

30
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**MICOTOXINAS EN MASA DE MAIZ EN EL
DISTRITO FEDERAL:
DELEGACIONES BENITO JUAREZ Y COYOACAN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

Margarita Erna Caballero Miranda



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA CITADA	39

INTRODUCCIÓN

El 80% de la actividad agrícola mundial está enfocada a la producción de alimentos, ya sea para la cría de animales o para el consumo humano directo. Con este fin se cultivan cerca de 300 especies vegetales distintas, pero es sólo de 12 de ellas que se obtiene el 95% de la producción anual mundial de alimentos. Entre estas 12 especies se hallan cultivos como trigo, arroz, maíz, papa, camote, caña de azúcar, casabe, frijol, coco y plátano (Kenaga, 1974). Los granos, como trigo, arroz, maíz, avena, etc., están entre los principales productos agrícolas a nivel mundial y representan una de las fuentes de alimento más importantes, tanto para la cría de animales como para el consumo humano.

En el presente trabajo, cuando se hace referencia al término grano, éste corresponde al nombre agronómico y comercial, que define aquellas estructuras botánicas utilizadas como alimento, sin importar cuál es el nombre botánico, el cual realmente describe la simiente de las gramíneas (Font Quer, 1973).

Entre los granos destaca por su importancia el maíz (Zea

maíz), con una producción mundial del orden de 250 millones de toneladas (Shurtleff, 1980). En México este grano constituye uno de los alimentos básicos de la población humana; anualmente en el país se cosechan entre 13 y 14 millones de toneladas, y se importan cerca de 2 millones de toneladas más para satisfacer la demanda nacional (SARH, 1986, 1988). En promedio, el consumo de maíz per cápita en México se estima que es de 190 Kg al año y este consumo se realiza básicamente en forma de tortillas (Barkin y Suárez, 1982).

Las tortillas pueden ser definidas como "panes" de maíz, de forma circular, muy delgados, elaborados aplastando porciones de masa de maíz y cociéndolas posteriormente sobre una plancha caliente llamada comal. La masa es elaborada, desde la época prehispánica, por un procedimiento tradicional que es la nixtamalización. Este procedimiento de nixtamalización consiste en remojar el maíz con una cantidad del doble de su volumen de agua y aproximadamente 10% de cal (Ca(OH)_2), calentando hasta cerca del punto de ebullición (80 a 94°C) durante aproximadamente una hora; esta mezcla tiene una alcalinidad muy alta que alcanza a tener valores de pH hasta de 13 (Illescas, 1943). Posteriormente, la mezcla se deja enfriar toda la noche, lo que significa un período variable de tiempo, desde 12 hasta 4 hrs; el nixtamal resultante se enjuaga para finalmente molerlo. Este tratamiento suaviza el grano y desprende el pericarpio de la semilla, facilitando el proceso de molienda necesario para la elaboración de la masa.

Por la gran importancia del maíz como fuente de alimento, es necesario conocer y combatir las enfermedades que lo atacan, ya que éstas provocan constantemente pérdidas importantes en la producción del grano; el maíz es una gramínea que puede ser invadida en todas sus partes por diversos organismos como hongos, bacterias, virus y nemátodos, entre otros (Shurtleff, 1980). El maíz como planta resulta ser un substrato muy favorable para el desarrollo de muchos tipos de hongos, capaces de invadirlo en cualquier fase de su desarrollo, desde la etapa de plántula hasta la formación de la mazorca y aun después, ya que el grano puede ser atacado por hongos en fases posteriores a la cosecha, durante el transporte y almacenamiento, o inclusive durante su industrialización.

La mazorca frecuentemente es invadida en el campo por diversos hongos que provocan las enfermedades conocidas como pudriciones de mazorca; estas pudriciones son principalmente inducidas por Diplodia, Fusarium graminearum y F. moniliforme y, con menor frecuencia, también por diversas especies de Penicillium y Aspergillus, entre otros (Koehler, 1959).

El maíz, después de ser cosechado, durante su transporte y almacenamiento, sea como mazorca o ya desgranado, también es invadido con frecuencia por los mohos. En esta etapa los mohos que principalente lo invaden son Aspergillus y Penicillium además de Fusarium que continúa su desarrollo iniciado en el campo por

un período variable de tiempo (Hesseltine, 1976; Justice y Bass, 1979). Entre los hongos que pueden invadir los granos de maíz, son de interés para este trabajo aquellos capaces de producir micotoxinas, como algunas especies de los géneros Aspergillus, Penicillium y Fusarium (Hesseltine, 1976; Davis y Diener, 1978).

Las micotoxinas son sustancias producidas por hongos, que al ser ingeridas por los animales (incluido el hombre) provocan en éstos diversos desórdenes patológicos (Davis y Diener 1978). Existe una variedad muy amplia de micotoxinas, cada una de las cuales induce una serie característica de desórdenes conocidos como micotoxicosis. Este tipo de enfermedades se han presentado como severos y espectaculares brotes, como la "enfermedad X de los pavos" que en 1960 causó la muerte de por lo menos 100 000 aves, y grandes pérdidas económicas en Inglaterra (Allcroft, 1969).

Las micotoxinas son producidas cuando la etapa de crecimiento del hongo ha sido limitada por la escasez de algún nutriente (como nitrógeno, fósforo, etc.), de manera que los procesos metabólicos normales se retardan y sus intermediarios son derivados por otras rutas metabólicas conocidas como metabolismo secundario (Smith y Berry, 1974; 1975). Este tipo de metabolismo se caracteriza por producir una variedad muy amplia de sustancias químicamente poco comunes, entre las que se encuentran las micotoxinas; cada una de estas sustancias sólo es producida por un número muy limitado de especies o incluso sólo

por algunas cepas de determinadas especies, lo cual les dá una individualidad que las distingue de otras. En contraste, las rutas metabólicas que se siguen normalmente, como la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, etc., son comunes a todos los seres vivos y por medio de ellas se llevan a cabo los procesos de crecimiento y reproducción (Smith y Berry, 1974, 1975; Steyn, 1980).

La alta actividad tóxicas de las micotoxinas hace que sea de especial importancia poder determinar si un alimento está contaminado con ellas, ya que su consumo representa un riesgo sanitario potencial. Cuando un lote de granos es invadido por mohos existe la posibilidad de que esté contaminado con micotoxinas, pero no la certeza, pues para ello es necesario que los hongos presentes en ese producto sean micotoxígenos y que las condiciones ambientales sean las adecuadas para tal producción; por lo tanto, la sola presencia de una especie, aun cuando ésta sea productora de toxinas, no implica necesariamente la presencia de micotoxinas en ese sustrato.

Por otro lado, aun cuando se tengan granos en apariencia sanos y libres de mohos, que normalmente se consumirían sin reservas, existe la posibilidad de que se encuentren contaminados con micotoxinas (Christensen, 1975; Davis y Diener, 1978). Esto se debe a que las toxinas pueden permanecer en el sustrato a pesar de que el hongo haya desaparecido, por lo que sólo el análisis químico directo puede asegurar, hasta ahora, la

presencia y cantidad de estas toxinas en un determinado alimento. Con el objeto de impedir la distribución y consumo de lotes contaminados que provoquen brotes de alguna micotoxicosis, resulta necesario hacer el análisis químico de los lotes sospechosos.

Entre las micotoxinas que han sido encontradas frecuentemente contaminando en forma natural el maíz, en inspecciones de este grano realizadas en E.U.A., se encuentran las aflatoxinas, las ocratoxinas y la zearalenona (Shotwell, 1977; Shotwell et al., 1970, 1971, 1975; Romer, 1984).

Las aflatoxinas, que son las micotoxinas más ampliamente estudiadas, son producidas por las especies Aspergillus flavus y A. parasiticus. Básicamente existen 4 tipos de aflatoxinas, denominadas B1, B2, G1 y G2 con base en el color de su fluorescencia cuando son iluminadas con luz ultravioleta (360 nm); las aflatoxinas B tienen un brillo azulado (blue), mientras que las las aflatoxinas G lo tienen verdoso (green). De estas cuatro aflatoxinas, la B1 (Fig. 1) es la que ha sido más frecuentemente encontrada contaminando los alimentos en forma natural, y además ha sido demostrado que es la más tóxica (Steyn, 1980). Las aflatoxinas se caracterizan por ser substancias con una alta capacidad cancerígena; afectan principalmente el hígado, provocando cáncer primario; también afectan el riñón, el colon y los pulmones (Christensen, 1975; Davis y Diener, 1978). En algunas zonas de Africa y Asia se ha detectado una alta

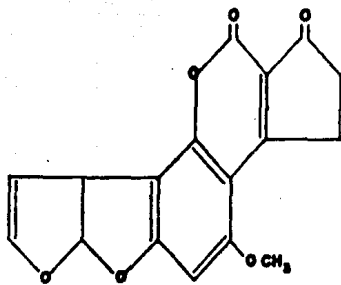


Fig. 1: Estructura química de la aflatoxina B₁

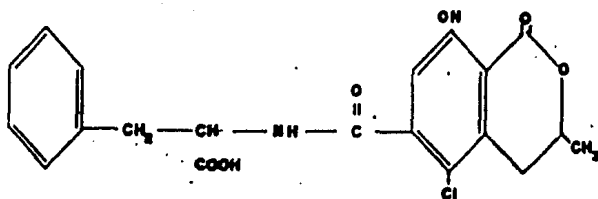


Fig. 2: Estructura química de la ocratoxina A

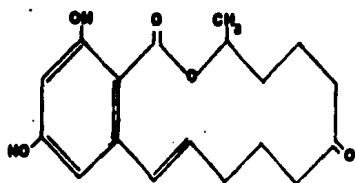


Fig. 3: Estructura química de la zearalenona

incidencia de cáncer primario del hígado en humanos, en estas mismas zonas se ha encontrado que las aflatoxinas son contaminantes naturales de los alimentos más comunes de la población, como el cacahuete y el maíz, lo que ha permitido establecer de manera indirecta una alta correlación del consumo de estas toxinas, a través de los alimentos, con la alta incidencia del cáncer primario del hígado en humanos (Shank, 1976).

Las ocratoxinas (Fig. 2) son producidas por las especies Aspergillus ochraceus y Penicillium viridicatum. Estas toxinas afectan principalmente el riñón, provocando necrosis en los túbulos renales; también afectan el hígado provocando la infiltración de tejido graso en este órgano, y el bazo, por lo cual también provocan alteraciones en el sistema inmune, ya que el bazo es un productor de leucocitos. Las ocratoxinas actúan bloqueando la síntesis protéica, como inhibidores competitivos en la formación del complejo RNA de transferencia - aminoácido. Estas toxinas también tienen actividad cancerígena y teratógena (Nesheim, 1976; Roschenthaler et al., 1984).

La zearalenona (Fig. 3), toxina producida por Fusarium graminearum (estado imperfecto de Giberella zaeae) (Ichinoe y Kurata, 1983). Es una sustancia, químicamente semejante a los estrógenos, que provoca desórdenes hormonales como el síndrome estrogénico en cerdos. Los cerdos adquieren esta enfermedad al ingerir alimento contaminado con esta toxina; en los machos

provoca el desarrollo de características sexuales secundarias femeninas, como son el desarrollo de las glándulas mamarias y la atrofia de los testículos; en las hembras provoca la inflamación de la vulva, la reabsorción de fetos y abortos (aunque Mirocha considera que el aborto no es parte del síndrome), camadas pequeñas y lechones débiles. Todo esto ocasiona una baja muy fuerte en la producción de la cría de cerdos, con grandes pérdidas económicas (Mirocha et al., 1974; Christensen, 1975; Davis y Dienér, 1978).

Cuando se detectan lotes de alimentos o productos alimenticios contaminados con micotoxinas se encara una dificultad grave, ya que estos lotes representan un problema sanitario potencial que no debe ser desatendido. En general las micotoxinas son sustancias muy estables que no son eliminadas mediante los procesos normales de cocción o esterilización; las aflatoxinas y zearalenona, por ejemplo, resisten temperaturas tan altas como 150 o 200°C (Dollear, 1969; Bennet et al., 1980).

Para poder emplear lotes de granos contaminados con micotoxinas se han desarrollado algunos métodos, principalmente para eliminar las aflatoxinas. En el desarrollo de éstos se han tomado en consideración una serie de aspectos tanto prácticos como económicos; entre los más importantes están el que los lotes tratados deben además conservar las propiedades nutritivas de los alimentos sin dejar residuos desagradables o tóxicos, y ser razonablemente económicos. A nivel experimental se ha logrado inactivar, por lo menos parcialmente, a las aflatoxinas,

empleando procedimientos como el tratamiento con ácidos, amoníaco, calor húmedo y álcalis. Los ácidos actúan convirtiendo la aflatoxina B1 en aflatoxina B2 (Goldblatt y Dollear, 1977), con lo cual se disminuye, pero no se elimina, su capacidad tóxica y cancerígena, ya que la aflatoxina B1 es la forma más tóxica de las aflatoxinas (Steyn, 1980). El amoníaco ha sido empleado mas exitosamente, ya que ha logrado reducir a trazas niveles iniciales de contaminación de hasta 100 µg/Kg (Goldblatt, 1971); sin embargo este tipo de tratamiento resulta muy costoso y los alimentos siempre conservan el olor desagradable característico del amoníaco (Chakrabarti, 1981).

Se ha demostrado que el tratamiento con calor húmedo puede reducir hasta el 80% de la contaminación inicial de aflatoxinas después de un tratamiento de dos horas a 100 °C y 20% de contenido de humedad, mientras que con calor seco las aflatoxinas pueden resistir sin inactivarse hasta 300°C (Coomes, et al., 1966; Goldblatt, 1966, 1968, 1971).

Los álcalis, como el hidróxido de sodio o de calcio, han resultado ser métodos efectivos y bastante económicos para inactivar, por lo menos parcialmente, a las aflatoxinas (Dollear y Gardner, 1966; Goldblatt, 1966; Goldblat y Dollear, 1977; Beckwith et al., 1976; Lillehoj, 1987). Este tipo de tratamiento es más efectivo a mayores contenidos de humedad de los alimentos; así, un tratamiento con hidróxido de sodio por dos horas a 100°C y 20% de contenido de humedad reduce una contaminación inicial de

68 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxinas a una final de 11 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, mientras que el mismo procedimiento, pero con 30% de contenido de humedad, logra reducir hasta trazas la misma contaminación inicial (Dollear y Gardner, 1966). El tratamiento con álcalis actúa sobre el anillo lactona de las aflatoxinas (Fig. 1) provocando su ruptura y por consecuencia eliminando las propiedades tóxicas de la molécula. Cuando el tiempo de tratamiento con este método no es suficientemente prolongado, un cambio en las condiciones del medio, como una acidificación, puede provocar la reorganización de la molécula al cerrarse nuevamente el anillo (Goldblatt y Dollear, 1977).

El proceso de nixtamalización, por medio del cual se obtiene la masa de maíz, involucra precisamente dos de estos tratamientos efectivos para inactivar las aflatoxinas: el calor húmedo y el tratamiento alcalino con hidróxido de calcio. Esto sugiere que la nixtamalización es un medio efectivo para inactivar las aflatoxinas. Algunos reportes han sustentado esta idea, ya que al nixtamalizar maíz inoculado con aflatoxinas se ha logrado inactivar hasta un 75% de la contaminación inicial (Ulloa-Sosa y Schroeder, 1969).

Por todo lo anterior, en este trabajo, que es una inspección, se espera encontrar que la masa de maíz esté libre o casi libre de contaminación por aflatoxinas en condiciones naturales, esto es, como llega a los consumidores, aun cuando el maíz con el que se elabora la masa esté contaminado con estas

toxinas, lo que en México es muy probable. Esta suposición se basa en los resultados de algunas inspecciones realizadas en maíz en E.U.A. (Shotwell et al., 1970, 1971, 1975) y en México (García-Aguirre y Martínez, 1985), que indican que en forma natural, en diversos canales comerciales, es posible detectar lotes de maíz contaminados con aflatoxinas.

La zearalenona y las ocratoxinas, estas toxinas también han sido encontradas como contaminantes naturales del maíz (Shotwell, 1977; Shotwell et al., 1970, 1971, 1975; Roer, 1984), y por lo tanto es posible que sean detectadas en la masa, ya que se desconocen los efectos que la nixtamalización tenga sobre estas toxinas; aunque se sabe que la zearalenona es resistente al calor (Bennet et al., 1980), no se sabe cual es el efecto de la nixtamalización en esta toxina; sin embargo, debido a la capacidad tóxica de ambas toxinas resulta interesante conocer los niveles de contaminación que pudiese presentar la masa de maíz tanto con ocratoxinas como con zearalenona.

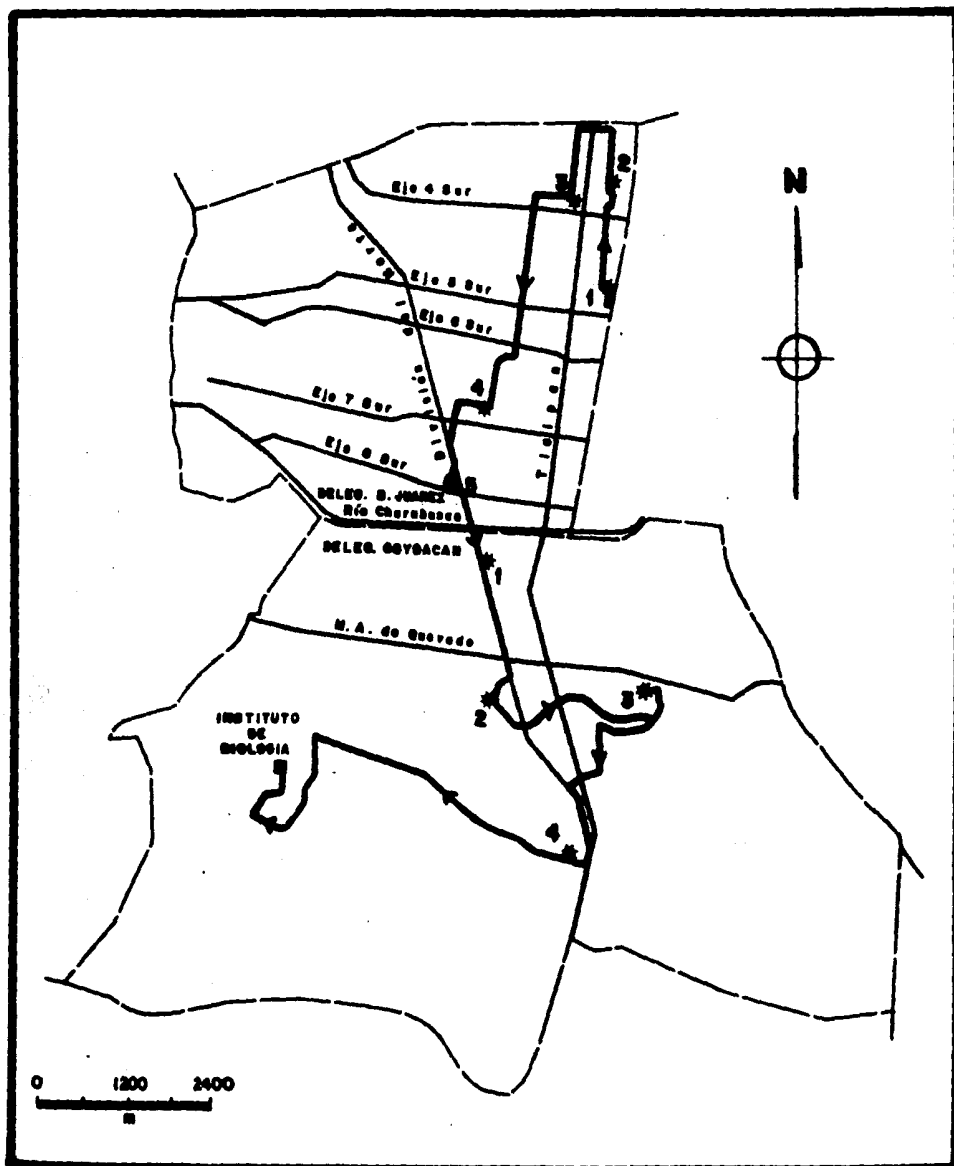
MATERIALES Y MÉTODOS

I) Muestreo

Las muestras, de un kilogramo de masa de maíz para tortillas, fueron colectadas en diferentes molinos de nixtamal de las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán del Distrito Federal y transportadas inmediatamente al laboratorio para su preparación y posterior análisis.

Fue realizado en dos de las 16 Delegaciones del Distrito Federal: Benito Juárez y Coyoacán. En estas Delegaciones todos los molinos de nixtamal reciben el mismo tipo de maíz, ya que todos son proveídos por la Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO); con base en la información teórica de la situación del maíz en el Distrito Federal, la selección de molinos se realizó aleatoriamente en función de una ruta accesible que recorriese las dos Delegaciones (mapa I).

Fueron seleccionados 5 molinos en la Delegación Benito Juárez: 1) Laura 101, Col. Nativitas. 2) Américas 56, Col. Moderna. 3) Cinco de Febrero 762, Col. Alamos. 4) Necaxa 164 Bis., Col. Portales. 5) Mariposa 929, Col. Santa Cruz Atoyac. Y cuatro en la Delegación Coyoacán: 1) División del Norte 2590,



Mapa I: Ruta de muestreo en los molinos de las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán en el Distrito Federal.

Col. Churubusco. 2) Pacífico 333, Col. Los Reyes. 3) Calle A Manzana VII No. 15, Col. Educación. 4) Cáliz 73, Col. El Reloj.

Inicialmente se trabajó con una frecuencia de muestreo semanal (primeros nueve muestreos), sin embargo la capacidad para el procesamiento de muestras en el laboratorio forzaron a modificar la frecuencia de muestreo a cada dos semanas. El tamaño de las muestras fue de 1 Kg y el tiempo de muestreo abarcó un período de un año en cada Delegación: En Benito Juárez los muestreos se iniciaron el 4 de agosto de 1986 y se terminaron el 3 de agosto de 1987. En Coyoacán los muestreos se iniciaron el 15 de noviembre de 1986 y se terminaron el 9 de noviembre de 1987. En total se realizaron 29 muestreos en la Delegación Benito Juárez y 24 en la de Coyoacán; el total de muestras procesadas y analizadas fue de 241, 145 correspondientes a la primera y 96 a la segunda.

II) Preparación de las muestras

Todas las muestras fueron sometidas al siguiente proceso de preparación:

a) Secado: La masa fresca fue desmoronada y puesta en una sola capa sobre una charola que fue colocada en un horno de aire forzado (Blue M "Stabil-Therm") a 50°C durante 24 horas. Este paso tuvo como objetivo deshidratar la masa para prevenir el crecimiento de mohos y otros microorganismos y evitar la posible contaminación con micotoxinas.

b) Homogeneización: Una vez deshidratada, la masa se pasó dos veces por un molino de maíz (Straub Co. Corydon Penn, Mod. 4-E) para obtener una muestra con tamaños de partícula homogéneos y que pudiesen pasar por una malla del número 20. La harina así obtenida se mezcló en una batidora (Jobart Mod. C-100) durante 15 minutos, con el objeto de homogeneizar la muestra. Las muestras ya preparadas fueron guardadas en bolsas de papel estraza y almacenadas a temperaturas de congelación ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) hasta que fue posible iniciar el análisis químico.

III) Análisis químico

El método usado para realizar el análisis químico de las muestras fue el descrito por Eppley (1968), con el cual se puede analizar una muestra para detectar simultáneamente: aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenona. Esta técnica ha sido adoptada parcialmente como primera acción oficial por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984) para aflatoxinas en cacahuete (26.026 a 26.031), y para aflatoxinas en maíz (26.051). Esta técnica es suficientemente sensible, con buenos índices de recuperación, y sus coeficientes de variación son razonablemente bajos; por otra parte, las condiciones del laboratorio permitieron su adopción, y el apoyo de CONACYT permitió la adquisición oportuna de los solventes que requiere.

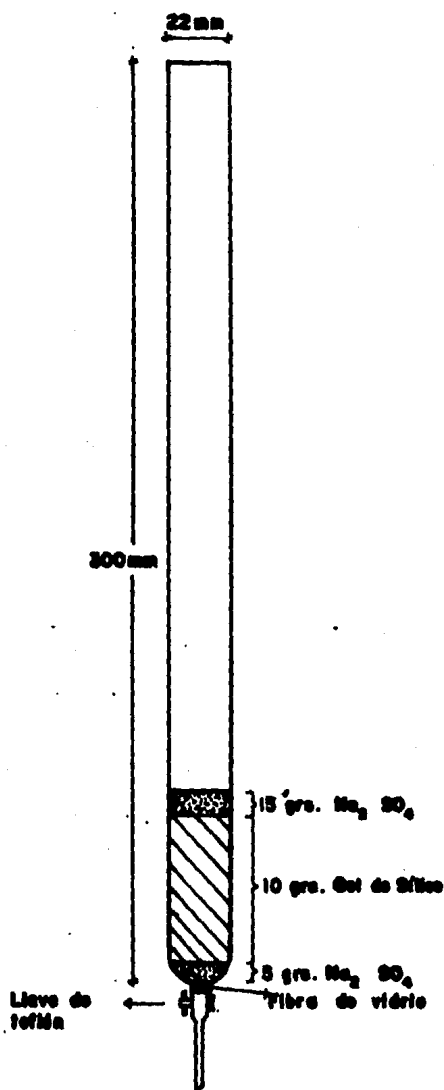
Esta técnica se puede resumir en los siguientes pasos:

A) Extracción: 50 g de muestra + 25 g de tierra de diatomeas (Celite, Hyflosuper Cell) + 250 ml de cloroformo (grado analítico en recipiente de vidrio) + 25 ml de agua. La extracción se realizó agitando durante 30 min en velocidad alta en un agitador de acción de muñeca (Burrel Mod. 75). En el momento de la extracción, el medio fue acidificado hasta alcanzar un pH de 3 a 4, para asegurar que el proceso alcalino fuese suficientemente drástico y que el anillo abierto de la lactona, no fuese a cerrarse en presencia de un medio ácido como es el caso del pH del estómago. Después de ser extraídas, las muestras fueron filtradas (papel Whatman No. 1, Qualitative) y separados los primeros 50 ml.

B) Columna de cromatografía: Los primeros 50 ml del filtrado se agregaron a una columna de cromatografía de gel de sílice (Fig. 4). La elución se continuó con 150 ml de hexano seguidos de 150 ml de benceno; ambos solventes se desecharon. La fracción de zearalenona fue eluida con 250 ml de acetona:benceno 5:95 v/v, y se continuó lavando la columna con 150 ml de éter etílico, lo que se desecharon. Las aflatoxinas fueron eluidas con 150 ml de metanol:cloroformo 3:97 v/v, y finalmente las ocratoxinas fueron eluidas con 250 ml de ácido acético glacial:benceno 1:9 v/v.

C) Concentración: Las tres fracciones obtenidas de la columna fueron evaporadas en rotavapor (Buchi Oil RE III) con baño de vapor (Buchi 461) a 30°C hasta casi sequedad. En el caso de

Fig. 4: Empaque de la columna de cromatografía para zearalenona
afletoxinas y ocratoxinas.



- Colocar una bola laxa de fibra de vidrio.
- Colocar 5 grs. Na_2SO_4 anhidro para dar una base al gel de sílice.
- Añadir CH_2Cl_2 hasta la mitad de la capacidad de la columna.
- Añadir 10 grs. gel de sílice, agitando para dispersar el gel.
- Dejar asentarse, drenando algo del cloroformo, pero sin dejar secar el gel.
- Agregar lentamente 15 grs. Na_2SO_4 anhidro y drenar el cloroformo hasta que sólo cubra la superficie del Na_2SO_4 (Eppley, 1966)

las aflatoxinas y ocratoxinas, el residuo de la evaporación fue transferido a viales de 20 ml, lavando con 10 ml de cloroformo. El contenido de los viales se evaporó hasta sequedad en un baño de vapor en atmósfera de nitrógeno, y se conservó en congelación hasta el momento de su uso en la cromatografía de capa fina.

En el caso de la fracción de zearalenona se introdujo un paso de partición (26.114) para eliminar los residuos de grasas y pigmentos del extracto (AOAC, 1984). El residuo de la evaporación se transfirió a un embudo de separación, lavando 4 veces con 10 ml de benceno cada vez, y dos veces con acetonitrilo, primero con 10 ml y luego con 5 ml. Se agitó el embudo de separación y se dejaron separar las capas, colectando las dos fracciones de acetonitrilo (capa inferior) independientemente y juntándolas en un matraz; este extracto se evaporó en rotavapor hasta sequedad y se transfirió a un vial de 20 ml con 10 ml de cloroformo los cuales se evaporaron hasta sequedad en un baño de vapor y en atmósfera de nitrógeno, conservando el residuo en congelación para su uso posterior.

IV) Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizó sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm, precubiertas con gel de sílice con un espesor de 0.25 mm (DC - Fertigplatten Kieselgel 60 Art. 5721 Merck).

Placas preliminares:

Aflatoxinas. La fracción de aflatoxinas se resuspendió con 0.5 ml de benceno, agitando durante un minuto en agitador mecánico (Super-Mixer 1290, Lab-Line Instruments Inc). Con una microjeringa de 10 μ l se colocaron, en la semipenumbra, dos manchas de 5 μ l de muestra sobre una línea imaginaria a 4 cm del borde inferior de la placa. En la misma placa se colocaron manchas de 2, 4 y 8 μ l de la solución patrón (Sigma A-6636 B1, con concentración de 1 μ g/ml) y sobre una de las manchas de 5 μ l de muestra se colocó una mancha de solución patrón de 4 μ l como patrón interno. Las placas se desarrollaron en un tanque con el sistema de solventes acetona:benceno 5:45 v/v durante aproximadamente 45 min hasta que el frente del solvente llegó a unos 2 cm del tope de la placa; las placas ya secas se observaron bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm), identificando las aflatoxinas como manchas azules o azul verdosas, usando como referencia las manchas de los patrones; las muestras positivas se conservaron para el análisis cuantitativo.

Ocratoxinas. La fracción de ocratoxinas se resuspendió con 0.5 ml de ácido acético glacial:benceno 1:99 v/v, agitando durante un min en agitador mecánico (Super-Mixer 1290, Lab-Line Instruments, Inc). Las manchas en la placa se hicieron de la misma manera que en las placas para aflatoxinas, pero en este caso la solución patrón empleada fue de ocratoxina A (Sigma O-4001, con concentración de 1 μ g/ml). Las placas se desarrollaron en un tanque con el sistema de solventes ácido

acético glacial:benceno 5:45 v/v, y se observaron bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm), identificando las ocratoxinas como manchas verdosas y tomando como referencia las manchas de los patrones, las muestras positivas se conservaron para el análisis cuantitativo.

Zearalenona. La fracción de zearalenona se resuspendió con 0.5 ml de benceno, agitando durante un minuto en agitador mecánico (Super-Mixer 1290, Lab-Line Instruments, Inc). Con una microjeringa de 10 μ l se colocaron dos manchas de 10 μ l de muestra sobre una línea imaginaria a 4 cm del borde inferior de la placa. En la misma placa se colocaron manchas de 2, 4 y 8 μ l de patrón (Sigma Z-2125 con concentración de 50 μ g/ml) y sobre una de las manchas de 10 μ l de muestra se colocó una mancha de patrón de 4 μ l como patrón interno. Las placas se desarrollaron sucesivamente en dos sistemas de solventes, primero con benceno:hexano 30:10 v/v, para eliminar los residuos de grasas del extracto (Hagan y Tietjen, 1975), y después se corrieron en la misma dirección con ácido acético glacial:benceno 5:45 v/v, y se observaron bajo luz ultravioleta de onda corta (260 nm), identificando la zearalenona como manchas de tonalidad azul, tomando como referencia las manchas de los patrones; las muestras positivas se conservaron para el análisis cuantitativo.

Placas cuantitativas:

Aflatoxinas. En estas placas se colocaron sólo las muestras positivas detectadas en las placas preliminares, y en las

concentraciones estimadas con base en los resultados obtenidos por comparación visual de la placa preliminar. Con una microjeringa de 50 μ l y con luz de baja intensidad se colocaron sucesivamente tres manchas de cada muestra (+/- 10, 20 y 30 μ l). En la misma placa se colocaron manchas de 2, 4 y 8 μ l de solución patrón (Sigma A-6636 B1, con concentración de 1 μ g/ml). Las placas se desarrollaron en un tanque con el sistema de solventes acetona:benceno 5:45 v/v, durante aproximadamente 45 min, hasta que el frente del solvente llegó a unos 2 cm del borde superior de la placa; ya secas se observaron bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm) y las aflatoxinas se identificaron como manchas azules o azul verdosas, comparando visualmente la intensidad de las manchas de muestra con la intensidad de las manchas del patrón; la cuantificación se realizó de acuerdo con la fórmula I (26.031), (AOAC, 1984).

Ocratoxinas. Estas placas se realizaron de la misma manera que aquellas para aflatoxinas, pero empleando en este caso un patrón de ocratoxinas (Sigma O-4001 con concentración de 1 μ g/ml). Las placas se desarrollaron en un tanque con el sistema de solventes tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico 6:3:1 v/v, y se observaron bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm), identificando las ocratoxinas como manchas verdes; la concentración de ocratoxinas en las muestras se estimó por comparación visual de las manchas de las muestras con las del patrón y la cuantificación se realizó aplicando la fórmula I.

FORMULA I

$$\text{ug toxina/Kg muestra} = \frac{(S \times Y \times V)}{(X \times W)}$$

En donde:

S = μ l de la mancha del patrón con
intensidad igual a la mancha de muestra.

Y = Concentración del patrón empleado.

V = Volumen de dilución final de la muestra.

X = μ l de la mancha de muestra con
intensidad igual a la mancha del patrón.

W = g de muestra extraída que entran a
la columna de cromatografía.

Zearalenóna. Estas placas se realizaron de la misma manera que las placas cuantitativas de aflatoxinas, empleando en este caso una solución patrón de zearalenona (Sigma Z-2125, con concentración de 50 μ g/ml). Las placas se desarrollaron sucesivamente con dos sistemas de solventes, primero con benceno:hexano 30:10 v/v, para eliminar los residuos de grasas del extracto, y después se desarrollaron con ácido

acético:benceno 5:45 v/v. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta de onda corta (260 nm), identificando la zearalenona como manchas azulosas; para estimar la concentración de zearalenona en las muestras se comparó visusalmente la intensidad de las manchas de muestra con la intensidad de las manchas del patrón; la cuantificación se realizó aplicando la fórmula I.

V) Pruebas confirmatorias

Para confirmar la identidad de las toxinas detectadas se realizaron las siguientes pruebas confirmatorias:

Aflatoxinas. Para confirmar la presencia de aflatoxinas la mancha en la placa de cromatografía se asperjó, con una solución ácido sulfúrico:agua destilada 1:3 v/v (26.057). Con este tratamiento las aflatoxinas cambian de tonalidad azul a una amarilla, al observar la placa bajo luz ultra violeta de onda larga; si la mancha en cuestión no presenta este viraje no se trata de aflatoxinas, por lo que se descarta la muestra. (AOAC, 1984).

Ocratoxinas. Para confirmar la presencia de ocratoxinas, la mancha se asperjó con una solución alcohólica de bicarbonato de sodio, (26.113 (e), 26.117). Las manchas de ocratoxinas deben virar de tonalidad verdosa a una azul intenso cuando se observan bajo luz ultra violeta de onda larga (360 nm) (AOAC, 1984).

Zearalenona. Para confirmar la identidad de la zearalenona se empleó una solución de cloruro de aluminio asperjada sobre la mancha; la placa se calentó por 5 min a 130 °C, (26.140 (b), 26.146). La mancha deja de ser perceptible bajo luz ultravioleta de onda corta, pero se aparece, con una tonalidad azul, bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm) si se trata de zearalenona (AOAC, 1984).

Todas las muestras fueron analizadas una sola vez, y únicamente en el caso de las muestras positivas se analizaron por duplicado; esto fue debido a la carga de trabajo y al costo de cada extracción. El analizar las muestras positivas por duplicado fue para tener promedios en los cálculos de las concentraciones.

El procedimiento de preparación de la masa, además de su consistencia masosa, hacen suponer que la distribución de las micotoxinas en este producto es homogénea. El muestreo y la preparación de las muestras, realizados de acuerdo con los métodos oficiales, garantizaron la distribución homogénea de las toxinas en las mismas. Por lo anterior, el analizar las muestras una sola vez no representó un problema grave.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la inspección de los molinos de nixtamal de las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán mostraron que de las 241 muestras de masa obtenidas en un periodo de 12 meses en los nueve molinos seleccionados, solamente 12 estuvieron contaminadas con las diferentes micotoxinas para las que fueron analizadas, lo que representa 4.98% del total de las muestras analizadas (Tabla I).

La distribución en el tiempo y el espacio de las muestras contaminadas se presenta en la tabla II y en la gráfica I, en donde se puede observar que entre las dos delegaciones inspeccionadas no hay diferencias considerables en el número de muestras contaminadas, ni en sus niveles de contaminación. En la Delegación Benito Juárez el 5.5% de las muestras analizadas estuvieron contaminadas con alguna de las micotoxinas inspeccionadas, mientras que en la Delegación Coyoacán esta cifra fue de 4.2%. Esta similitud en el porcentaje de muestras contaminadas se explica porque el maíz que reciben todos los molinos inspeccionados es provisto por CONASUPO; existe la posibilidad de que el maíz recibido por los molinos no tenga la misma historia, esto es, que no tenga el mismo origen, ni el

mismo tiempo de almacenamiento, o el mismo nivel de contaminación con micotoxinas, pero como el proceso de nixtamalización es prácticamente igual en todos los molinos, la posibilidad de destrucción de las aflatoxinas también es prácticamente la misma.

Lo que es notable, y debe ser puntualizado, es el hecho de que en ninguna de las muestras contaminadas fue posible detectar más de una micotoxina; esto es sorprendente porque el grano de maíz es un substrato en el que pueden crecer muchos mohos y producir micotoxinas, de manera que, frecuentemente, está contaminado por varias micotoxinas en forma natural.

Con relación al tiempo, en el mes de septiembre de 1986 el número de muestras positivas es mayor, mientras que en los muestreos realizados el resto de ese año no fue posible detectar, con el método empleado, las micotoxinas buscadas. El porcentaje de muestras positivas durante ese mes representa 33% del total de las muestras en las que fueron encontradas toxinas durante todo el periodo de la inspección. Durante 1987 se detectaron micotoxinas en las muestras obtenidas durante los meses de febrero a julio; en agosto no se detectó ninguna muestra contaminada, pero en septiembre sí; en las muestras obtenidas el resto del año hasta noviembre no fueron detectadas micotoxinas. Del total de las muestras positivas para cualquiera de las micotoxinas buscadas, 58% correspondieron a las obtenidas de febrero a julio de 1987.

TABLE I: Muestras de masa de maíz colectadas en las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán, D. F., positivas para aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenona

M O L I N O	# Muestras analizadas	MUESTRAS POSITIVAS		
		Aflatoxinas	Ocratoxinas	Zearalenona
Delegación Benito Juárez				
1 *	29	2	ND	1
2	29	ND	1	ND
3	29	ND	ND	ND
4	29	1	ND	1
5	29	1	1	ND
T O T A L :	145	4	2	2
Delegación Coyoacán				
1	24	1	1	ND
2	24	ND	ND	1
3	24	ND	ND	ND
4	24	ND	1	ND
T O T A L :	96	1	2	1
T O T A L :	241	5	4	3

* La ubicación de estos molinos se da en materiales y métodos.

ND = No Detectada.

TABLA II: Distribución en el tiempo y niveles de contaminación con aflatoxinas ocratoxinas y zearalenona en masa de maíz colectada en las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán, D. F., de agosto de 1986 a noviembre de 1987

	AFLATOXINAS		OCRATOXINAS		ZEARALENONA	
					µg/kg	
1986						
AGO	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
SEP	3 3.4 4.5		5.5		ND	
			ND		ND	
OCT	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
NOV	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
DIC	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
1987						
ENE	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
FEB	ND		ND		ND	
		11.5	ND		ND	
MAR	ND		ND		167	
	ND		5.5		ND	
ABR	ND		ND		ND	
	ND		ND		282	
MAY	10.5		ND		ND	
	ND		ND		ND	
JUN	ND		8		ND	
	ND		ND		ND	
JUL	ND		ND		ND	
	ND		5.5		ND	
AGO	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
SEP	ND		ND		ND	
	ND		ND		209	
OCT	ND		ND		ND	
	ND		ND		ND	
NOV	ND		ND		ND	

ND = No detectado

———— Benito Juárez

----- Coyoacán

TABLA III: Niveles de contaminación con aflatoxinas en muestras de masa de maíz colectadas en las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán, D. F., de agosto de 1986 a noviembre de 1987

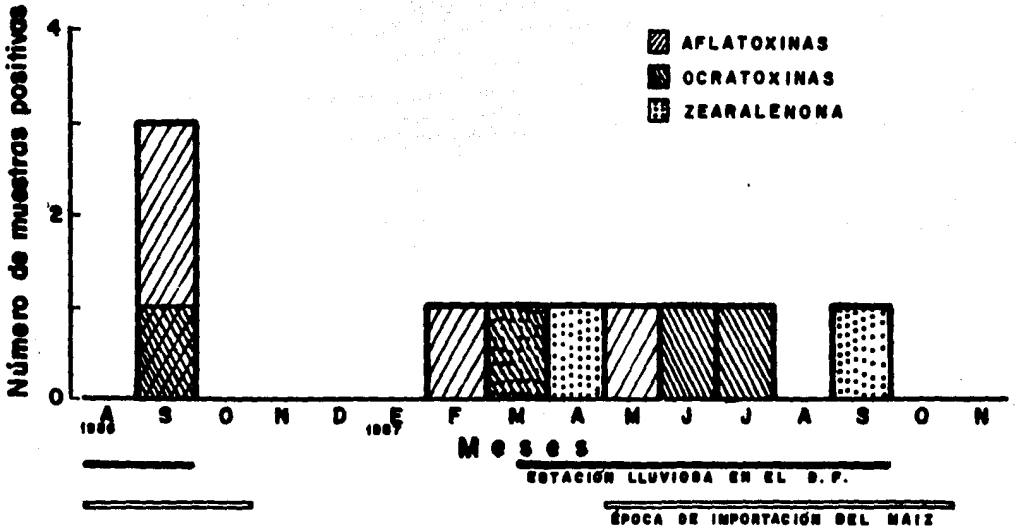
MOLINO	FECHA DE COLECTA	CONTAMINACION PROMEDIO	µg/kg RANGO
Delegación Benito Juárez			
1	6/SEP/1986	3	3 - 3
1	10/MAY/1987	10.5	7.3 - 13
4	27/SEP/1986	4.5	3 - 6
5	6/SEP/1986	3	3 - 3
Delegación Coyoacán			
1	23/FEB/1987	11.5	10 - 13

TABLA IV: Niveles de contaminación con ocratoxinas en muestras de masa de maíz colectadas en las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán, D. F., de agosto de 1986 a noviembre de 1987

M O L I N O	FECHA DE COLECTA	CONTAMINACION PROMEDIO	µg/kg RANGO
Delegación Benito Juárez			
2	1/SEP/1986	5.5	3 - 8
5	29/JUN/1987	8	8 - 8
Delegación Coyoacán			
1	20/JUL/1987	5.5	3 - 8
4	16/MAR/1987	5.5	3 - 8

TABLA V: Niveles de contaminación de zearalenona en muestras de masa de maíz colectadas en las Delegaciones Benito Juárez y Coyoacán, D. F., de agosto de 1986 a noviembre de 1987

M O L I N O	FECHA DE COLECTA	CONTAMINACION $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		PROMEDIO	RANGO
Delegación Benito Juárez			
1	2/MAR/1987	167	167 - 167
4	27/ABR/1987	282	250 - 313
Delegación Coyoacán			
2	14/SEP/1987	209	167 - 250



Gráfica 1. Muestras de masa de maíz obtenidas en el D.F. de agosto de 1986 a noviembre de 1987, contaminadas con aflatoxinas, ocratoxinas y zearalenona, y su relación con la estación lluviosa y la época de importación de maíz durante ese período.

Con relación a las aflatoxinas, cabe mencionar que durante el periodo de muestreo, que fue de agosto de 1986 a noviembre de 1987, solamente fueron encontradas 5 muestras contaminadas con aflatoxinas (2% del total de muestras analizadas), con niveles de concentración que fueron de 3 a 13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla III). La mayor incidencia de contaminación fue en 1986, en la Delegación Benito Juárez, en donde los muestreos realizados el mes de septiembre mostraron que en tres molinos diferentes la masa estaba contaminada con niveles de 3 a 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Estos niveles de contaminación están muy por abajo de los límites aceptados en los códigos sanitarios incluidos en las legislaciones de E.U.A. y de la Comunidad Económica Europea (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) (Krogh, 1976, 1977; Schuller et al., 1983). En mayo de 1987, en la misma delegación, fue detectada una muestra con niveles de contaminación de 7.3 a 13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ lo que da un promedio 10.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En la Delegación Coyoacán solamente fue detectada una muestra contaminada en febrero de 1987, con 10 a 13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y en promedio 11.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. En todas estas muestras solamente fue detectada aflatoxina B1.

Debido a que la inspección fue realizada en la masa y no en el maíz no es posible hacer inferencias con relación al segundo, pero los resultados y los antecedentes académicos sugieren que el reducido número de muestras positivas, así como los bajos niveles de contaminación, son debidos al proceso de nixtamalización (Dollear, 1969; Beckwith et al., 1976; Lillehoj, 1987). En septiembre de 1986, tres muestras fueron encontradas contaminadas, aunque con niveles muy bajos de aflatoxinas, lo que

pudo deberse a que los lotes de maíz llegaron a los molinos muy contaminados y el proceso de alcalinización durante la nixtamalización no fue suficientemente intenso para destruir las aflatoxinas hasta los límites mínimos detectables por la técnica empleada; es también posible que a pesar de que el nivel de contaminación del maíz no fuese muy alto en esas ocasiones, el período de nixtamalización en esos molinos se hubiese reducido debido al volumen de ventas. El mayor número de muestras contaminadas fue encontrado en septiembre, lo cual coincide con la época lluviosa en el Distrito Federal y con la época de importación de este grano; esto puede significar que los lotes de maíz usados estaban contaminados porque ya venían así del exterior, o porque durante el transporte y almacenamiento se hayan contaminado debido a un almacenamiento deficiente y a que el agua de condensación o la humedad relativa humedecieron el grano, permitiendo el desarrollo de hongos micotoxígenos y la producción de sus toxinas.

Otro grupo de toxinas de importancia sanitaria para la salud humana son las ocratoxinas. Las muestras colectadas para detectar aflatoxinas fueron también inspeccionadas para detectar simultáneamente ocratoxinas; con relación a estas toxinas, cuatro de las muestras analizadas estuvieron contaminadas (1.6% del total de muestras analizadas), dos en la Delegación Benito Juárez y dos en la de Coyoacán, con niveles de 3 a 8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla IV); su presencia en el tiempo resulta muy esporádica ya fueron detectadas en septiembre de 1986, y en marzo, junio y julio de

1987 (gráfica I); todos estos meses son parte de la época de lluvias en el Distrito Federal, por lo que es posible que el maíz con el que se elaboró la masa estuviese contaminado, debido a que las condiciones de humedad favorecieron el desarrollo de hongos productores de micotoxinas y la formación de estas toxinas durante el transporte y el almacenamiento. El mes en el que se detectó la contaminación más elevada por ocratoxinas fue junio, con niveles de 8 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla II); este mes, además de ser lluvioso en el Distrito Federal, coincide con el período de importación del maíz, por lo cual es también posible que estos lotes viniesen ya contaminados del exterior. Los niveles de contaminación detectados y la incidencia de muestras positivas para ocratoxinas hacen suponer que la contaminación con esta toxina no debe ser preocupante.

A pesar de que la zearalenona no es una toxina con implicaciones sanitarias potencialmente peligrosas para el hombre, la metodología seguida para analizar aflatoxinas y ocratoxinas permitió al mismo tiempo analizar las muestras de masa para esta toxina; en 1986 no se lograron detectar muestras positivas, mientras que durante 1987 tres muestras de la masa colectada estuvieron contamiadas con zearalenona (1.25% del total de muestras analizadas), dos en la Delegación Benito Juárez y una en la de Coyoacán, siendo su distribución en el tiempo muy esporádica (Tabla II); los niveles de contaminación detectados fueron de 167 a 313 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Tabla V). Tanto la escasa distribución en el tiempo y en el espacio, como las bajas

concentraciones detectadas permiten suponer que la presencia de estas toxinas no representa un riesgo ni siquiera para los animales que, como el cerdo, son altamente susceptibles a sus efectos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que los postulados planteados en la introducción de la tesis se cumplen; el número de muestras contaminadas con aflatoxinas, que representó 2% del total de las muestras analizadas, así como los niveles de contaminación de las mismas, de 3 a 13 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, los cuales estuvieron muy por abajo de los límites permitidos en los códigos sanitarios y legislaciones de los países que los tienen, sugieren que la contaminación con aflatoxinas no representa un problema sanitario preocupante para la población consumidora de masa de maíz en el Distrito Federal, pero es importante no subestimar el problema potencial que pudiese representar un descuido en el proceso de nixtamalización.

La mayor incidencia de aflatoxinas en el mes de septiembre, coincidiendo con períodos de importación del maíz, hace suponer que puede ser el maíz extranjero el que está más contaminado, por lo que se sugiere mayor atención en este rubro por parte de las

autoridades competentes respecto a las importaciones de este grano. Es importante hacer notar que la mayor incidencia de aflatoxinas en la masa también coincidió con la estación lluviosa, por lo que otra posibilidad es que un almacenamiento deficiente haya favorecido la presencia de hongos productores de micotoxinas en los lotes de maíz, así como la formación de aflatoxinas.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

39

BIBLIOGRAFIA CITADA

Allcroft, R. 1969. Aflatoxicosis in farm animals. En: L. Goldblatt (Ed.) Aflatoxin. Academic Press, Nueva York, pp 237-264.

Association of Official Analytical Chemists. 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 14a Ed., Cap. 26.

Barkin, D. y B. Suárez, 1982. El fin de la autosuficiencia alimentaria. Ed. Océano, México, 267 pp.

Beckwith, A.C., R.F. Vesonder y A. Ciegler. 1976. Chemical methods investigated for detoxifying aflatoxins in food and feed. En: V.J. Rodricks (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. 149. Washington D.C. pp 58-67.

Bennet, G.A., D.L. Shotwell y C.W. Hesseltine. 1980. Destruction of zearalenone in contaminated corn. JAOAC 57: 245-247.

Coomes, J.T., P.C. Crowther, A.J. Fenell y G.J. Francis. 1966. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. Nature 209: 406-407.

Chakrabarti, A.G. 1981. Detoxification of corn. J. Food Protection 44: 591-592.

Christensen, C.M. 1975. Molds, Mushrooms and Mycotoxins. University of Minnesota Press, Mineápolis, pp 59-113.

Davis, N.D. y U.L. Diener. 1978. Mycotoxins. En: L.R. Beuchat (Ed.) Food and Beverage Mycology. AVI Publishing Co. Westport, pp 397-444.

Dollear, F.G. 1969. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds. En: L.A. Goldblatt (Ed.) Aflatoxin. Academic Press, Nueva York, pp 359-391.

Dollear, F.G. y H.K. Gardner. 1966. Inactivation and removal of aflatoxin. Presentado en parte por cada autor en: Fourth National Peanut Research Conference, Tifton, Ga. July 14 a 15.

Eppley, R.M. 1968. Screening method for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin. JAOAC 31: 74-78.

Font Quer, P. 1973. Diccionario de Botánica. Ed. Labor, Barcelona, pp 539.

García-Aguirre, G. y R. Martínez-Flores. 1985. *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en el maíz del Distrito Federal. Rev. Mex. Mic. 1:189-199.

Goldblatt, L.A. 1966. Some approaches to the elimination of aflatoxin from protein concentrates. World Prot. Res. 57: 216-226.

Goldblatt, L.A. 1968. Aflatoxin and its control. Econ. Bot. 22: 51-62.

Goldblatt, L.A. 1971. Control and removal of aflatoxin. J. Am. Oil Chem. Soc. 48: 605-610.

Goldblatt, L.A. y F.G. Dollear. 1977. Review of prevention, elimination, and detoxification of aflatoxins. Pure Appl. Chem. 49:1759-1764.

Hagan, N.S. y W.H. Tietjen. 1975. A convenient thin layer chromatographic cleanup procedure for screening several mycotoxins in oils. JAOAC 58:620-621.

Hesseltine, C.W. 1976. Conditions leading to mycotoxin contamination of food and feeds. En: V.J. Rodricks (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. 149, Washington D.C. pp 1-22.

Ichinoe, M. y H. Kurata. 1983. Trichothecene-producing fungi. En: Y. Ueno (Ed.) Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects. Elsevier, Amsterdam, pp 73-81.

Illescas, R. 1943. Teoría química de la formación del nixtamal. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 4:129-134.

Justice, O.L. y L.N. Bass. 1979. Principles and Practices of Seed Storage. Castel House Publications, Londres, pp 81-88.

Kenaga, B.C. 1974. Principles of Phytopathology. Belt Publishers, Indiana, pp 1-3.

Koehler, B. 1959. Corn ear rots in Illinois. University of Illinois, Agr. Exp. Sta. Urbana Bull. 639: 32-37.

Krogh, P. 1976. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. En: M. Jemali (Ed.) Les Mycotoxines dans l'alimentation. IUPAC, París, pp 411-414.

Krogh, P. 1977. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. Pure Appl. Chem. 49:1719-1722.

Lillehoj, E.B. 1987. Decontamination of aflatoxin - contaminated maize grain. En: M.S. Zuber, E.B. Lillehoj y B.L. Renfro (Eds.) Aflatoxin in Maize. A proceeding of the workshop, CIMMYT México, pp 260-279.

Mirocha, Ch.J., B. Schauerhamer, y S.V. Pathre. 1974. Isolation, detection, and quantitation of zearalenone in maize and barley. JAOAC 57:1104-1110.

Nesheim, S. 1976. The ochratoxins and other related compounds. En: V.J. Rodricks (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. 149, Washington D.C. pp 276-295.

Romer, T. 1984. Mycotoxins in corn and corn milling products. Cer. Foods World 29: 459-462.

Roschenthaler, R., R.E Creppy., H.D. Dreismann y G. Dirheimer. 1984. Ochratoxin A- On the mechanism of action. En: H. Kurata y Y. Ueno (Ed.) Toxigenic Fungi -Their Toxins and Health Hazard. Elsevier, Amsterdam, pp 255-264.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidraulicos, 1986. Balanza comercial agropecuaria y forestal 1977-1986.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidraulicos, 1988. Sistema Integral de Información: Avance en la producción agropecuaria y forestal al Ultimo de febrero de 1988.

Shank, R.C. 1976. Aflatoxin in human disease. En: J.V. Rodricks (Ed.) Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems. Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. 149: 51-57.

Schuller, P.L., H.P. Van Egmond y L.Stoloff. 1983. Limits and regulations on mycotoxins. Proc. Int. Symp. Mycotoxins pp 111-129.

Shurtleff, M.C. (Ed.) 1980. Compendium of Corn Diseases. American Phytopathological Society, en cooperación con The Cooperative Extension Service y Department of Plant Pathology, Universidad de Illinois, Urbana. pp 1-4.

Shotwell, O.L. 1977. Mycotoxins-corn-related problems. Cer. Foods World 22: 524-527.

Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, M.L. Goulden y E.E. Vandegratt. 1970. Survey of corn for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. Cereal Chem. 47:700-707.

Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, E.E. Vandergratt y M.L. Goulden. 1971. Survey of corn from different regions for aflatoxins, ochratoxins and zearalenone. Cereal Sci. Today. 16: 266-273.

Shotwell, O.L., M.L. Goulden, R.J. Bothast y C.W. Hesseltine. 1975. Mycotoxins in hot spots in grains. I. Aflatoxin and zearalenone occurrence in stored corn. Cereal Chem. 52:687-697.

Smith, J.E. y D.R. Berry. 1974. An Introduction to Biochemistry of Fungal Development. Academic Press, Londres, pp 282-308.

Smith, J.E. y D.R. Berry. 1975. The Filamentous Fungi: Industrial Mycology. Edward Arnold, Londres, Vol. I pp 33-58.

Steyn, S.D. 1980 The Biosynthesis of Mycotoxins: A Study in Secondary Metabolism. Academic Press, Nueva York, pp 1-16.

Ulloa-Sosa, M. y H.W. Schroeder. 1969. Note on aflatoxin decomposition in the process of making tortillas from corn. Cereal Chem. 46: 397-400.