2010)

#### **En almacén**

Una alternativa para prevenir o reducir la producción de aflatoxina en granos almacenados es el uso de inhibidores fungales químicos como ácido acético, sales y mezclas de ácido propiónico (propionato de amonio, calcio y sodio), a 16, 18,20 y 22% de humedad y a 27°C, es decir, condiciones favorables de crecimiento. Se puede observar de 89 a 97% de reducción en el crecimiento de *A. flavus*. (Montes y Carvajal, 1998) también son útiles los antimicrobianos naturales como timol, eugenol, carvacrol (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno y Gil, 1991).

**Gases.-** Las especies de *Aspergillus* son aerobias, y a niveles de 1% de oxígeno en el ambiente se detiene su desarrollo y por ende la producción de toxinas. (Moreno y Gil, 1991). Concentraciones de CO<sub>2</sub> mayores a 20% inhiben la germinación de las esporas. Concentraciones de 10% suprimen la producción de aflatoxinas. Concentraciones de oxígeno menores a 20 y mayores a 90% también inhiben la concentración de aflatoxinas (Moreno, 2004; Tabak y Cooke, 1968; Landers *et al.*, 1967).

**pH.-** La influencia del pH va estrechamente ligada al resto de factores ambientales como la temperatura o la aw. Por lo general las especies de *Aspergillus* toleran mal los valores de pH ácidos (2-3), su crecimiento se ve menos afectado por pH alcalinos. (Erlich y Cotty, 2003). La alcalinidad que ofrece el revestimiento de semillas con ceniza de fogón, las protege de la infección por hongos (comunicación personal, Restrepo, 2011, Soriano, 2007).

**Revestimiento de semillas con harina de rocas y ceniza.-** Los chinos hace años están utilizando la harina de rocas con énfasis en la riqueza de los elementos raros (grupo 3B de la tabla periódica) que ellas contienen. La presencia de los elementos tierras raras en las harinas es la explicación racional para que estén revistiendo todas sus semillas antes de llevarlas al cultivo. En las diferentes culturas andinas es muy común encontrar a Quechuas, Aimaras, Guaraníes y Guambianos, entre otras civilizaciones, que revisten sus tubérculos con cenizas y polvo de rocas, no solamente para llevarlos al cultivo, sino también para guardarlos (Restrepo y Pinheiro 2009).

Durante la germinación de las semillas y los brotes de un grano hay una ruptura de tejidos por el crecimiento, turgencia, multiplicación y metabolismo celular que facilita la acción de las toxinas de los hongos causantes de enfermedades en los vegetales, los cuales necesitan de condiciones necrotróficas. Entonces la biología molecular descubrió que los principales inhibidores de esas toxinas son los elementos tierras raras como lantano, cerio, praseodimio, neodimio, promecio, samario, europio, gadolinio, terbio, disprosio, holmio, erbio, tulio, iterbio y lutecio, entre otros presentes en algunas rocas. Fue este uno de los grandes motivos por los cuales los chinos comenzaron a revestir sus semillas y a cubrir los surcos de sus cultivos con polvo de piedras o harina de rocas, que contiene una significativa presencia de estos elementos. Con este proceso la reducción de las enfermedades en los cultivos es evidente y el aumento de sus cosechas es extraordinario, a tal punto que la cantidad y calidad de aceites presentes en muchos cultivos ya representa una nueva riqueza (Restrepo y Pinheiro 2009).

En toda Latinoamérica todavía hay presencia de estos elementos en muchas de sus piedras o harina de rocas, que se encuentran al alcance de todos por doquiera transitemos. Los resultados de la remineralización de los cultivos, con compostas y biofertilizantes, enriquecidos con los polvos de piedras o la aplicación de la harina de rocas en los suelos son la obtención de alimentos enriquecidos con macro y microtrazos minerales, vitaminas, pigmentos antioxidantes, aromas, color y perfume; por otro lado, tenemos la garantía de que los alimentos durarán más en el almacén o en la despensa (Restrepo y Pinheiro 2009).

## **Destoxificación**

Aunque las aflatoxinas son sensibles a oxidantes enérgicos, álcalis, amoniaco, y eventualmente a la degradación microbiana no existe actualmente una tecnología para la eliminación de las mismas una vez que los alimentos han sido contaminados (Ortiz, 1992). Sin embargo algunos métodos, tanto físicos, como químicos y biológicos han sido probados.

## **Tratamientos físicos**



Las aflatoxinas son termorresistentes, algunos autores mencionan que en ciertos alimentos se requieren temperaturas de hasta 300° C para eliminar la toxina, puesto que la AFB<sub>1</sub> es estable hasta 260° C. Uno de los métodos físicos utilizados en maíz es el tostado o freído a 100-150° C durante 30 min, reduce la AFB<sub>1</sub> en un 40 a 80%. Otro método utilizado es la adsorción. En el caso de las aflatoxinas, el carbón activo se considera relativamente eficaz. En cuanto al uso de la radiación, se ha experimentado con luz solar, luz ultravioleta y radiación Gamma obteniéndose resultados diversos. En cuanto a las atmosferas modificadas, las mismas se han usado en el control de *Aspergillus* y otros hongos de almacén y por ende la producción de aflatoxinas, esto se realiza aumentando la concentración de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> y generalmente se asocia con la disminución de las temperaturas en el silo (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007).

### **Tratamientos químicos**

**Nixtamalización.-** La tortilla, esta se obtiene siguiendo un proceso tradicional llamado nixtamalización, cuya alcalinidad ha demostrado que es capaz de reducir las concentraciones de aflatoxina en un 96%, incluso en maíz altamente contaminado. (Anguiano *et al.*, 2005). El ozono aparentemente degrada las aflatoxinas en cereales. La alcalinización, el uso de amoníaco, peróxido de hidrógeno, ozono, peroxidasa, hipoclorito de sodio, metanol, aldehídos, peróxido de benzoilo, permanganato de potasio, etc. ayudan a eliminar las aflatoxinas, pero muchas de estas sustancias pueden tener efectos negativos en la salud humana o bien degradar la calidad alimentarias (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007; Ellis *et al.*, 1991; Samarajeewa *et al.*, 1990).

### **Tratamientos biológicos**

Se ha investigado sobre la aplicación de cepas atoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que compiten con cepas tóxicas produciendo una reducción en la contaminación de aflatoxinas cercana a un 99% en cacahuete. También se han realizado aplicaciones en algodón en Texas en los EEUU con la cepa AF<sub>36</sub> contra *A. flavus*. La aplicación de ciertos microorganismos como *Flavobacterium aurantiacum* ha resultado efectiva en la eliminación de aflatoxina B<sub>1</sub> en aceites vegetales. También se han tenido experiencias con aplicación de

mezclas de *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, que reducen la disponibilidad de aflatoxinas en la dieta, pero ciertas cepas de *Lactobacillus lactis* podrían dar lugar a la transformación de la aflatoxina B<sub>1</sub> a aflatoxicol, compuesto con las mismas propiedades carcinogénicas que la anterior. (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007; Moreno, 2004).

## Legislación

Diferentes legislaciones tanto internacionales como nacionales establecen límites máximos de tolerancia en diferentes alimentos, además de normalizar muestreos y análisis, esto debido a que el contenido de sustancias tóxicas es inevitable en los alimentos (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Límites establecidos en la NOM (Norma Oficial Mexicana)-187-SSAI/SCFI-2002

PRODUCTO	LIMITE MAXIMO AF
Harinas y Cereales	20 µg / Kg
Tortillas y Harina de maíz nixtamalizado	12 µg / Kg

**Cuadro 6.** Límites permitidos por la FDA de los EU para aflatoxinas en alimentos

ARTÍCULO	NIVELES COMUNES (MG/KG)	NIVELES CON EPISODIOS TÓXICOS (µG /KG)	NIVELES PERMISIBLES DE LA FDA
Cacahuete	2-6	30-125	20 PPB (µG/KG) en alimentos; 0,5 ppb de aflatoxina M1 en leche.
Mantequilla de cacahuete	10	14-213	
Cacahuete Azucarado	20	30-230	
Maíz	>10	.	

**Cuadro 7.** Límites máximos de aflatoxinas admitidos por la Unión Europea

PRODUCTO	LIMITE MÁXIMO
Cacahuates, Frutos de Cáscara y Frutos Secos para Consumo Humano	2 µg / Kg
Cacahuates procesados	8 µg / Kg
Cereales y derivados	2 µg / Kg
Maíz procesado	5 µg / Kg
Espicias	5 µg / Kg

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Se examinaron muestras de maíces colectados al azar en: Chiapas, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Figura 7), estas muestras fueron de maíces blancos, amarillos y de colores colectados de forma aleatoria en campo, silo y restos de cultivo.



**Figura 7.** Zonas de colecta

### Detección de micobiota asociada

De muestras compuestas por un kilo, se seleccionaron granos no dañados para ser sometidos a una desinfección con cloro al 3% durante un minuto, posteriormente fueron enjuagados tres veces en agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel estéril.

Una vez secos, los granos fueron sembrados en cajas Petri de 9 cm de diámetro manteniendo una distancia equidistante entre las 10 semillas contenidas por cada una de las 10 cajas utilizadas por cada uno de los medios de cultivo los cuales fueron: Malta sal agar (MSA) al 6% de NaCl y Papa dextrosa agar (PDA). Posteriormente se incubaron por 7 días a  $25^{\circ}\text{C}\pm 2$  para evaluar la microbiota.

### **Obtención de cultivos monospóricos**

Los hongos que presentaron características pertenecientes a *Aspergillus* Sección *Flavi*, consistentes en la presencia de color verde amarillento en las colonias y la observación de cabezuelas en el estereoscopio, se seleccionaron y aislaron por medio de un explante de 0.5 cm de diámetro realizado con la ayuda de un sacabocados; una vez extraído, cada uno fue colocado dentro de tubos eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de agua destilada y esterilizada para agitarlo por 30 segundos en vórtex, de dicha solución, se extrajeron 10  $\mu\text{l}$  para ser extendidos con asa de vidrio estéril en cajas Petri con PDA y se incubaron a  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas, con una aguja estéril, se extrajo un punto de crecimiento y se resembró en cajas Petri con PDA para ser incubado a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y obtener cultivos monospóricos. (Sepúlveda y Piontelli, 2005).

### **Identificación de especies de *Aspergillus* y caracterización de cepas**

De los cultivos monospóricos, se tomaron explantes de 0.5 cm de diámetro por hongo para depositarlos por triplicado en cajas Petri, conteniendo agar Czapek con extracto de levadura (ACY) y (AFPA), para confirmar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Rodrigues *et al.*, 2007; Sepúlveda y Piontelli, 2005).

Al término de su incubación por 7 días a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , se midió el diámetro de las colonias, y se registró junto con su color y aspecto. A los 10 días de crecimiento fúngico, se

determinó la presencia o ausencia de esclerocios; en caso afirmativo, se tomaron datos de su tamaño, número y forma.

Para la caracterización microscópica, se observaron conidias, fiálides y métulas por medio de microscopio óptico y se realizó la identificación con referencia en la clave de Klich (2002). El conteo de esclerocios fue realizado mediante el raspado de los mismos de las cajas Petri que los contenían. De éstos, se eligieron 100 al azar para ser medidos en microscopio con objetivo reglado.

### **Detección de aflatoxinas**

Para observar la presencia de aflatoxinas, se sembraron explantes de los hongos en estudio sobre agar coco extracto de levadura (ACY) y se incubaron por 5 días a  $27\pm 2$  °C, con el fin de detectar las cepas toxigenicas haciendo uso de su fluorescencia al exponerlas bajo luz ultravioleta (Rodrigues *et al.*, 2007; Sepúlveda y Piontelli, 2005; Medina *et al.*, 2002).

### **Identificación del tipo de aflatoxina**

La identificación de aflatoxinas (AFB y/o AFG) de las cepas aisladas se determinó utilizando el método de Filtenborg y Frisvad (1980) y Filtenborg *et al.* (1983), que consistió en aplicar directamente sobre la placa cromatográfica un explante de agar de 0.5 cm de diámetro cortado con un sacabocados de una colonia en agar Czapek extracto de levadura (ACY) de 7 días mantenida a 25°C. La detección de las micotoxinas se realizó usando placas de cromatografía de sílica gel G60 (20 x 20 cm, 0.25 mm espesor, Merck5721, Alemania). El solvente de corrida para la detección de aflatoxinas fue cloroformo-acetona (90:10) (Fernandez Pinto, Patriarca, Locani y Vaamonde, 2001). La visualización de las aflatoxinas se realizó bajo luz UV (360 nm). Las cepas que presentaron fluorescencia color azul correspondieron a AFB y las que presentaban fluorescencia color verde, a AFG.

### **Cuantificación de aflatoxinas**

La cuantificación total de aflatoxinas se realizó por medio del método Aflatest de Vicam (Vicam, 1999), modificado, para lo cual se pesó el contenido del medio de cultivo de una caja Petri. Sobre ese peso se ajustaron los valores de metanol (80%) y de cloruro de

sodio, requeridos para la extracción de aflatoxinas en el método original. Posteriormente se licuó por 10 segundos, se filtró con papel Whatman no.1. y se tomaron 10 ml del filtrado para diluirse en 40 ml de agua destilada. Se extrajo 1 ml de la dilución para realizar un segundo filtrado por papel fibra de vidrio pasándolo por la columna de anticuerpos monoclonales previamente acondicionada.

La misma se lavó 3 veces con agua destilada y posteriormente se retomó el eluato con 1ml de metanol grado HPLC en una cubeta de vidrio. Se añadió 1.0 ml de solución reveladora de bromo, se agitó por 1 min. y se leyó en un fluorómetro marca Vicam serie 4 (Moreno, 2004; NOM-188-SSA1-2002).

### **Análisis estadístico**

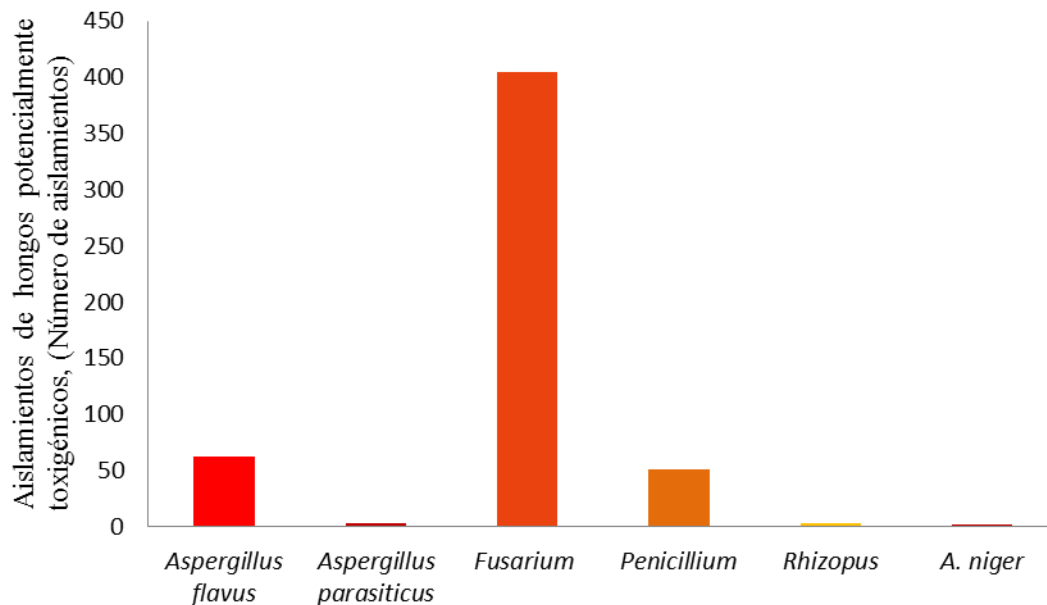
La incidencia de hongos presentes en los granos de maíz, fue expresada porcentualmente.

Los resultados se analizaron con el paquete Graphpad Prisma 5.0 para Windows, donde se calculó la correlación existente entre la cantidad de aflatoxina producida con respecto al tipo y cantidad de esclerocios por cepa, esto se obtuvo por medio del coeficiente de Spearman con un intervalo de confianza del 99%. (Motulsky, 2003)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Presencia de hongos potencialmente micotoxigénicos en granos de maíz

Se realizó la identificación de hongos presentes en las muestras provenientes de los 14 puntos geográficos seleccionados para este estudio (Apéndice 1), donde el orden de incidencia total fue el siguiente: *Fusarium* en un 76.99% (405±34.16 aislamientos), *Aspergillus flavus* estuvo presente en un 11.72% (62±2.68), seguido por *Penicillium* en un 9.69% (51±3.97), *Aspergillus parasiticus* con 0.57 % (3±0.58), *Rhizopus* con 0.53% (3±0.58) y por último *A. niger* con un 0.38% (2±0.53) (Grafica 1, Figura 8).



**Grafica 1.** Incidencia de hongos con potencial micotoxigenico presentes en muestras de 14 puntos geográficos de la República Mexicana.



La mayor incidencia de hongos con potencial micotoxigénico se presentó en muestras provenientes de Guanajuato con un total de 108 aislamientos, seguido por muestras provenientes del estado de Quintana Roo con 101. En ambos casos, la frecuencia de aparición de *Fusarium* fue del 100%, por el contrario, los estados cuyas muestras presentaron la menor incidencia de este patógeno fueron Tamaulipas y Sonora, con solo un 2%. Este último presentó la menor cantidad registrada de hongos con potencial micotoxigénico, al encontrarse solo 6 aislamientos, seguido de Tamaulipas con 10.

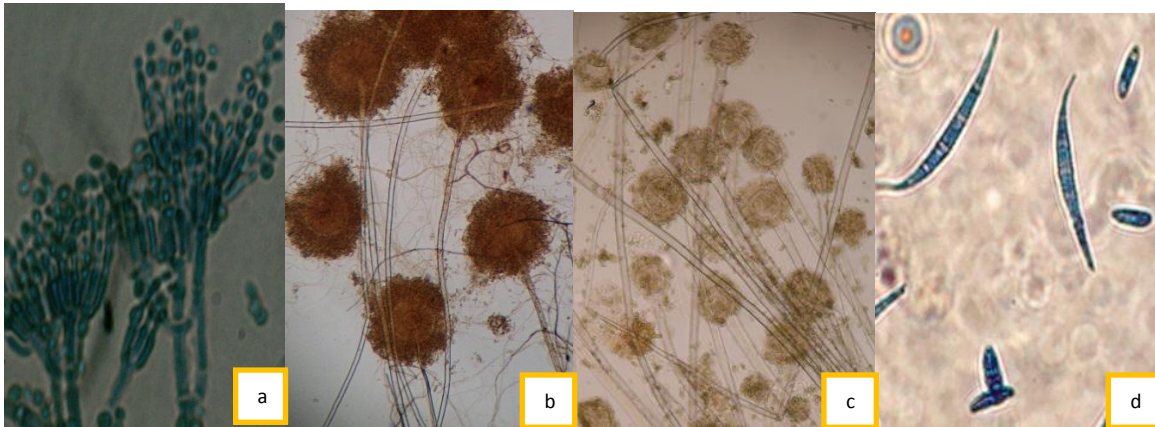
Las muestras provenientes de Hidalgo, presentaron la mayor incidencia de *Aspergillus* con un 10% de la especie *flavus*, lo que representa una densidad relativa del 62.5%; su densidad relativa en cuanto a *Fusarium* fue del 25%, contrastando con las muestras provenientes de Quintana Roo; el único punto geográfico donde no se detectó la presencia de *A. flavus* y *Fusarium* estuvo presente en un 100%.

En la muestra proveniente de Chiapas, *Penicillium* fue el hongo predominante, con 61.9% cabe destacar que fue esta muestra donde se presentó este hongo en mayor cantidad, mientras que en muestras tomadas en Nayarit, Nuevo León y Quintana Roo no fue detectado (Gráfica 2).

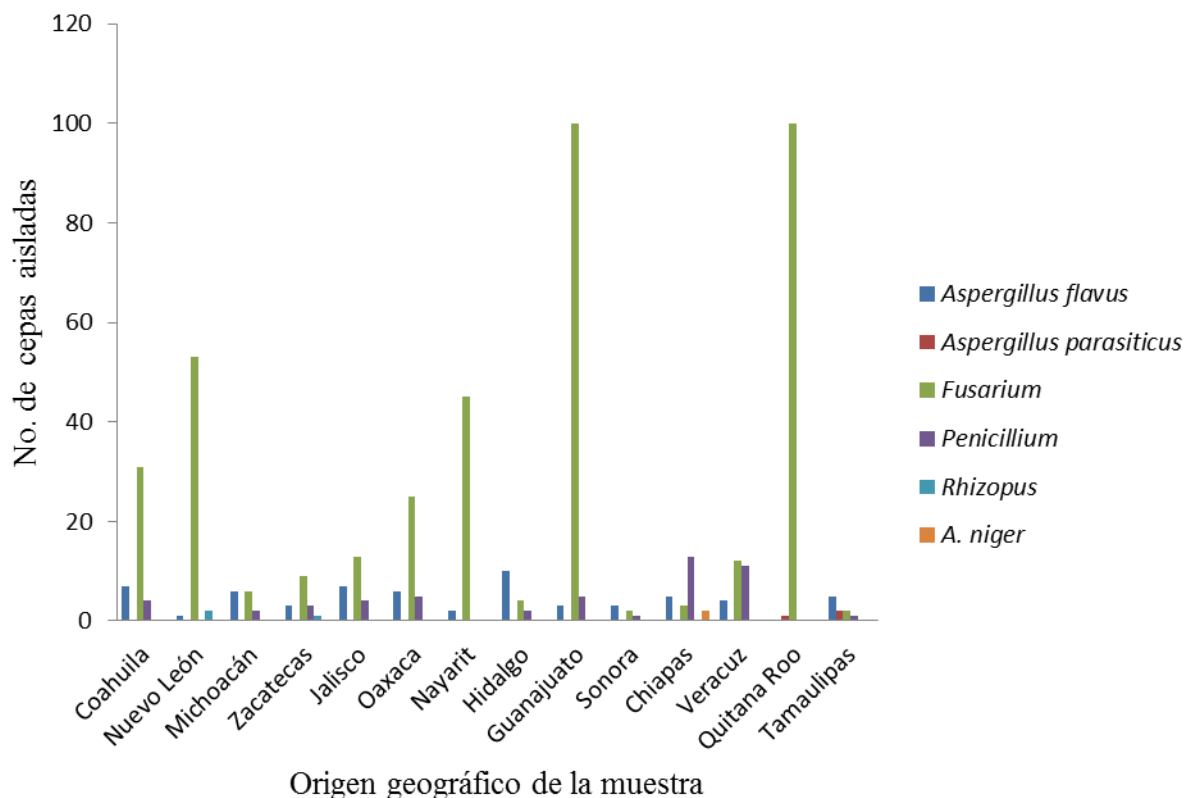
Estos resultados coinciden con Hernández *et al.* (2007), que obtuvieron micobiotas similares en granos de maíz colectados de campo en el norte de Tamaulipas, con un 76.9 % de *Fusarium*, 11.6 % de *Penicillium* y 3.1 % de *Aspergillus*. También muestran similitud con los resultados obtenidos por Bucio *et al.* (2005), que encontraron 30.7 % de *Fusarium* en maíces recién cosechados de 14 municipios del estado de Guanajuato.

En muestras de maíz provenientes de todos los puntos geográficos se aisló por lo menos una cepa de la sección *Flavi*, la especie dominante fue *A. flavus* con un 95.38%. Esto coincide con lo obtenido por Moreno (2004), donde se obtuvo *A. flavus* en el 100% de las 18 muestras de maíz de granos almacenados, obtenidos de Tamaulipas, Campeche, Guadalajara, Sinaloa y Chiapas proveídos por CONASUPO, coincidiendo igualmente con lo afirmado por Zummo *et al.*, 1990, que indican que *Aspergillus flavus* posee mayor potencial de contaminación en los granos de maíz en campo que *Aspergillus parasiticus*.

Estos resultados hacen reflexionar sobre el alto consumo de Maíz en México, consumiéndose preferentemente en forma de tortillas con un consumo per cápita de 49 kg anuales, es decir 133 g diarios (SIAP, 2011)



**Figura 8.** Fotografías al microscopio óptico de (a) conidióforo de *Penicillium*, (b) cabezuelas de *Aspergillus parasiticus*, (c) cabezuelas de *Aspergillus flavus*, (d) conidias de *Fusarium*.



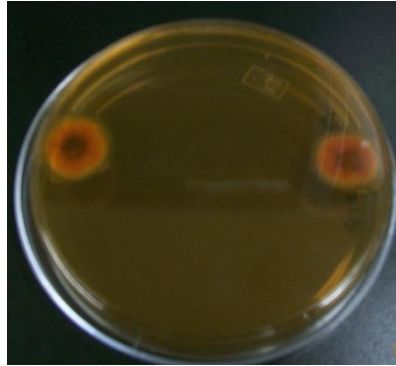
**Gráfica 2.** Cepas de hongos con potencial micotoxigénico aisladas por origen geográfico.

Cabe destacar, que a pesar de la alta incidencia de *Fusarium*, las toxinas producidas por este hongo poseen menor potencial micotoxigénico que las originadas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Ya que las fumonisinas (producidas por *Fusarium*), son calificadas en la IARC como del grupo 2B, es decir, como un agente posiblemente carcinógeno pero la evidencia en humanos es limitada y tampoco existe suficiente evidencia en animales de experimentación, mientras que las toxinas producidas por los *Aspergillus*, son calificadas como del grupo 1 (siendo las únicas pertenecientes a este grupo), lo que las califica como agente carcinógeno en humanos. Para objetivos de este trabajo, solamente se continuó trabajando con los hongos pertenecientes al género *Aspergillus*. (Apéndice 2)

### **Caracterización de aislados de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y aflatoxinas**

#### **Morfología**

El 100% de los aislamientos de *Aspergillus* sembrados en AFPA exhibió color anaranjado al reverso del crecimiento micelial a las 72 horas, lo que afirma que corresponden a la sección *Flavi* (Figura 9).

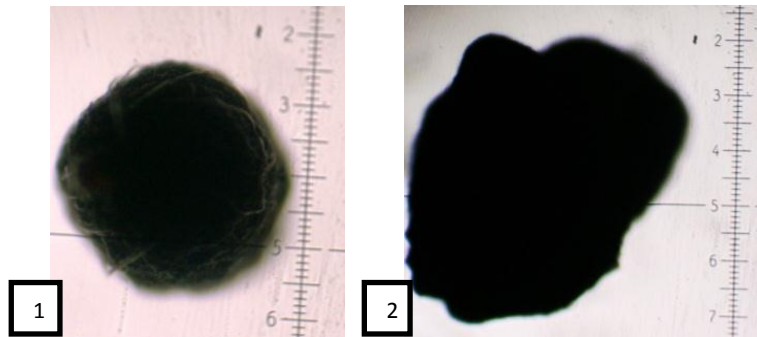


**Figura 9.** Caja Petri con medio diferencial AFPA, indicando presencia de *Aspergillus*.

Posteriormente, se caracterizó la morfología (macro y microscópicamente) en czapeck extracto de levadura a 25 y 37°C tomando en cuenta los siguientes parámetros: crecimiento de la colonia, forma de la colonia, color de la colonia, características miceliales, número de esclerocios, forma de los esclerocios, tamaño de los esclerocios, tipo de esclerocio y cabezuela monoseriada y/o biseriada (Apéndice 3).

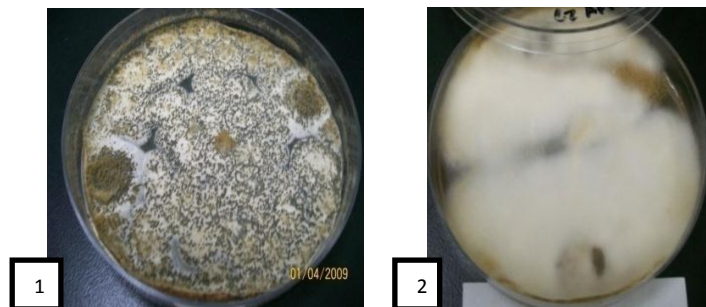
El crecimiento colonial en CYA a los 5 días fue similar:  $217 \pm 0.18$  mm para *A. flavus* y  $219 \pm 0.23$  mm para *A. parasiticus* en promedio.

A 10 días de crecimiento, 54 de las 65 cepas aisladas, produjeron esclerocios. Dentro de estas 54 cepas, 33 produjeron esclerocios de tipo L ( $>400 \mu\text{m}$ ) con un promedio de  $451 \pm 35.53 \mu\text{m}$  de diámetro. 21 cepas fueron productoras de esclerocios tipo S ( $<400 \mu\text{m}$ ) con un diámetro promedio entre  $294 \pm 71.64 \mu\text{m}$  (Figura 10).



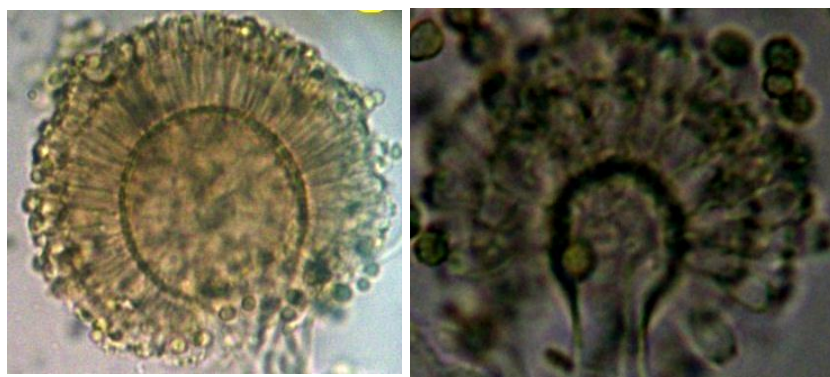
**Figura 10.** Esclerocio S (1), esclerocio L (2)

Los producción por cepa de esclerocios tipo L fluctuó entre  $1 \pm 0.71$  en cepas aisladas de Coahuila, Michoacán y Chiapas a  $166 \pm 17.68$  esclerocios en Oaxaca. Comparativamente, la producción por cepa de esclerocios tipo S fluctuó de  $2 \pm 2.83$  en cepas de Hidalgo, a  $19980 \pm 90.21$  en cepas provenientes de Veracruz y Chiapas. 11 cepas no produjeron esclerocios (Figura 11).



**Figura 11.** Cepa altamente productora de esclerocios (1) y cepa no productora de esclerocios (2).

En cuanto a la ornamentación de las cabezuelas, 64.61% de las cepas, presentaron méculas y fiálides (Figura 12).



**Figura 12.** Cabezuelas conidiales mono (izquierda) y biseriadas (derecha) de *Aspergillus flavus*.

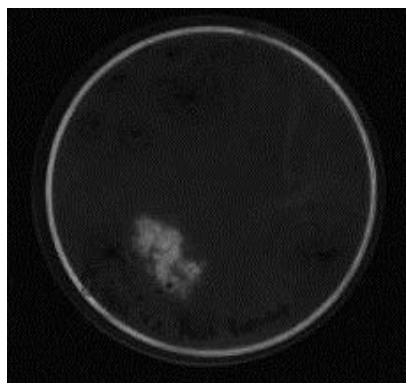
Los resultados son similares a los obtenidos por Moreno (2004), donde de un total de 18 muestras de maíz de granos almacenados analizadas, 87.5% produjo esclerocios tipo L, con un diámetro promedio de  $675.2\mu$ , el 5.5%, esclerocios tipo S, con un diámetro de  $313\mu$  y el 11.11% de las cepas no produjo esclerocios.

También coinciden con lo obtenido por Pildain *et al.*, (2005), donde en 188 cepas de *A. flavus* aisladas de cacahuete, el 46.8% formó esclerocios tipo L, 25% del tipo S y 28.19% no formó esclerocios y con Nesci y Etcheverry (2002), donde obtuvieron un 100% de cepas productoras de esclerocios. Las cepas aisladas de Oaxaca, Nuevo León, Nayarit y Jalisco presentaron esclerocios tipo L, mientras que en las aisladas de Tamaulipas y Michoacán, los esclerocios fueron tipo S.

### **Producción de aflatoxinas**

#### **Fluorescencia bajo luz UV en agar coco (ACY)**

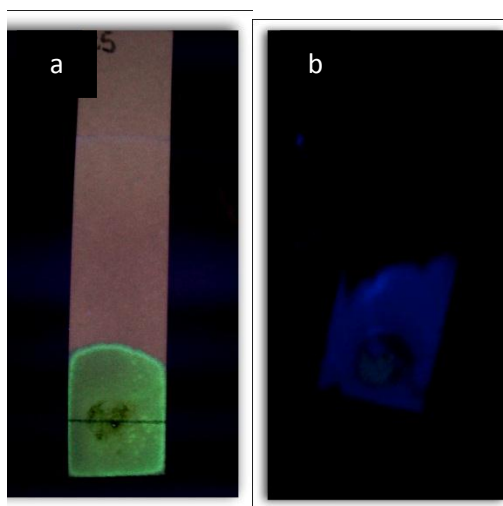
El 100% de las cepas aisladas de *Aspergillus flavus* (62) y *Aspergillus parasitus* (3) expresaron fluorescencia bajo luz UV en ACY a los 5 días de crecimiento, lo que afirma la presencia de aflatoxinas (Figura 13). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sepúlveda y Piontelli (2005), donde el 44% de las cepas de *A. flavus* analizadas presentaron halo azul fluorescente a los 5 días de crecimiento y con Medina *et al.*, (2002), donde el 84% de las muestras analizadas resultaron positivas al análisis en ACY.



**Figura 13.** Cepa presentando fluorescencia bajo luz UV en ACY

### **Identificación del tipo de toxina por cromatografía en capa fina**

La totalidad de las muestras presentaron fluorescencia color azul, indicativo de AFB, de estas, tres mostraron igualmente ser positivas a AFG, ya que la placa cromatográfica mostraba ambos colores. Dichas tres cepas, eran de la especie *A. parasiticus* (las cepas fueron: AF58, AF59 y AF64) (Apéndice 4, Figura 14).



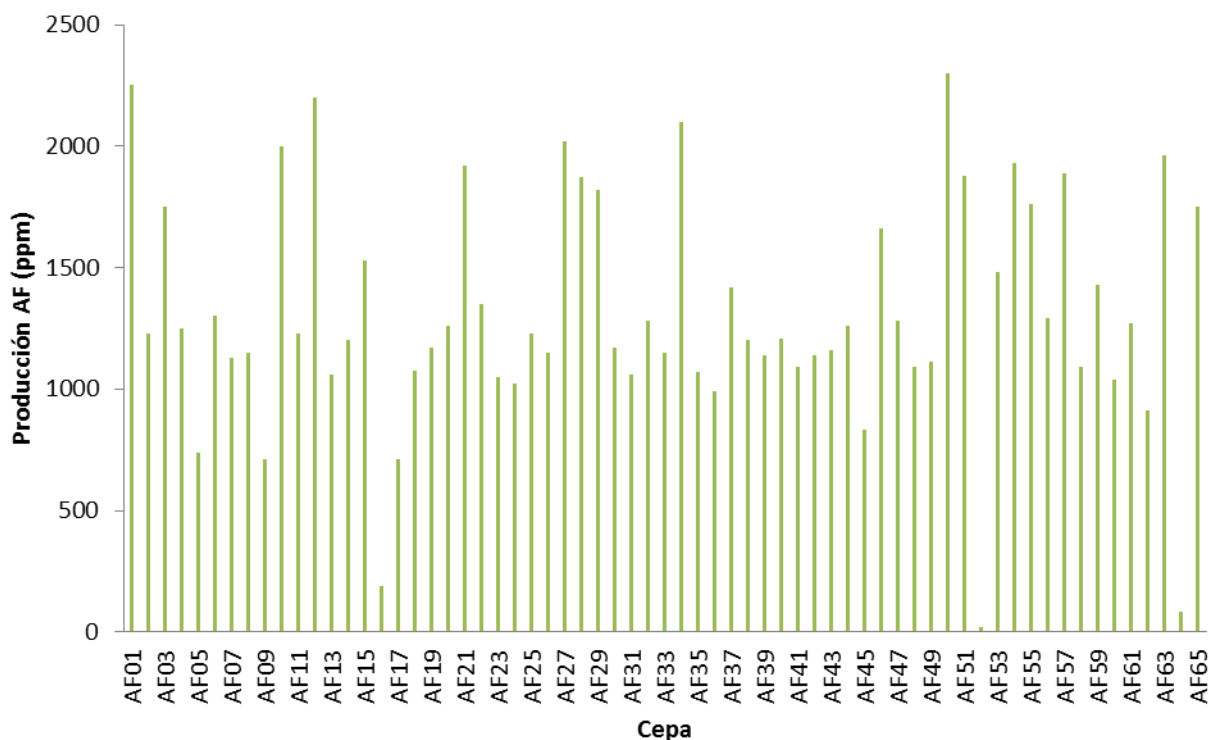
**Figura 14.** Placas cromatográficas con fluorescencia indicativa de AFG (a) y AFB bajo luz UV (b).

### **Cuantificación de aflatoxinas por el método VICAM**

La producción media de aflatoxinas sobre medio ACY de las muestras de las cepas estudiadas fue de  $1308.65 \pm 479.73$  ppb, siendo las provenientes de Veracruz las que obtuvieron la producción media más alta con  $1718 \pm 294.09$  ppb y las provenientes de Zacatecas, la menor, con  $810 \pm 675$  ppb.

La cepa más toxigénica en ACY fue AF01 de Coahuila con  $2250 \pm 212.13$  ppb y la menos toxigénica AF52 de Chiapas con  $22 \pm 8.49$  ppb. (Apéndice 5, Gráfica 3)

Lo que concuerda con Chamberlain *et al.* quienes en 1993 analizaron 28 muestras de maíz provenientes de Georgia USA, donde encontraron niveles de aflatoxina con una concentración promedio de 73 ppb en 27 de las muestras analizadas. Y con Windham *et al.*, 1998 que en campos del mismo cereal inoculados con *A. flavus*, hallaron concentraciones de aflatoxinas que variaron entre 70 y 11,936 ppm. Lo que recuerda la aleatoria distribución de aflatoxinas en el maíz.



**Grafica 3.** Producción de aflatoxinas por cada cepa en medio de cultivo.

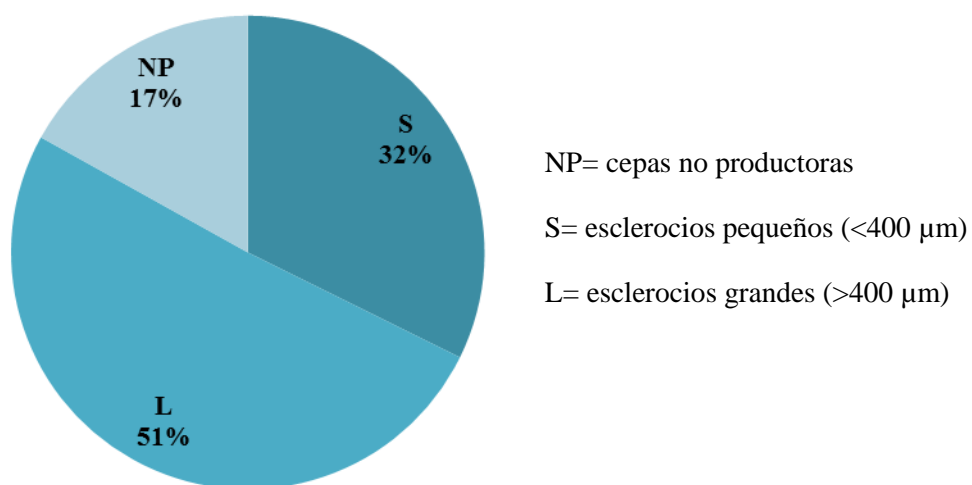
### Análisis estadístico



La correlación entre la cantidad de aflatoxina producida por cepa, con respecto al tipo y cantidad de esclerocios, fue significativa en ambos casos. Es decir, a mayor producción de esclerocios, mayor cantidad de aflatoxina, y a medida que los esclerocios disminuyen su tamaño, la cantidad de aflatoxina aumenta.

Esto coincide con Pildain *et al.*, que en el año 2005 encontró una asociación positiva entre la producción de esclerocios y aflatoxinas observada también en el año 1983 en los estudios de Wicklow y Shotwell donde se postulaba que probablemente las aflatoxinas tenían una función correlacionada con los esclerocios y que la biosíntesis de aflatoxinas y morfogénesis de los esclerocios están interrelacionadas.

La importancia de determinar cepas productoras de esclerocios tipo S, L o no productoras puede explicarse debido a que estas estructuras de resistencia presentan germinación esporogénica con lo cual un eventual control de la infección precosecha de *A. flavus* en los cultivos donde las aflatoxinas son un problema requerirá prácticas agronómicas diseñadas a reducir la importancia de los esclerocios como fuente de inóculo primario (Wicklow, 1983).



**Grafica 4.** Distribución del tipo de esclerocios

## CONCLUSIONES

- El principal hongo productor de aflatoxina *Aspergillus flavus*, está ampliamente distribuido en los 14 orígenes geográficos analizados, de igual manera, lo están los hongos potencialmente toxigénicos *Fusarium* y *Penicillium*. Con incidencias de: *Fusarium* 76.99 %, *Aspergillus flavus* 11.72 %, *Aspergillus parasiticus* 0.57 % y *Penicillium* 0.53 %.
  
- El 100% de los orígenes geográficos analizados, presentaron por lo menos una cepa del género *Aspergillus*. 62 aislados pertenecieron a *A. flavus*, y 3 a *A. parasiticus*. De estas cepas, el 100% manifestó capacidad para producir aflatoxinas (62 cepas produjeron AFB y 3 AFB y AFG). En la cuantificación de éstas, el 100% de las cepas fueron capaces de producir toxinas *in vitro* en niveles superiores a los límites máximos permitidos por la Norma Oficial Mexicana-187-SSAI/SCFI-2001 establecidos en 20 ppb, para harinas y cereales, ya que las concentraciones de aflatoxinas fluctuaron entre 22 y 2250 ppb.
  
- De las 65 cepas de *Aspergillus* estudiadas, 54 produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. En 33, los esclerocios fueron tipo L y en 21, fueron tipo S, 11 cepas no produjeron esclerocios. La cantidad de aflatoxina, estuvo correlacionada positivamente con el tipo y la cantidad de esclerocios producidos por cepa. El hecho de detectar principalmente cepas productoras de esclerocios tipo L, es favorable, ya que efectivamente produjeron menores cantidades de toxina en comparación con las de tipo S.

## LITERATURA CITADA

- Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología* 2000: 17 S79-S84.
- Acosta, S. 1994. Memoria: 1er Curso–Taller sobre aflatoxinas en maíz. Antecedentes históricos e Importancia de la contaminación con aflatoxinas. Tamaulipas, México. 3-8 pp.
- Alcalá, L., Muñoz, P., Peláez, T., Bouza, E., 1997. *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. 7 pp.
- Anguiano, R. G. L., Verver, V. C. A., Guzmán P. D. 2005. Inactivación de aflatoxina B1 y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Publica, México*. 47:369-375 pp.
- Ayerst, G. 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. Stored Prod. Res.* 5:669–687 pp.
- Ayres, J., Mundt, J., Sandine, W. 1980. *Microbiology of foods*. 708 pp
- Barkin D. R. 2003. El maíz: la persistencia de una cultura en México. *Cahiers des Amériques Latines* N°40.
- Bennett J. W. y Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology reviews*. American Society for Microbiology. vol. 16 no. 3. 497-516 pp.
- Blount, P. W. 1961. Turkey “X” disease. *Conference papers. J Br Turkey Fed.* 9: 52-78 pp.
- Bogantes, L. P., Bogantes, L. D., Bogantes, L. S., 2004. Aflatoxinas. *Acta médica costarricense* v.46 n. 4
- Bucio, V., Guzman, de P. D., Peña, C. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, Mexico. *Revista Iberoam Micol.* 18:83-87

- Cabañes, F., Abarca, L., Bragulat, M., Catellá, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Especies productoras de micotoxinas. Díaz de Santos. España. p 29-61. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Carnaghan, R., Sheridan, A., Okelly, J. 1961. Toxicology associated with certain samples of groundnut. *Nature*.192: 1096- 97 pp.
- Carvajal, M. 2010. Investigación sobre aflatoxinas ¿Para qué? Departamento de Botánica. Instituto de Biología, UNAM. 5 pp.
- Chamberlain, W. J., Bacon, C. W., Norred, W. P., Voss, K.A. 1993. Level of fumonisin B1 in corn naturally contaminated with aflatoxins. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 31, Issue 12. 995-998 pp.
- Christensen, C. M. 1974. Storage of cereal grains and their products. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul. 549 pp.
- Council of Agricultural Science and Technology (CAST). 1989. Mycotoxins: Economic and Health Risk. Task Force Report No. 116.
- D'mello, J.P.F. y McDonald, A.M.C. 1997. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. European commission 2002.
- Denli, M., Pérez, J. F. 2006. Contaminación por micotoxinas en los piensos: efectos, tratamiento y prevención. XXII Curso de especialización FEDNA. 17 pp.
- Devegowda, G., Raju, M.V.N., Afzali N., Swamy, H.V.L.N. 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. In: Proc. Alltech's 14<sup>th</sup> Annual Symposium.
- Ehrlich, K., Cotty, P.J. 2003. New insights into pH regulation of aflatoxin production by *Aspergillus* species. XXII Fungal Genetics Conference Proceedings. Abstract No. 201. 283 pp.

- Ellis, W.O, Smith, J.P., Oldham, J.H. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosintesis, effects on organism, detection and methods of control. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 30:403-439 pp.
- Fokunang, C.N., Tembe, E.A., Tomkins, P., Barkwan, S. 2006. Global impact of mycotoxins on human and animal health management. *Agriculture* 35: 247–253 pp.
- Frisvad, J. C., Samson, R. A. 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. *Handbook of applied mycology: foods and feeds*, vol. 3. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 31–68 pp.
- Galtier, P. 1999. Biotransformation and fate of micotoxinas. *Journal of Toxicology Review* 295-312 pp.
- Gendy, S. M., Marth, E. H. 1989. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection* 44: 211–221 pp.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P. 2007. Studies on *Aspergillus* Section *Flavi* isolated in northern Italy from maize. *International Journal of Food Microbiology* 113: 330-338 pp.
- Guzman, D., Trudel, L., Wogan, G.N. 1995. Corn nixtamalization and the fate of radiolabelled aflatoxin B<sub>1</sub> in the tortilla making process. *Bulgarian Environmental Contamination and Toxicology* 55:858-864 pp.
- Guzmán, D. 2006. Las aflatoxinas en maíz: desde la contaminación en campo hasta la legislación en México. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48:126-130 pp.
- Guzmán de P. D. 2006. Biotecnología. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48. No. 2. 126–130 pp.

- Horn, B.W., Greene, R.L. 1995. Vegetative compatibility within population of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii* from a peanut field. *Mycologia* 87: 324-332 pp.
- Hussein, H.S. Brasel, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167: 101- 34 pp.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2006. Disponible en [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)
- Ito, Y., Peterson, W., Wicklow, D., Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233-239 pp.
- Juan, C., Soriano, J. M., Burdaspal, P. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Aflatoxinas del grupo B y G. Díaz de Santos. España. Coord. José Miguel Soriano del Castillo. 91-117 pp.
- Klich, M. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Netherlands. In Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116p.
- Krishnamachari, K. A. V., Bhat, R. V., Nagarajan, V., Tilak, T. B. G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis, an outlook in western India. *Lancet* 1: 1061–1063 pp.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers*. 161: 1–188 pp.
- Kurtzman, C., Horn, B., Hesseltine, C. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxina producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53:147-158 pp.
- Lacey, J., Ramakrishna, N., Hamer, A., Magan, N., Marfleet, L. C. 1991. Grain fungi. Handbook of applied mycology: foods and feeds. Marcel Dekker, Inc., New York. Vol. 3. 121-178 pp.

- Landers, K. E., Davies, N. D., Diener, U. L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxina production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopathology* 57: 1086-1967 pp.
- Lawlor, P.G. y Lynch P. B. 2001. Mycotoxins in pig feeds. 1: source of toxins, prevention and management of mycotoxicosis. *Peer Review* 54: 117-120 pp.
- López, G. Park, D., Phillips, T., 1999. Sistema integrado de gestión de micotoxinas. Tercera conferencia internacional sobre micotoxinas. FAO/OMS/PMA sobre Micotoxinas. Túnez, Túnez.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D. 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology* 60: 150–163 pp.
- Massey, T. E., Smith, G. B., Tam, A. S. 2000. Mechanisms of aflatoxin B<sub>1</sub> lung tumorigenesis. *Exp Lung Res.* 26: 673-683 pp.
- Mazzani, C., Luzón, O., Chavarry, M. 2004. *Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela. *Entomotropica* 19:157-159 pp.
- Medina, F., Irej, J., Roque, M. 2002. Determinación de aflatoxinas en algunos productos naturales utilizando el medio agar coco y Elisa ligada. *Ciencia e Investigación* 2: 46-54 pp.
- Miller, J. D. 1994. Conference Report: 6th International Working Conference on Stored-product Protection. *Australian Mycotoxin Newsletter.* 5: 1-8 pp.
- Montes, B. Carvajal, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection.* Mexico.61: 616-619 pp.
- Moreno, E. 1988. Manual para la identificación de hongos de granos y sus derivados. UNAM. México, DF. 109 p.

- Moreno, E., Gil, M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. México, df. 42 p.
- Moreno, J. 2004. Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis para obtener el grado de Maestría en Microbiología. FES-Cuautitlán-UNAM
- Motulsky, H. (2003). Prism 4 statistics guide—statistical analyses for laboratory and clinical researchers. GraphPad Software Inc, San Diego, CA 122–126.
- Murray, P. R., Pfaller, M. A., Tenover, K. C., Tenover, K. S. 2006. Microbiología médica. 5ta ed. Elsevier. 974 p.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. 2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>
- Official Journal of the European Union (OJ). 2003. “Amending Regulation (EC) 466/2001 as regard aflatoxins”. Commission Regulation (EC) No. 2174/2003. L326/12
- Ortiz, A. 1992. Manual de procedimientos para el análisis de aflatoxinas. Almacenes Nacionales de Depósito. Centro Nacional de Investigación, Certificación y Capacitación. 223 p.
- Payne, G. A. 1992. Aflatoxins in maize. Crit. Rev. Plant Sci. 10:423–440.
- Payne, G.A., Adkins, C. R. 1988. Aflatoxin accumulation in inoculated ears of field-grown maize. Plant Dis. 72:422–424 pp.
- Peterson, S., 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia 100:205-226 pp.



- Peterson, S.; Ito, Y., Horn, B., Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703 pp.
- Pildain, M. B., Cabral, D., Vaamonde G. 2005. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la argentina, caracterización morfológica y toxigénica. INTA, Argentina. 3:3-19 pp.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1997. *Fungi and food spoilage*. Academic Press, Sydney, Australia: 593 p.
- Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds an updated review. *Rev Med Vet.* 149: 479-492 pp.
- Plasencia, J. 2005. Aflatoxin and food safety. *Aflatoxins in maize: A Mexican perspective*. Chapter 4. 59-71 pp.
- Raper, K.B., Fennell, D. I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company. 686 p.
- Resnik, S.L. 1997. Micotoxinas. Conferencia en el Primer Congreso Binacional de Producción Animal. 21° Congreso Argentino (AAPA) y 2° Congreso Uruguayo (AUPA). *Revista Argentina Producción Animal.* 17:221-225 pp.
- Restrepo, J., Pinheiro, S., 2009. *Agricultura Orgánica, Harina de Rocas y la Salud del Suelo al alcance de todos*. 204 p.
- Restrepo, comunicación personal. Michoacán, 2011.
- Rodriguez, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N., Venâncio, A. 2007. Identification and characterization of *A. flavus* and aflatoxins. *Com. Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Mendez-Vilas (Ed). 527-534 pp.

- Ruiz, M., Font, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Toxicidad y Evaluación de Riesgos. Díaz de Santos. España. P 15-27. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Scientific Comitee of Food (SCO). 1996. Opinion of Aflatoxins Ochratoxin A and Patulin expressed on 23 september 1994. Report of Scientific Comitee of Food -36 Series. European Commision, DG Industry.
- Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen, M. D., Wei, C. I. 1990. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. Journal of Food Protection 53:489-501 pp.
- Sanchis, V., Marin, S., Ramos, A. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 63-89. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., Carnaghan, R. B. A. 1961. Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. Nature. (London) 192: 1095-1097 pp.
- Sepulveda, C., Piontelli, E. 2005. Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación argentina: énfasis en la sección *Flavi*. Boletín Micológico Vol. 20. 41:55 pp.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2007. Índice de maíz.
- Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D., Sorenson, W. C. 1966. Production of aflatoxina on rice. Applied Microbiology 14:425-428 pp.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Estadísticas del sector agroalimentario y pesquero. 2011.
- Smith, T. 2005. Update: mycotoxins and adsorbents. Feed Internacional. 15–20 pp.
- Soriano, J. M., Moltó, J., Mañes, J. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Análisis de micotoxinas

en alimentos. Díaz de Santos, España. Coord. José M. Soriano del Castillo. 396 p.

Soriano, J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Introducción. Díaz de Santos. España. 396p.

Tabak, H. H., Cooke, W.B. 1968. The effect of gaseous environment on the growth and metabolism of fungi. *Botanical Review* 34:124 pp.

United States Department of Agriculture (USDA). 2005. Managing Aflatoxins in Arizona. Arizona Cotton research and protection council. Agriculture research service. 11p

Vicam Technologies. 1999. Aflatest instruction manual. Watertown, U.S.A. 96 p.

Wicklow, D. T. 1983. Taxonomic features and ecological significance of sclerotia. Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn. *Agric. Exp. Stn.* 6-12 pp.

Wicklow, D. T., Shotwell, O. L. 1983. Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology* 29. 1-5 pp.

Windham, G. L., Williams, P. 1998. Aflatoxin accumulation in commercial corn hybrids in 1998. Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station.

Wild, C. P., Gong, Y. Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*. Vol. 31 no.1 71–82 pp.

Zakhia-Rozis, N., Catalá, A., Soriano, J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Trazabilidad y descontaminación / detoxificación de las micotoxinas. Díaz de Santos, España. Coord. José Miguel Soriano del Castillo. 119-132 pp.

Zummo, N., Scott, G. E. 1990. Relative aggressiveness of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on maize in Mississippi. *Plant Dis.* 74:978–981 pp.



## APÉNDICES

**Apéndice 1.** Número de aislamientos de los hongos con potencial toxigénico identificados en muestras provenientes de los 14 orígenes geográficos en estudio.

Origen	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>A. niger</i>	Total	Ds
Coahuila	7	0	31	4	0	0	42	12.10
Nuevo León	1	0	53	0	2	0	56	21.41
Michoacán	6	0	6	2	0	0	14	2.94
Zacatecas	3	0	9	3	1	0	16	3.39
Jalisco	7	0	13	4	0	0	24	5.25
Oaxaca	6	0	25	5	0	0	36	9.70
Nayarit	2	0	45	0	0	0	47	18.23
Hidalgo	10	0	4	2	0	0	16	3.93
Guanajuato	3	0	100	5	0	0	108	40.22
Sonora	3	0	2	1	0	0	6	1.26
Chiapas	5	0	3	13	0	2	23	4.88
Veracruz	4	0	12	11	0	0	27	5.65
Quitana Roo	0	1	100	0	0	0	101	40.75
Tamaulipas	5	2	2	1	0	0	10	1.86
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>3</b>	<b>405</b>	<b>51</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>526</b>	<b>157.72</b>
<b>Ds*</b>	<b>2.68</b>	<b>0.58</b>	<b>34.16</b>	<b>3.97</b>	<b>0.58</b>	<b>0.53</b>	<b>31.85</b>	<b>13.34</b>

**Apéndice 2.** Claves designadas a las cepas del género *Aspergillus* aisladas.

Coahuila	N. León	Mich.	Zacatecas	Jalisco	Oaxaca	Nayarit	Hidalgo	Gto.	Sonora	Chiapas	Veracruz	Q. Roo	Tamps.
<b>AF01</b>	AF08	AF09	AF15	AF18	AF25	AF31	AF33	AF43	AF46	AF49	AF54	AF58	AF59
<b>AF02</b>		AF10	AF16	AF19	AF26	AF32	AF34	AF44	AF47	AF50	AF55		AF60
<b>AF03</b>		AF11	AF17	AF20	AF27		AF35	AF45	AF48	AF51	AF56		AF61
<b>AF04</b>		AF12		AF21	AF28		AF36			AF52	AF57		AF62
<b>AF05</b>		AF13		AF22	AF29		AF37			AF53			AF63
<b>AF06</b>		AF14		AF23	AF30		AF38						AF64
<b>AF07</b>				AF24			AF39						AF65
							AF40						
							AF41						
							AF42						

**Apéndice 3.** Características morfológicas y toxicológicas de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aisladas

Cepa	Género	Sp.	Estado	Forma de la colonia	Color de la colonia	Micelio	Forma de esclerocios	Número de esclerocios	Tamaño de esclerocios (µm)	Tipo	Monoser. o Biseriad	AF	Producción media de AF (ppb)
AF01	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	1±0.71	410±289.91	L	M	B	2250
AF02	A.	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	40±7.78	411±10.61	L	M	B	1230
AF03	A.	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	83±10.61	378± 47.38	S	M-B	B	1750
AF04	A.	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	22±12.73	424±31.82	L	M-B	B	1250
AF05	A.	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	20±10.61	411±2.12	L	M-B	B	740
AF06	A.	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	11±3.54	450±48.79	L	M-B	B	1300
AF07	A.	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	18±17.68	439±4.24	L	M B	B	1130
AF08	A.	<i>flavus</i>	Nuevo León	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	11±12.02	462±66.47	L	M-B	B	1150
AF09	A.	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo	Escaso y profundo	Sin esclerocios	0	0	0	M	B	710
AF10	A.	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	1±0.71	400±283	L	M-B	B	2000
AF11	A.	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo	Aéreo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	M-B	B	1230
AF12	A.	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	M	B	2200
AF13	A.	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Alargados	12±1.41	176±2.12	S	M-B	B	1060

Continuación Apéndice 3

AF14	A.	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo	Profundo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	M- B	B	1200
AF15	A.	<i>flavus</i>	Zacatecas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Alargados y semiesféricos	63±12.73	501±17.68	L	M-B	B	1530
AF16	A.	<i>flavus</i>	Zacatecas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y semialargados	51±43.84	428±5.66	L	M	B	190
AF17	A.	<i>flavus</i>	Zacatecas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	1092±203.65	248±29.7	S	M	B	710
AF18	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y zonada	Verde amarillo brillante	Aéreo y abundante	Globosos	2±0.71	462±16.97	L	M	B	1075
AF19	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	200±2.12	349±2.83	S	M-B	B	1170
AF20	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	197±1.41	341±1.41	S	B	B	1260
AF21	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y abundante	Globosos y subglobosos	143±32.53	481±27.58	L	M	B	1920
AF22	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	29±9.19	456±21.73	L	M	B	1350
AF23	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	62±16.97	435±16.26	L	M	B	1050
AF24	A.	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y elongados verticalmente	8±5.66	424±30.76	L	M-B	B	1020
AF25	A.	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos	20±2.83	534±1.77	L	M	B	1230
AF26	A.	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y elongados verticalmente	15±1.41	463±35.71	L	B	B	1150
AF27	A.	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	30±3.54	453±8.49	L	M-B	B	2020
AF28	A.	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	166±17.68	536±919	L	B	B	1870



Continuación Apéndice 3

AF29	A.	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y abundante	Globosos y subglobosos	161±28	426±3.54	L	M-B	B	1820
AF30	A.	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y escaso	Globosos y alargados	119±26.16	385±9.19	S	M-B	B	1170
AF31	A.	<i>flavus</i>	Nayarit	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y abundante	Globosos y subglobosos	19±4.24	478±11.31	L	M	B	1060
AF32	A.	<i>flavus</i>	Nayarit	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y abundante	Sin esclerocios	0	0	0	B	B	1280
AF33	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Abundante y profundo	Globosos	13±9.90	426±13.67	L	B	B	1150
AF34	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	163±123.74	423±28.28	L	M-B	B	2100
AF35	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	3±3.54	378±199.97	L	B	B	1070
AF36	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y escaso	Globosos y subglobosos	2±2.83	368±192.30	S	M	B	990
AF37	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	29±12.37	298±5.66	S	M-B	B	1420
AF38	A	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	3±0.00	425±35.36	L	M	B	1200
AF39	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y abundante	Globosos y subglobosos	5±4.95	465±5.36	L	M-B	B	1140
AF40	A	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	4±5.66	430±46.29	L	M-B	B	1210
AF41	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	6±5.66	446±29.70	L	M-B	B	1090
AF42	A.	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	M-B	B	1140
AF43	A.	<i>flavus</i>	Guanajuato	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos	14±12.02	364±14.14	S	M	B	1160

Continuación Apéndice 3

AF44	A.	<i>flavus</i>	Guanajuato	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y elongados	2±.12	500±242.67	L	M-B	B	1260
AF45	A.	<i>flavus</i>	Guanajuato	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos	3960±101.82	218±20.51	S	M	B	830
AF46	A.	<i>flavus</i>	Sonora	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Oblongos y sub globosos alargados	34±8.49	495±12.73	L	M	B	1660
AF47	A.	<i>flavus</i>	Sonora	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	1732±130.11	217±13.44	S	M-B	B	1280
AF48	A.	<i>flavus</i>	Sonora	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Globosos	Profundo y escaso	5±4.50	215±21.31	S	M	B	1090
AF49	A.	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos	1±1.41	410±1.00	L	M-B	B	1110
AF50	A.	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Abundante y superficial	Globosos y subglobosos	43±6.36	331±17.68	S	M-B	B	2300
AF51	A.	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	1823±149.20	312±24.04	S	B	B	1880
AF52	A.	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos	86±10.61	266±.66	S	M-B	B	22
AF53	A.	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos	19279±124.592	211±24.75	S	M-B	B	1480
AF54	A.	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Subglobosos y elongados	36±10.61	472±18.38	L	M	B	1930
AF55	A.	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Abundante y superficial	Globosos y subglobosos	69±26.87	285±24.75	L	M-B	B	1760
AF56	A.	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos	19980±190.21	171±8.49	L	M-B	B	1290
AF57	A.	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Profundo y escaso	Verde amarillo brillante	Globosos	7027±292.74	289±19.66	S	M	B	1890
AF58	A.	<i>parasiticus</i>	Quintana Roo	Radial y flocosa	Aéreo y escaso	Verde	Globosos	877±157.68	370±7.78	S	M	B G	1090

Continuación Apéndice 3

AF59	A.	<i>parasiticus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde	0	0	0	0	M	B G	1430
AF60	A.	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde amarillo	0	0	0	0	M-B	B	1040
AF61	A.	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde amarillo brillante	0	0	0	0	M-B	B	1270
AF62	A.	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y escaso	Verde amarillo brillante	Globosos	21±2.83	486±2.83	L	M-B	B	910
AF63	A.	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y escaso	Verde amarillo brillante	Globosos	29±15.56	421±21.21	L	M-B	B	1960
AF64	A.	<i>parasiticus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde	0	0	0	0	0	B G	85
AF65	A.	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde amarillo brillante	0	0	0	0	0	B	1750

**Apéndice 4.** Tipo de toxinas presentadas

Cepa	AFB	AFB	AFG	AFG
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2
<b>AF01</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF02</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF03</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF04</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF05</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF06</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF07</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF08</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF09</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF10</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF11</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF12</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF13</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF14</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF15</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF16</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF17</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF18</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF19</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF20</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF21</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF22</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF23</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF24</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF25</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF26</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF27</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF28</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF29</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF30</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF31</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF32</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF33</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF34</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Continuación Apéndice 4

<b>AF35</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF36</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF37</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF38</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF39</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF40</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF41</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF42</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF43</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF44</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF45</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF46</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF47</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF48</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF49</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF50</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF51</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF52</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF53</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF54</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF55</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF56</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF57</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF58</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>AF59</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>AF60</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF61</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF62</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF63</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
<b>AF64</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>AF65</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

**Apéndice 5.** Cantidad de aflatoxina por cepa (dos repeticiones).

<b>Cepa</b>	<b>Toxina (ppb)</b>		
			1220
<b>AF01</b>	2400	<b>AF20</b>	1080
	2100		1440
<b>AF02</b>	1220	<b>AF21</b>	2200
	1240		1640
<b>AF03</b>	1800	<b>AF22</b>	1280
	1700		1420
<b>AF04</b>	1280	<b>AF23</b>	1120
	1220		980
<b>AF05</b>	660	<b>AF24</b>	1040
	820		1000
<b>AF06</b>	1300	<b>AF25</b>	1240
	1300		1220
<b>AF07</b>	1160	<b>AF26</b>	1160
	1100		1140
<b>AF08</b>	1220	<b>AF27</b>	1840
	1080		2200
<b>AF09</b>	980	<b>AF28</b>	1860
	440		1880
<b>AF10</b>	2000	<b>AF29</b>	1700
	2000		1940
<b>AF11</b>	1160	<b>AF30</b>	1140
	1300		1200
<b>AF12</b>	2000	<b>AF31</b>	1000
	2400		1120
<b>AF13</b>	1080	<b>AF32</b>	1400
	1040		1160
<b>AF14</b>	1220	<b>AF33</b>	1100
	1180		1200
<b>AF15</b>	1560	<b>AF34</b>	2200
	1500		2000
<b>AF16</b>	200	<b>AF35</b>	1100
	180		1040
<b>AF17</b>	720	<b>AF36</b>	1040
	700		940
<b>AF18</b>	1060	<b>AF37</b>	1500
	1090		1340
<b>AF19</b>	1120	<b>AF38</b>	1160

Continuación Apéndice 5

	1240
<b>AF39</b>	1120
	1160
<b>AF40</b>	1180
	1240
<b>AF41</b>	1080
	1100
<b>AF42</b>	1160
	1120
<b>AF43</b>	1220
	1100
<b>AF44</b>	1220
	1300
<b>AF45</b>	960
	700
<b>AF46</b>	1700
	1620
<b>AF47</b>	1300
	1260
<b>AF48</b>	1060
	1120
<b>AF49</b>	1120
	1100
<b>AF50</b>	2400
	2200
<b>AF51</b>	1800
	1960
<b>AF52</b>	16
	28

<b>AF53</b>	1440
	1520
<b>AF54</b>	2000
	1860
<b>AF55</b>	1740
	1780
<b>AF56</b>	1340
	1240
<b>AF57</b>	1900
	1880
<b>AF58</b>	1020
	1160
<b>AF59</b>	1400
	1460
<b>AF60</b>	1060
	1020
<b>AF61</b>	1240
	1300
<b>AF62</b>	980
	840
<b>AF63</b>	1880
	2040
<b>AF64</b>	54
	116
<b>AF65</b>	1700
	1800