

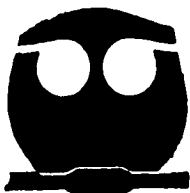


3
ZET
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“CUANTIFICACION DE AFLATOXINAS E IDENTIFICACION
DEL HONGO *ASPERGILLUS SPP.* PRODUCTOR, EN EL
MAIZ CONTAMINADO DEL ESTADO DE TAMAULIPAS”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A
GUSTAVO ADOLFO ARROYO TORRES



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.

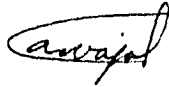
JURADO

ii

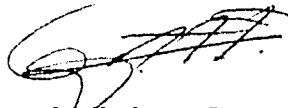
Presidente: Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal: Prof. Magda Carvajal Moreno
Secretario: Prof. Pedro Valle Vega
1er. suplente: Prof. Mercedes Palao Rincón
2do. suplente: Prof. Hugo Sousa Rojano

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Micotoxinas,
Departamento de Botánica,
Instituto de Biología,
Universidad Nacional Autónoma de México.



Asesora: Dra. Magda Carvajal Moreno.



Sustentante: Gustavo Adolfo Arroyo Torres.



DEDICATORIA

A mis padres, Alma y Manuel.

A mis hermanos, Eduardo, Carlos, Rocío y Roxana.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Magda Carvajal Moreno por su apoyo en la dirección y computación de esta tesis.

Al Instituto de Biología de la UNAM por aceptar ser el lugar donde se desarrolló el trabajo y el financiamiento de la investigación.

A la Doctora Elizabeth Cárdenas del Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, por su asesoría en microscopía óptica y electrónica.

Al Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados de Montecillo, Estado de México por facilitar el uso del equipo y reactivos para la microscopía.

A los miembros del jurado de Examen Profesional:

Presidente: Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova

Vocal: Prof. Magda Carvajal Moreno

Secretario: Prof. Pedro Valle Vega

1er. suplente: Prof. Mercedes Palao Rincón

2do. suplente: Prof. Hugo Sousa Rojano

A la Bodega Rural "Las Yescas" de Boruconsa CONASUPO en Tamaulipas por donar el material de estudio.

A la Facultad de Química de la UNAM, al Departamento de Alimentos y Biotecnología, a mis profesores por la formación recibida a lo largo de la Licenciatura.

A Bety, Roger, Olga, Gaby y Ceci, por su amistad y apoyo durante 5 años.

A todos mis compañeros de la generación '90 de Química de Alimentos.

A todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron en la realización de este trabajo.

INDICE

Título	i
Jurado	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	viii
Lista de Apéndices	ix
Resumen	x
Abstract (en inglés)	xi

I. INTRODUCCION

1.	Aspectos generales de las aflatoxinas.	1
2.	Propiedades de las aflatoxinas.	3
3.	Biosíntesis.	7
3.1	Precusores en la biosíntesis de aflatoxinas.	8
a)	Xantonas.	8
b)	Polihidroxiantraquinonas.	10
4.	Efectos de las aflatoxinas en plantas y animales.	15
4.1	Efectos de las aflatoxinas en plantas.	15
4.2	Efectos de las aflatoxinas en animales.	16
5.	Bodega "Las Yescas" de Tamaulipas.	20
6.	Biología del género <i>Aspergillus</i> .	23
7.	Importancia de la tesis.	27

II. OBJETIVOS28

III. MATERIALES Y METODOS

1.	Obtención de la cepa de hongo.	29
a.	Medios de cultivo.	29
b.	Condiciones de esterilización.	29
c.	Obtención de cepas a partir de grano sobre papel filtro.	30
d.	Obtención de cepas a partir de muestras de tierra y maleza.	30
2.	Pruebas de identificación del hongo	32
a.	Prueba bioquímica para la identificación de cepas lipolíticas.	32
b.	Estudio de microfotografía.	32
3.	Calibración	36

4.	Análisis químico	37
a.	Método Biocode para cuantificación de aflatoxinas totales.	37
b.	Método de Thomas-Eppley para identificación de aflatoxinas por cromatografía de capa fina.	40
5.	Experimentos sobre calibración del fluorómetro.	43
a.	Aspectos técnicos sobre la estructura del fluorómetro.	43
b.	Significado de la ganancia en el fluorómetro.	45
c.	Experimento 1: Validez del método Biocode.	45
d.	Experimento 2: Comparación de métodos con extractos de aflatoxinas medidos en HPLC.	46
e.	Experimento 3: Equivalencia de estándares.	46
f.	Experimento 4: Calibración ajustada.	47
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	
1.	Obtención de la cepa de hongo.	49
a.	Obtención de cepas a partir de grano sobre papel filtro.	49
b.	Obtención de cepas a partir de muestras de tierra y maleza.	50
2.	Pruebas de identificación del hongo.	52
a.	Identificación de cepas lipófilas.	52
b.	Estudio de microfotografía.	52
3.	Experimentos sobre calibración del fluorómetro	56
a.	Experimento 1: Comprobación usando estándares Biocode.	56
b.	Experimento 2: Comparación con extractos medidos en HPLC	58
c.	Experimento 3: Equivalencia de estándares.	60
d.	Experimento 4: Calibración ajustada.	62
4.	Análisis químico	64
a.	Resultados del método Biocode para cuantificación de aflatoxinas totales	64
b.	Resultados del método de Thomas-Eppley para la identificación de aflatoxinas por cromatografía de capa fina	74
V.	CONCLUSIONES	77
VI.	BIBLIOGRAFIA	78
VII.	APENDICE. a. Clave de identificación de <i>Aspergillus spp.</i>	84

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Fórmula de las aflatoxinas	5
Fig. 2	Interacción entre AFB ₁ y grupos -SH	6
Fig. 3	Estructura química de las Xantonas	9
Fig. 4	Estructura química de las Polihidroxiantraquinonas	11
Fig. 5	Biosíntesis de aflatoxinas	14
Fig. 6	Localización del Estado de Tamaulipas	21
Fig. 7	Localización de la Bodega Rural "Las Yescas"	22
Fig. 8	Ciclo de vida de <i>Aspergillus spp.</i>	24
Fig. 9	Principio de extracción por inmovilización por afinidad	38
Fig. 10	Comparación de las columnas con anticuerpos monoclonales marcas Biocode y Aflatest	39
Fig. 11	Estructura del fluorómetro	44
Fig. 12	Fotografías de <i>Aspergillus flavus</i> : Crecimiento en agar y microscopía óptica	51
Fig. 13	Microfotografías en el microscopio electrónico de los hongos obtenidos	55
Fig. 14	Correlación de las mediciones de las muestras analizadas con la calibración y estándares de las marcas Biocode y Aflatest	72

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Dosis letal media (DL_{50}) de aflatoxina B_1 en animales	17
Tabla II.	Características diferenciales entre <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i>	25
Tabla III.	Medición de ancho y largo de las esporas de <i>Aspergillus spp.</i> de maíz cribado	53
Tabla IV.	Comprobación del método Biocode con HPLC	56
Tabla V.	Comparación entre estándares Aflatest y Biocode con HPLC	58
Tabla VI.	Medición de estándares Aflatest-P y Aflatest-10 equivalentes a la calibración ajustada al método y estándares Biocode.	60
Tabla VII.	Comprobación de la calibración ajustada	62
Tabla VIII-a.	Cuantificación de aflatoxinas de la bodega "Las Yescas" de Tamaulipas por el método de fluorometría con columnas monoclonales Biocode 1992	64
Tabla VIII-b.	Resumen de los datos de aflatoxinas totales en el maíz cribado, sin cribar y en la tierra de "Las Yescas"	70
Tabla IX.	Determinación de los tipos de aflatoxinas en muestras de maíz y tierra de la bodega rural "Las Yescas"	76

INDICE DE APENDICES

a. Clave de identificación de *Aspergillus spp.*84

RESUMEN

La problemática que representa la epifiticia que sufre el maíz del Estado de Tamaulipas debido a hongos del género *Aspergillus*, es compleja y requiere de esfuerzos a nivel nacional para su control.

El problema no es el hongo en sí, sino una toxina o metabolito secundario llamado "aflatoxina" que es considerado un potente cancerígeno biológico.

En este trabajo se investigaron los tres aspectos; químico, biológico y de calibración del fluorómetro:

- a. El aspecto químico comprende la cuantificación de niveles de aflatoxinas en el maíz, tierra y malezas de la bodega rural "Las Yescas", de Boruconsa, Conasupo. Esta bodega guardó todo el maíz contaminado con aflatoxinas de Tamaulipas cosechado de 1989 a 1993.
La cuantificación de aflatoxinas se realizó por cromatografía en columnas de inmunoafinidad de cultivos monoclonales y se detectó por fluorometría. Se usaron dos diferentes marcas de estándares de calibración para comparar resultados.
Asimismo, se realizó una cromatografía de capa fina para conocer el tipo de aflatoxinas presente.
- b. El aspecto biológico comprende el aislamiento e identificación de las especies del hongo productoras de aflatoxinas en dicho maíz, tierra y malezas, por medio de microscopía y pruebas bioquímicas.
- c. El tercer aspecto resuelve la problemática del uso de estándares de calibración que no corresponden a la técnica empleada para cuantificar aflatoxinas, dado que en el Programa de Supervisión de aflatoxinas en maíz de Tamaulipas, durante algunos años han usado una técnica de análisis con los estándares de calibración que no le corresponden.

Los resultados de esta investigación nos indican que:

- La especie del hongo presente es *Aspergillus flavus*, según los estudios de microscopía óptica y las pruebas bioquímicas para reconocer cepas lipófilas del hongo. Los tipos de aflatoxinas presentes en las muestras de "Las Yescas" que fueron sólo B₁ y B₂.
- Los niveles de aflatoxina encontrados fueron altos, un promedio de 74 ppb el maíz no cribado y 333 ppb el maíz sin cribar, de 100 muestras analizadas.
- El cribado reduce las cantidades de aflatoxina un 75% aproximadamente.
- La tierra aislada de la bodega arriba mencionada tiene un promedio de 127 ppb de aflatoxinas debido a los altos índices de contaminación de la misma.
- El uso de estándares que no corresponden a la calibración con determinada técnica afecta los resultados presentando la mitad de aflatoxinas de lo que en realidad hay.
- Se encontró la equivalencia entre los estándares haciendo posible el uso indistinto de estos para obtener resultados confiables.

ABSTRACT

The northern State of Tamaulipas in Mexico suffers an epiphytia in maize caused by the fungus *Aspergillus*, its control is complex and requires a national effort.

The problem is not the fungus itself, but a secondary metabolite called "aflatoxin" that is considered a potent biological carcinogen and immunodepressor.

In the present work, three items were studied, the chemical, the biological and another technical of calibration of the fluorometer.

- a. The chemical focus includes the quantitation of aflatoxin levels in maize, soil and weeds, from the storage place called "Las Yescas", from Boruconsa, Conasupo. This warehouse stored the aflatoxin contaminated maize from Tamaulipas, harvested from 1989 to 1993. The aflatoxin quantitation was done with immunoaffinity column chromatography method from monoclonal cultures and was measured by fluorometry. Two different trademarks of calibration standards were used to compare results. Thin layer chromatography was done also to know the kind of aflatoxin present.
- b. The biological focus includes the isolation and identification of the fungus producer of aflatoxins, in soil and weeds, through microscopy and biochemical tests.
- c. The third focus solves the problem of calibration standards from different trademarks from those recommended by the used method, because in the Supervising Control Program of maize aflatoxins of Tamaulipas, they often used other calibration standards from the ones needed for the immunoaffinity method used.

The results of this research showed that:

- The fungal species is *A. flavus*, from the optical microscopy and biochemical tests done to recognize lipolytic strains of the fungus. The types of aflatoxin present in the samples from "Las Yescas" were only B₁ and B₂.
- The levels found were high, a mean of 74 ppb for the not sieved maize and 333 ppb for the sieved one, out of 100 analysed samples.
- Sieve treatment reduced the amount of aflatoxins around 75 %.
- The soil from the mentioned warehouse had aflatoxins (127 ppb) due to the high level of contamination present.
- The use of calibration standards that not match with the method, affects the results, showing half of the aflatoxins present in the real concentration.
- The corresponding efficiency of the standards was found making possible its undistinct use with good results.

1. INTRODUCCION

1. Aspectos generales de las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. Químicamente corresponden a las bis-dihidrofuranocumarinas y son los cancerígenos biológicos más potentes que se conocen.

Afectan prácticamente a todos los seres vivos desde los virus hasta al hombre. Entre los síntomas que producen están vómitos, diarreas, cirrosis, hepatomas, proliferación de conductos biliares, inmunodepresión, daños teratógenos (malformaciones de fetos) y abortos en diferentes animales y el hombre.

Los hongos del género *Aspergillus*, contaminan con sus toxinas diferentes alimentos: semillas de algodón, cereales y oleaginosas, productos lácteos, cárnicos, vinos, etc.

Estos contaminantes de los alimentos actúan en concentraciones de partes por billón (microgramos por kilogramo). Son fluorescentes al exponerlas a la luz ultravioleta de onda larga y resisten altas temperaturas, en un rango entre 260 y 320°C, por lo tanto no se eliminan por completo con la cocción, fritura ni con la pasteurización de los alimentos contaminados.

En el caso del maíz, el proceso de nixtamalización las "disfraza", ya que debido al pH alcalino al que el maíz es sometido en este proceso, se abre el anillo de lactona (Figura 1) que tienen en su estructura molecular eliminando así su propiedad de fluorescer bajo la luz ultravioleta y esto impide su detección.

Sin embargo, con los ácidos gástricos de los animales y del hombre durante la digestión, el anillo de lactona se cierra nuevamente, las aflatoxinas recuperan su potencial tóxico y sus propiedades de fluorescencia, y pueden detectarse de nuevo.

Existen 6 tipos principales de aflatoxinas producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* y que se designan según el color que presentan al fluorescer o se nombran por sus sustratos, así tenemos:

- B₁** que da una fluorescencia azul ('blue') y el número 1 indica que es la que viaja más rápido en el corrimiento cromatográfico de capa fina.
- B₂** es un derivado de la anterior, es 10 veces menos mutágena (Carvajal, M. 1994. comunicación personal). Carece de la doble ligadura en el furano exterior y también presenta fluorescencia azul, el número 2 indica que viaja más lento en la placa cromatográfica de capa fina.

- M₁** es un derivado hidroxilado de la AFB₁ que se metaboliza y pasa a la leche de ahí su nombre ('milk').
- M₂** es un derivado de la M₁ y el número 2 indica que corre más lento en la placa cromatográfica de capa fina.
- G₁** es un derivado de la AFB₁ con un anillo de 5 carbonos (pentosa) en lugar del anillo con 6 carbonos característico de las de tipo B y tiene una fluorescencia verde ('green').
- G₂** es un derivado de la AFB₁ y tiene también una fluorescencia verde pero carece de la doble ligadura en el furano externo, se nombra 2 porque es más lenta en su corrimiento cromatográfico que la anterior, apareciendo hasta abajo.

La producción de los distintos tipos de aflatoxinas, dependen de la especie del hongo, el tipo de cepa, del balance de nutrientes en el medio y sobre todo de las condiciones de cultivo. Condiciones bajas de pH y la presencia de trazas de metales como Mn²⁺, Mg²⁺ y Va²⁺ favorecen la formación de las aflatoxinas hidroxiladas, es decir, AFM₁ y AFM₂ (Steyn, 1980)⁴⁹.

La producción de aflatoxinas se favorece por condiciones inadecuadas de almacenamiento como son un contenido de humedad mayor al 16 % y una temperatura arriba de los 11 °C y hasta 40 °C si las condiciones de humedad son adecuadas aunque el rango óptimo de desarrollo del hongo está entre los 25 °C y los 35 °C (Diener & Davis, 1987)⁹.

Los hongos del género *Aspergillus* producen aflatoxinas sobre una gran variedad de sustratos, en cacahuates, las condiciones óptimas para el crecimiento y multiplicación del hongo, así como para la producción de aflatoxinas son: una temperatura entre 25 a 30 °C, y una humedad de 10%. Para el caso de *Aspergillus flavus*, se requiere de una humedad relativa del aire del 85 % que corresponde a un 18.3 - 18.5 % de humedad en cereales; las temperaturas mínima, óptima y máxima de producción de aflatoxinas son 12, 27-30 y 40-42 °C respectivamente. (Diener & Davis, 1987)⁹.

2. Propiedades de las aflatoxinas.

La más importante de todas las aflatoxinas desde el punto de vista toxicológico y químico es sin duda la aflatoxina B₁ (AFB₁), ya que es la precursora de todos los tipos de aflatoxinas restantes (Figura 1).

Dentro de las propiedades químicas más importantes de la AFB₁ tenemos las siguientes (Giralt, *et. al.* 1989)¹⁷:

Fórmula mínima: C₁₇ H₁₂ O₆

Peso molecular: 312

Rotación óptica: α_D^{20} 558

Presenta fluorescencia azul intensa al exponerla a la luz ultravioleta convencional de longitud de onda larga (350 nm) con tres picos máximos de absorción en: 223, 265 y 362 nm. La fluorescencia es emitida a 425 nm.

Es ligeramente soluble en agua y soluble en muchos solventes orgánicos de polaridad intermedia como metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y cloroformo.

Se puede extraer de los granos contaminados utilizando cloroformo-metanol (97:3) o acetona acuosa al 70 %.

Se descompone sin evaporarse a 270 °C.

Se rompen con hipoclorito de sodio por lo que se recomienda para descontaminar material de laboratorio (Stoloff & Troger, 1965)⁵⁰.

Con base en estas propiedades, se han ideado métodos de control de aflatoxinas en granos y otros alimentos. De este modo, se ha tratado de extraerlas del alimento utilizando distintos disolventes, pero esto tiene dificultades económicas y técnicas. Se han probado otras alternativas como son los tratamientos térmicos (freído, tostado, etc.), que han demostrado que pueden disminuir la concentración de aflatoxinas (Bagley, 1979)³.

Se ha sugerido el uso de agentes reductores con grupos -SH que son capaces de reaccionar con la forma tóxica de la aflatoxina B₁ o sea el 2, 3- epóxido- aflatoxina B₁ como podemos ver en la figura 2 (Mirocha, *et. al.* 1980)³⁷.

La aflatoxina B₁ requiere una activación metabólica para que se expresen sus efectos mutágenos y cancerígenos, según estudios químicos la ruta principal de activación proviene vía ataque de oxigenasas en el hígado (Campbell & Haynes, 1976; Roebuck & Wogan, 1977; Swenson *et. al.*, 1977)^{5,45,51}.

Las propiedades químicas de las aflatoxinas y sobre todo su estructura molecular, han dado lugar a las diversas formas de identificación y cuantificación a partir de muestras de alimentos contaminados.

De este modo, se tienen técnicas que se basan en la separación por cromatografía de capa fina (c.c.f.), detectando a las aflatoxinas por su capacidad de fluorescer con la luz ultravioleta, estos métodos tienen la desventaja de utilizar grandes cantidades de solventes, peligrosos en su manejo y a menudo estas técnicas son semicuantitativas y su sensibilidad no es la suficiente para determinar los límites que la legislación exige hoy en día.

Con el avance en cromatografía de líquidos (HPLC), se hizo posible cuantificar aflatoxinas, e incluso para separar los distintos tipos que existen naturalmente en los alimentos; aún así, la preparación de las muestras para analizarlas en el cromatógrafo de líquidos es compleja y en ocasiones resulta muy cara.

Más recientemente, las aflatoxinas se cuantificaron con métodos que incluyeron técnicas inmunológicas como el ELISA; estos métodos incrementan grandemente la sensibilidad y además, el costo y la complejidad de las técnicas han ido haciéndose más accesibles para muchos laboratorios.

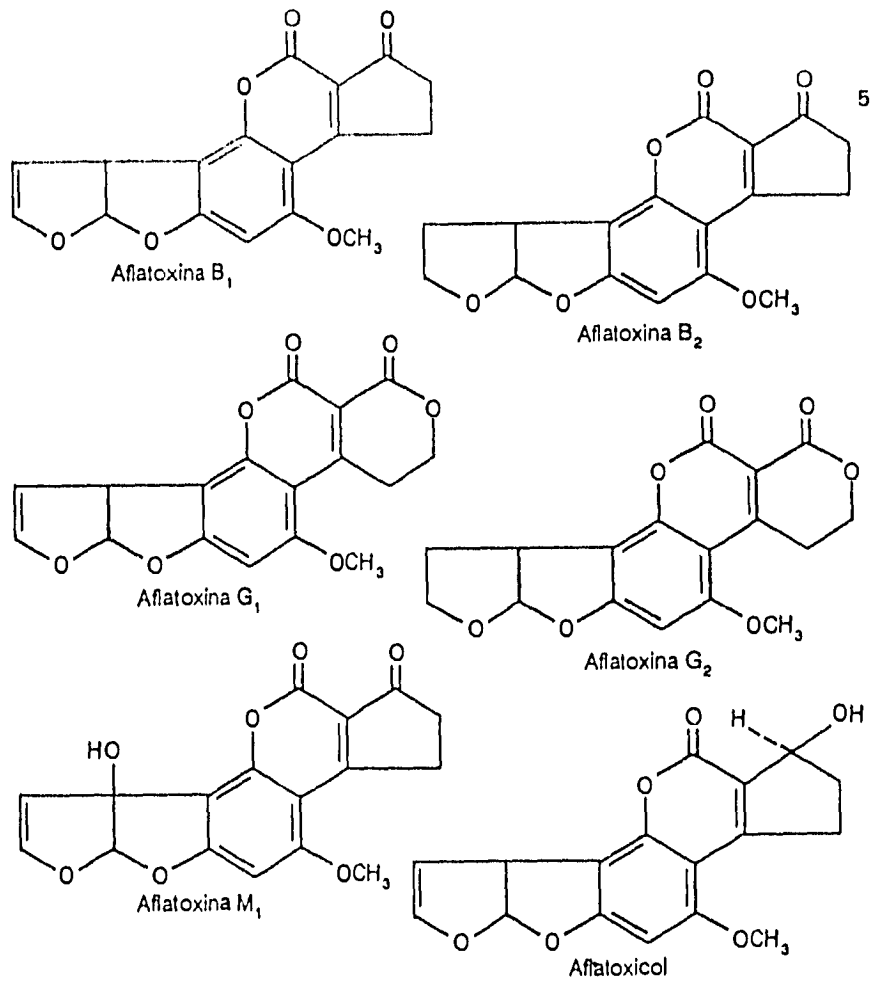


Figura 1: Fórmula de las aflatoxinas. Tomado de Valle Vega, 1991⁵⁷.

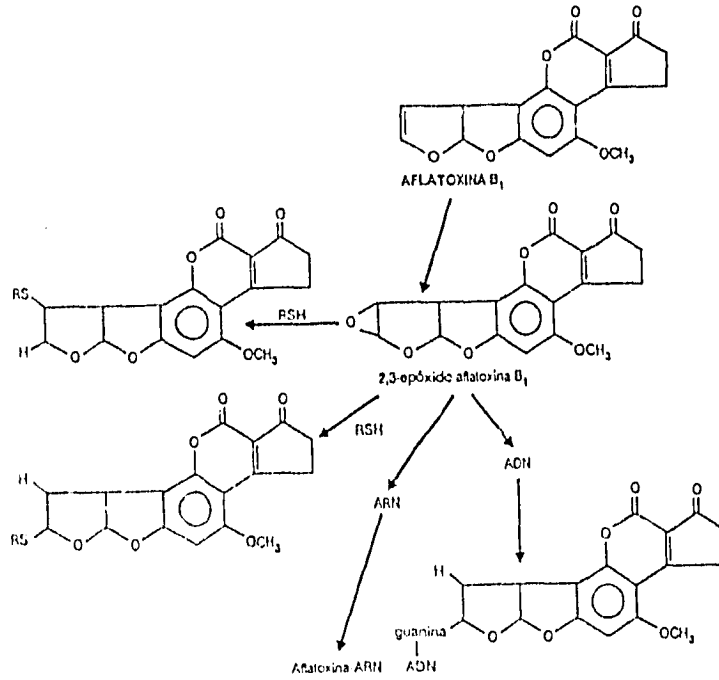


Figura 2: Interacción entre epóxido AFB₁, grupos reductores SH y principales productos de la biotransformación animal de la AFB₁. La toxicidad de las aflatoxinas esta dada en parte por su interacción con el ADN y el ARN de las células. Los compuestos con grupos reductores SH reaccionan con las aflatoxinas disminuyendo su toxicidad al prevenir la interacción con los ácidos nucleicos. Valle Vega, 1991⁵¹.

3. Biosíntesis. (Steyn, 1980)⁴⁹.

Se ha observado que después de 24 horas que el hongo alcanza las condiciones óptimas de temperatura y humedad (27-30 °C, 85 % H.R.) para la producción de aflatoxinas, la tasa de producción de ellas va en aumento hasta el doceavo día, que es cuando se alcanza el máximo de producción; luego la tasa disminuye progresivamente (Giralt, *et al.* 1989)¹⁷.

Por otro lado, Steyn (1980)⁴⁹, indica que la producción de toxina alcanza su máximo en el quinto día, que es cuando el hongo alcanza la fase estacionaria de crecimiento. La producción de aflatoxinas disminuye marcadamente del sexto al octavo día.

Se observa entonces que los patrones de formación de aflatoxinas y de lípidos son muy similares, dado que ambos provienen de un precursor común (acetato) (Shih & Martin, 1974)⁴⁶.

Otros experimentos en donde se incorpora glucosa marcada con el isótopo C₁₄ en posición uno, muestran que en condiciones anaeróbicas, en las que se desencadena el catabolismo de la glucosa vía Embden-Meyerhoff, se favorece la producción de aflatoxinas.

Para poder entender mejor la biosíntesis de aflatoxinas (AFB₁ en concreto), ayuda conocer algunas sustancias y metabolitos de estructura similar, o bien precursores de las mismas en el metabolismo de los hongos que las producen. Estas sustancias tienen aparentemente un origen común que consta de una estructura base de C₂₀ poli-β-quétido.

Estos metabolitos no pertenecen a un único grupo o clase de compuestos químicos, por lo que se describirán en forma separada.

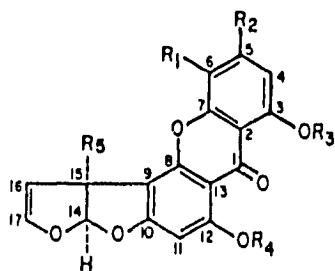
3.1 Precursores en la biosíntesis de aflatoxinas:

a) Xantonas:

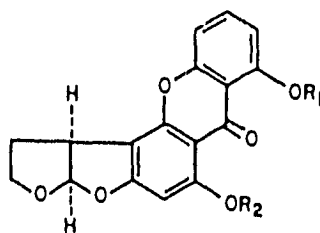
En primer lugar, la **esterigmatocistina**, es una xantona que contiene un sistema angular acoplado de bis-dihidrofurano. Esta sustancia fue aislada primeramente del micelio de *Aspergillus versicolor* (Hatsuda & Kuyama, 1954)²²; además se sabe que este compuesto también lo producen cepas de *A. nidulans*, *A. rugulosus*, *A. ustus*, *A. aurantiobrunneus*, *A. quadrilineatus* y *A. varicolor*.

En 1975, Kelton reportó (Steyn, 1980)⁴⁹ que había logrado aislar cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que producían esterigmatocistina, aunque Steyn en 1977, en un trabajo que no se publicó, no logró aislar este compuesto de dichas cepas. Ahora bien, se sabe que *A. flavus* produce derivados de esterigmatocistina como los son la dihidro-O-metil- esterigmatocistina, O-metil- esterigmatocistina y aspertoxina. Podemos ver en la figura 3 la similitud entre la estructura de la aflatoxinas con estas sustancias. Un dato interesante es que la esterigmatocistina es hasta diez veces menos cancerígena que la AFB₁ en ratas.

La esterigmatocistina adquiere gran relevancia en la química de las micotoxinas, ya que es el primer compuesto que contiene la función bisdihidrofurano en haber sido caracterizado. La estructura y la configuración absoluta de esta sustancia fueron verificadas por cristalografía de rayos X por Fukuyama, *et. al*, en 1975²³.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	
H	H	H	CH ₃	H	ESTERIGMATOCISTINA
H	H	CH ₃	CH ₃	H	O-METIL-ESTERIGMATOCISTINA
OCH ₃	H	H	CH ₃	H	6-METOXI-ESTERIGMATOCISTINA
OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	H	5,6-DIMETOXI-ESTERIGMATOCISTINA
H	H	CH ₃	CH ₃	OH	ASPERTOXINA



R ₁	R ₂	
H	CH ₃	DIHIDRO-ESTERIGMATOCISTINA
CH ₃	CH ₃	DIHIDRO-O-METILESTERIGMATOCISTINA

Figura 3: Estructura química de las Xantonas. Tomado de Steyn, 1980 ⁴⁹.

b) Polihidroxi-antraquinonas:

Estos compuestos se caracterizan por ser de un color naranja-rojizo y por corresponder químicamente a 1, 2, 6, 8-tetraoxi-2-alkil-antraquinonas.

Uno de estos compuestos es la **averufina**, que fue el primer compuesto natural en ser caracterizado con un sistema de 1, 3-benzodioxano en su estructura (Figura 4). Su estructura fue confirmada por cristalografía de rayos X por Katsube *et. al.* (1972)²⁷. Kingston *et. al.*, en 1976²⁸ aislaron 6, 8-O, O-dimetilnidurifina de *A. versicolor*, y lo propuso como un intermediario en la biosíntesis de aflatoxinas.

El ácido solorínico, que proviene de *Solorina crocea*, se conoce desde 1937 por Koller y Russ²⁹. El compuesto dimetilado llamado ácido norsolorínico, producido por *A. versicolor*, ha sido propuesto como precursor en la biosíntesis de averufina. Este hongo produce además averantina y 1'-O-metilaverantina. El tratamiento ácido de estos dos últimos compuestos resulta en la formación de averitrina, que es también un metabolito de *A. versicolor*.

En 1974, Yao & Hsieh³⁰ observaron que tratando cepas de *A. parasiticus*, con el cloruro de [O,O-dimetil-O-(2,2-diclorovinil)fosfato], se veía reducida la aflatoxigenicidad de la cepa y además se observaba la formación de un pigmento naranja-rojizo, llamado acetato de versiconal, que en solventes polares existe como una mezcla de tres isómeros (ver figura 2). Ahora bien, tratando este compuesto con un ácido mineral diluido, da lugar a la versicolorina C. Steyn y su equipo lograron aislar de *A. parasiticus*, los metabolitos relacionados llamados acetato de versiconol y versiconol.

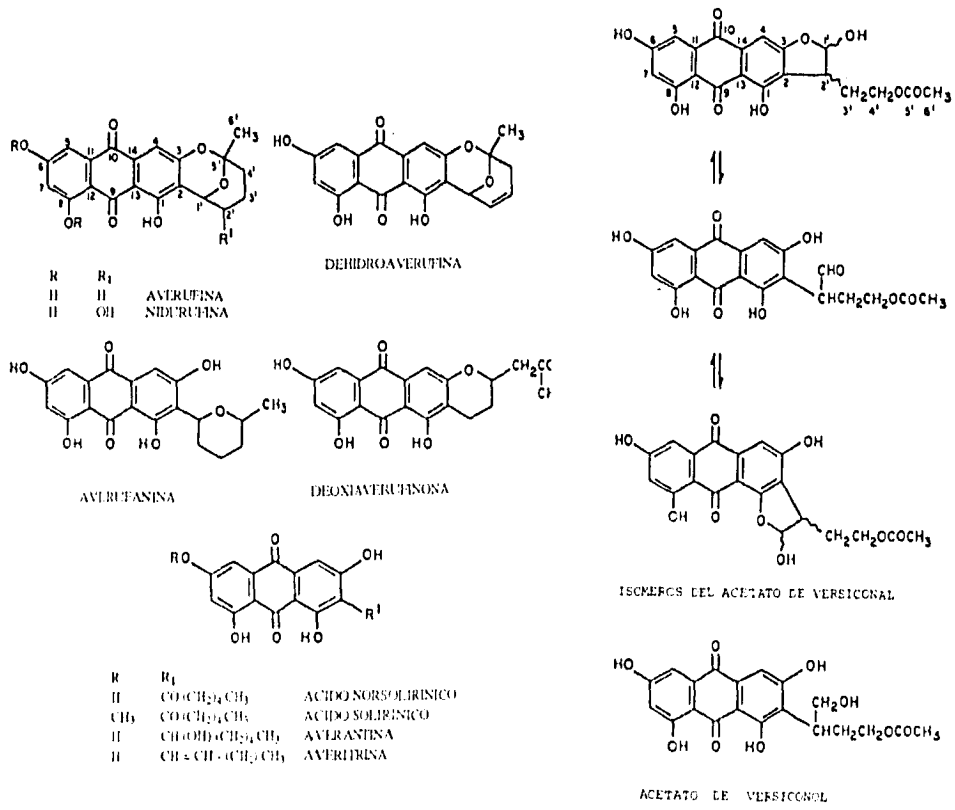


Figura 4: Estructura química de las polihidroxi-antraquinonas. Tomado de Steyn, 1980⁴⁹.

Dentro del estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios, las técnicas más empleadas utilizan precursores marcados con isótopos, de éste modo se ha podido comprobar la implicación de la *esterigmatocistina* en la biosíntesis de aflatoxinas, por ejemplo, Hsieh, *et. al.*²⁵ en 1976 lo comprobó en cepas de *A. parasiticus*, pero los mayores logros en la elucidación de la biosíntesis de aflatoxinas involucran técnicas más sofisticadas, así, la implicación de *averufina*, *esterigmatocistina* y la serie de los pigmentos *versicoloridos* en la biosíntesis de aflatoxinas han sido comprobados caracterizando productos de fermentación cercanos a las aflatoxinas.

Otra técnica más elegante es el uso de mutantes auxótrofos, por este método una sustancia puede ser establecida como un intermediario obligatorio. Utilizando estas técnicas, la implicación de *averufina* (Donkersloot, *et. al.* 1972)¹², del ácido norsolorfínico (Detroy, *et. al.* 1973)⁸ y de la *versicolorina A* (Lee, *et. al.* 1975)³¹ fue caracterizada.

Essigman¹³ y Lin³³ en 1977 con trabajos paralelos, establecen que el 15,16-dihidro-16-[N7-*guanidil*],15-hidroxi-aflatoxina B₁, es el producto principal de la hidrólisis ácida del aducto aflatoxina B₁-ADN o aflatoxina B₁-ARN. Estos aductos se formaron en el hígado de ratas in vivo. La unión covalente de la aflatoxina B₁ con la guanina es capaz de inducir mutaciones "frame shift", es decir que al intercalarse la aflatoxina B₁ junto hace que el mecanismo de sustitución de bases se altere produciendo la pérdida de una base en la secuencia de ADN o ARN. (Figura 2). comprobada en la biosíntesis de aflatoxinas; estas sustancias son convertidas subsecuentemente en aflatoxina B₁ por cepas nativas de *A. parasiticus*.

Es probable que la presencia de Cu²⁺ y de Fe²⁺ sea esencial para la formación de los progenitores de las aflatoxinas. El efecto estimulador del Zn²⁺, en la producción de aflatoxinas fue demostrado por Maggon y su equipo en 1977³⁵. Ahora bien, se sabe que las enzimas glicolíticas de *A. parasiticus*, son dependientes de Zn²⁺, la presencia de este ión puede afectar la inducción de las enzimas del metabolismo secundario mediante la acumulación de cantidades suficientes de piruvato.

La actividad enzimática involucrada en la biosíntesis de aflatoxina B₁ según Steyn, se puede dividir en dos etapas:

- a) La construcción del precursor de antraquinona, en este caso *averufina* por la poliquétido sintetasa y,
- b) La fase de rearrreglo de enlaces que involucra enzimas que tienen afinidades de sustrato distintas.

Se ha establecido que las antraquinonas provienen de la ruta del acetato-pollmalonato, que involucra la condensación de un derivado del ácido carboxílico unido a la enzima (acetilo) con un número variable de unidades de malonato. Para el caso de la **averufina** se unen nueve unidades de malonato.

De este modo se ha propuesto un esquema de biosíntesis para las aflatoxinas y en general para todas las sustancias relacionadas llamadas cumarinas. La aflatoxina M₁, deriva de la AFB₁ por medio de un proceso de oxidación. Aunque, Heathcote²³ en 1976 propuso a la aflatoxina M₁ como precursor de la AFB₁, pero no ha habido trabajos subsecuentes que apoyen su evidencia.

Se han encontrado cepas de *A. flavus* que sólo producen aflatoxina B2 (Papa, 1977)³⁹ y en contraste no se han encontrado cepas que produzcan sólo aflatoxinas de la serie G. Estos hechos hacen suponer que la aflatoxina G₁, deriva de la AFB₁, probablemente por inserción de oxígeno entre C(3) y C(4) vía enzimas. Asimismo, el parasiticol es probablemente un derivado de la aflatoxina G₁ vía reacción hidrolítica seguida por una descarboxilación.

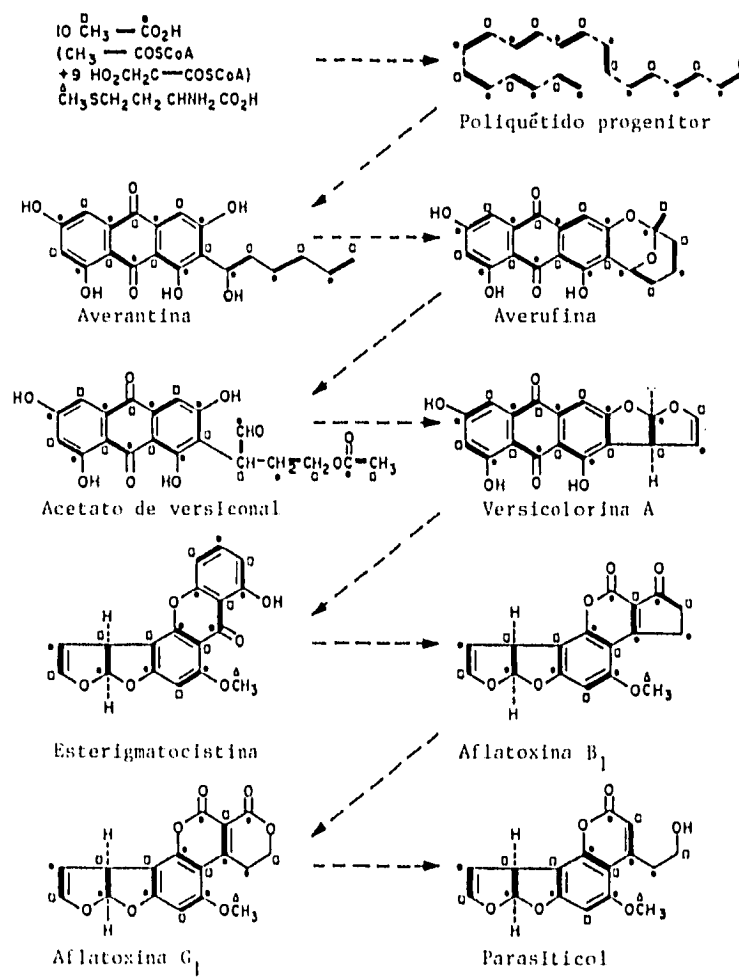


Figura 5: Biosíntesis de las aflatoxinas. Tomado de Steyn, 1980⁴⁹.

4. Efectos de las aflatoxinas en plantas y animales.

4.1 Efectos de las aflatoxinas en plantas (Wyllie & Morehouse, 1978)⁸¹

El daño de las aflatoxinas en algunos vegetales es de enanismo, así Crisan, en 1973⁷ describe que 100 $\mu\text{g/ml}$ de aflatoxina B₁ producen acortamiento del hipocotilo en lechuga, *Lactuca sativa*, en un 50 % más o menos. Asimismo, las aflatoxinas inhiben la producción de clorofila y la germinación, estos efectos se reducen con la acción del ácido β -indolilacético.

Como se dijo antes, las aflatoxinas son derivados cumarínicos con un grupo de lactona. Las cumarinas y las lactonas insaturadas son conocidas por tener un efecto sinérgico sobre el ácido β -indolilacético cuando se encuentran en bajas concentraciones y por tener un efecto antagónico cuando se encuentran en concentraciones altas; lo anterior se cumple también para la aflatoxina B₁ si se utilizan secciones de tallo de la planta del chícharo, *Pisum sativum* (Reiss, 1971)⁴⁴.

El efecto de las aflatoxinas sobre el metabolismo de algunas plantas se puede ejemplificar con la germinación de las semillas de algodón, *Gossypium hirsutum*. El ácido giberélico que estimula la formación de enzimas como las lipasas y las α -amilasas durante la germinación, ve disminuida su efectividad cuando se aplica sobre semillas que fueron expuestas a las aflatoxinas al disminuir considerablemente la actividad de estas enzimas. Esto lleva a pensar que las aflatoxinas tienen acción inhibitoria sobre la síntesis de proteínas (Black & Aitschul, 1965)⁴.

Un ejemplo más es el efecto de las aflatoxinas sobre la actividad metabólica que se da en la raíz de la papa, *Ipomoea batatas*, en la cual, la aflatoxina B₁, inhibe la reproducción de las mitocondrias al interferir con la replicación del ADN mitocondrial aunque en este caso no hubo efecto alguno en la síntesis de proteínas en sí (Asahi *et al.* 1969)¹.

En tomates y maíz, se observó desecación y crecimiento reducido cuando se trataron con soluciones de *Aspergillus flavus* (Joffe, 1969)²⁰. Otras investigaciones indican que las raíces de habas *Vicia faba*, tratadas con soluciones de aflatoxinas, muestran alteraciones a nivel de cromosomas (fragmentación), inhibición de mitosis y un aumento en la frecuencia de anafases anormales (Lilly, 1965)³².

Investigaciones de microscopía electrónica han demostrado efectos similares a los que se pueden encontrar en células de vegetales, el efecto más relevante de este tipo es sin duda el incremento de cuerpos grasos en la célula. La aflatoxina B₁ actúa como un antimetabolito que se une al ADN e interfiere con la biosíntesis de ARN (Crisan, 1973)⁷.

- Otros efectos de las aflatoxinas sobre granos a nivel de estructura celular son:
- Reducción del número de ribosomas.
 - Inhibición de la formación de la grana en cloroplastos.

4.2 Efectos de las aflatoxinas en animales. (Giralt, *et. al.*, 1989)¹⁷

El efecto de las aflatoxinas sobre los animales es muy variable, dependiendo de varios factores dentro de los cuales tenemos: la edad, sexo, especie, estado nutricional, dosis ingerida, frecuencia de ingestión, y composición de la dieta.

El tipo y la intensidad de la respuesta también varían incluso entre individuos de una misma especie. Los individuos pueden presentar síntomas que van desde la irritación de las mucosas intestinales hasta intoxicaciones severas que traen hemorragias internas, vómitos, diarreas, o bien daños crónicos como son la cirrosis, el cáncer en hígado o hepatoma y los daños teratógenos, que traen malformaciones en fetos. El Síndrome de Reye, en niños del sureste asiático, también se asocia a las aflatoxinas y se manifiesta por ictericia (amarillamiento), hígado graso y otros daños hepáticos.

Se sabe que existen diferentes formas de intoxicaciones y las aflatoxinas dan síntomas distintos en cada una de éstas.

De este modo, si se da una intoxicación en forma **subaguda** sobreviene la muerte súbita del animal afectado por coagulopatía diseminada y fracaso hepático. La forma aguda viene acompañada con procesos patológicos que pueden afectar diversos órganos y sistemas, evolucionando hasta la muerte, la curación total o la cronicidad. La forma **subclínica**, que es asintomática, es la forma más frecuente y la de mayor importancia por las grandes pérdidas económicas que produce afectando a los animales domésticos:

- Bajo índice de conversión.
- Menor ganancia diaria de peso.
- Disminución de la producción de huevos y leche.
- Descenso en la tasa de fertilidad.
- Aumento en el número de abortos y nacimiento de crías débiles.
- Descenso en la tasa de incubación de huevos de gallina.
- Disminución de la tasa de anticuerpos de resistencia.
- Menor resistencia a enfermedades.

En general, se le llama **aflatoxicosis** a la enfermedad causada por la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas. Las aflatoxinas afectan principalmente al hígado, causando daños que van desde degeneración de hepatocitos, proliferación de conductos biliares hasta necrosis hemorrágicas (Purchase, 1968)⁴².

**Tabla I: Dosis letal media (DL₅₀) de la aflatoxina B₁ en animales.
(Giralt, et.al. 1989¹⁷ y World Health Organization, 1979⁶³)**

ESPECIE	DL ₅₀ (p.o., dosis única, mg/kg de peso corporal)
Patito	0.3 - 0.6
Cerdo	0.6
Trucha	0.8
Perro	1.0
Cobayo	1.4 - 2.0
Oveja	2.0
Mono	2.2
Rata	5.5 - 17.9
Pollo	6.3
Caballo	1.4
Ratón	9.0

p.o. = Indica que la dosis fue suministrada por vía oral.

DL₅₀ = Dosis letal que mata a la mitad (50%) de los organismos que están en contacto con ella.

Con relación a estos datos de dosis letal media, se muestran como constan en las publicaciones sin embargo los datos de toxicidad en pollo y trucha los consideramos muy altos, debido a que son los animales más susceptibles a daño por aflatoxinas.

En la aflatoxicosis, se ven disminuidos los niveles plasmáticos de las enzimas de síntesis de ácidos grasos y lípidos, disminuye la tasa de excreción de lipasa pancreática y la velocidad del transporte lipídico. Todas estas alteraciones metabólicas tienen como consecuencia la acumulación de grasa en el hígado y la aparición de un síndrome de mala absorción que disminuye el crecimiento de los animales (Doerr, 1974; Hamilton, 1975; Howart, 1976; Wei, 1968)^{10,19,24,59}.

Las aflatoxinas interfieren con los mecanismos de coagulación sanguínea al afectar a los componentes de la vía extrínseca y común entre ellos, a la protrombina. Aumenta la fragilidad capilar y disminuye la resistencia de los tejidos protectores que circundan a los vasos por el aumento en la actividad de las enzimas lisosómicas que son las que degradan los componentes intra y extracelulares de este tejido (Tung, 1970)⁵⁴. Las consecuencias que traen consigo estas alteraciones son: coagulopatías generalizadas, susceptibilidad a las hemorragias espontáneas y aumento en el tiempo de sangrado (Tung, 1971)⁵⁵.

En el caso de gallinas durante la aflatoxicosis la producción de huevos se reduce al disminuir los niveles de calcio plasmático. Aún en el caso de que no se detecten alteraciones en la producción, los huevos pierden su potencial de incubación. La aflatoxicosis también provoca una alteración en la digestión de las proteínas y la absorción de los aminoácidos por lo que el requerimiento proteico de las aves aumenta, se retrasa el crecimiento al disminuir la síntesis de ADN, ARN y proteínas en los ribosomas (Smith, 1982)⁴⁸.

En el caso del ganado vacuno, la producción de leche cae drásticamente y en ella aparece aflatoxina M₁, que procede del metabolismo de la aflatoxina B₁. La aflatoxina M₁ es altamente cancerígena y resiste la pasteurización, esto supone un riesgo a la salud pública. Se sabe que la tasa de excreción de aflatoxina M₁ en la leche es el 1 % de la aflatoxina B₁ ingerida por el animal (Van Egmond, 1983; Masri, 1969.)^{58,38}.

También se reduce la concentración de vitamina A en hígado y en sangre, tanto en aves como en ganado vacuno y porcino, y aunque se administren dosis masivas de esta vitamina no se logra reducir la mortalidad de las aves (Yen & Hamilton, 1979)⁶³. Otro dato interesante en cuanto a la estructura de la vitamina K es que al igual que las aflatoxinas tienen anillos cumarínicos; en este sentido, se ha sugerido que las aflatoxinas interfieren en el metabolismo de la vitamina K al competir quizá, por sitios de las enzimas encargadas de este proceso, ahora bien, aunque en los estados de coagulopatía los niveles de protrombina, que es un factor de coagulación dependiente de la vitamina K, está disminuida, no se sabe de alguna relación entre los niveles de vitamina K y protrombina durante la aflatoxicosis (Doerr, *et. al.*, 1978; Hagler & Hamilton, 1982)^{11,18}.

La deficiencia de la vitamina B₁ (Tiamina) protege a los animales de los efectos de las aflatoxinas, debido quizá a que la falta de vitamina moviliza la reserva lipídica o bien, a que se interfiere con el metabolismo hepático de las aflatoxinas (Hamilton 1974)²⁰. En cambio, la deficiencia de vitamina B₂ (Riboflavina) aumenta la sensibilidad del animal hacia los efectos de las aflatoxinas debido quizá, a que la ausencia de vitamina impide al animal detoxificar sus sistemas (Patel & Pavar, 1974)⁴⁰.

La aflatoxicosis produce interferencias graves con los mecanismos del sistema inmune; estas interferencias se producen en todos los niveles del mecanismo inmunitario: motilidad, fagocitosis, reconocimiento del antígeno, producción de anticuerpos, complemento e interferon (Giambone, 1978. Pier, 1979)^{18,41}.

También se ha encontrado relación entre la aflatoxicosis y un síndrome de infertilidad en cerdos que se caracteriza por fracasos en la inseminación, abortos y alta mortalidad entre los lechones lactantes (Hamilton, 1982. Capdevila, 1980)^{21,8}.

Efectos posteriores de la aflatoxicosis son las lesiones renales, su aparición tardía, sugiere que los causantes son los derivados de las aflatoxinas y no las aflatoxinas en sí. Se produce necrosis de los túbulos proximales, separación de epitelio, exudación granular y congestión de los vasos sanguíneos intersticiales (Austwick, 1983. Madhavan, 1967)^{2,34}.

Essigman¹³ y Lin³³ en 1977 con trabajos paralelos, establecen que el 15,16-dihidro-16-[N7-guanidil], 15-hidroxi aflatoxina B₁, es el producto principal de la hidrólisis ácida del aducto aflatoxina B₁-ADN o aflatoxina B₁-ARN. Estos aductos se formaron en el hígado de ratas *in vivo*. La unión covalente de la aflatoxina B₁ con la guanina es capaz de inducir mutaciones "frame shift", es decir que al intercalarse la aflatoxina B₁ junto hace que el mecanismo de sustitución de bases se altere produciendo la pérdida de una base en la secuencia de ADN o ARN (Figura 2).

5. Bodega "Las Yescas" de Tamaulipas.

El Estado de Tamaulipas (Fig.6) tiene una alta incidencia de aflatoxinas en maíz tanto en campo como en almacén.

La Bodega Rural "Las Yescas" se encuentra en la localidad de Valle Hermoso en el Estado de Tamaulipas (Fig.7). Esta bodega es de gran importancia, dado que en ella se almacenó todo el maíz contaminado por aflatoxinas de los años 1989 a 1992, y se ha dejado a la intemperie por este tiempo.

Existieron en este lugar, que está a la intemperie, enormes montículos de maíz contaminado, (60,000 toneladas) a la intemperie aunque la cantidad de maíz que se encuentra almacenado actualmente no se conoce con exactitud, son alrededor de 5,000 toneladas al aire libre. Las restantes 55,000 toneladas se han cribado y comercializado.

Con objeto de resolver este problema se decidió enterrar dicho maíz con maquinaria agrícola ya que la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) prohibió quemar dicho grano porque las esporas se diseminaban en toda la región.

Posteriormente, y en contra de toda reglamentación, se trató de vender este grano a Estados Unidos, a través de una agencia comercializadora norteamericana y una vez en la frontera fue rechazado por la FDA (Food and Drug Administration) y lo regresaron a México, a "Las Yescas" nuevamente.

Han habido muchas quejas de las granjas circundantes a este lugar debido a que se han muerto gran cantidad de aves y parece ser debido a que las aflatoxinas de esta bodega han contaminado los mantos freáticos y causado el problema, al subir hacia el agua de los pozos.

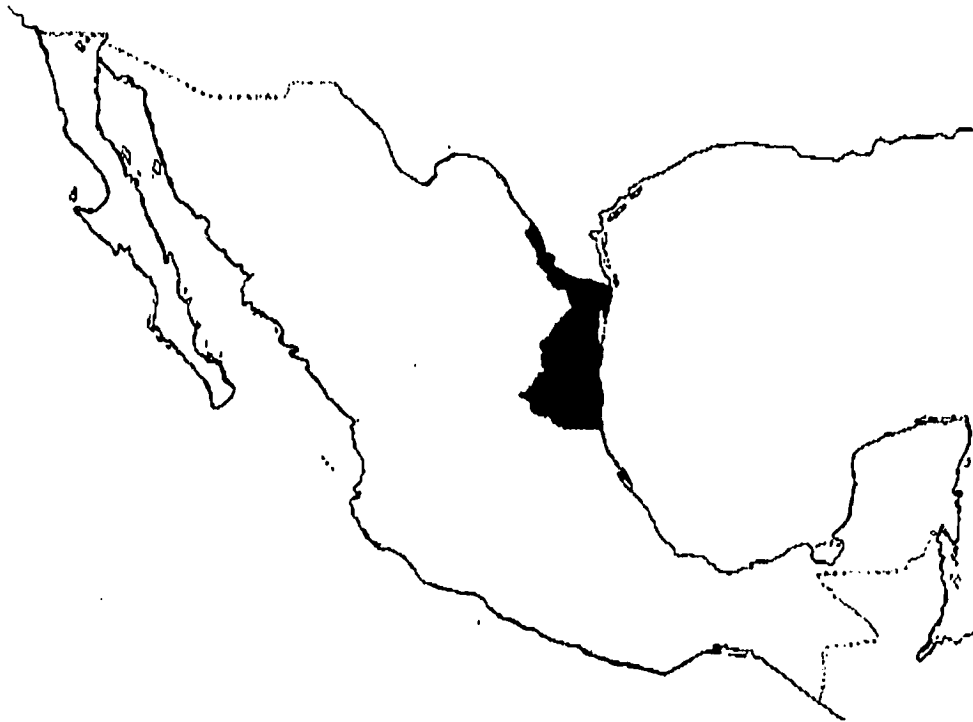


Figura 6: Localización del Estado de Tamaulipas en México.

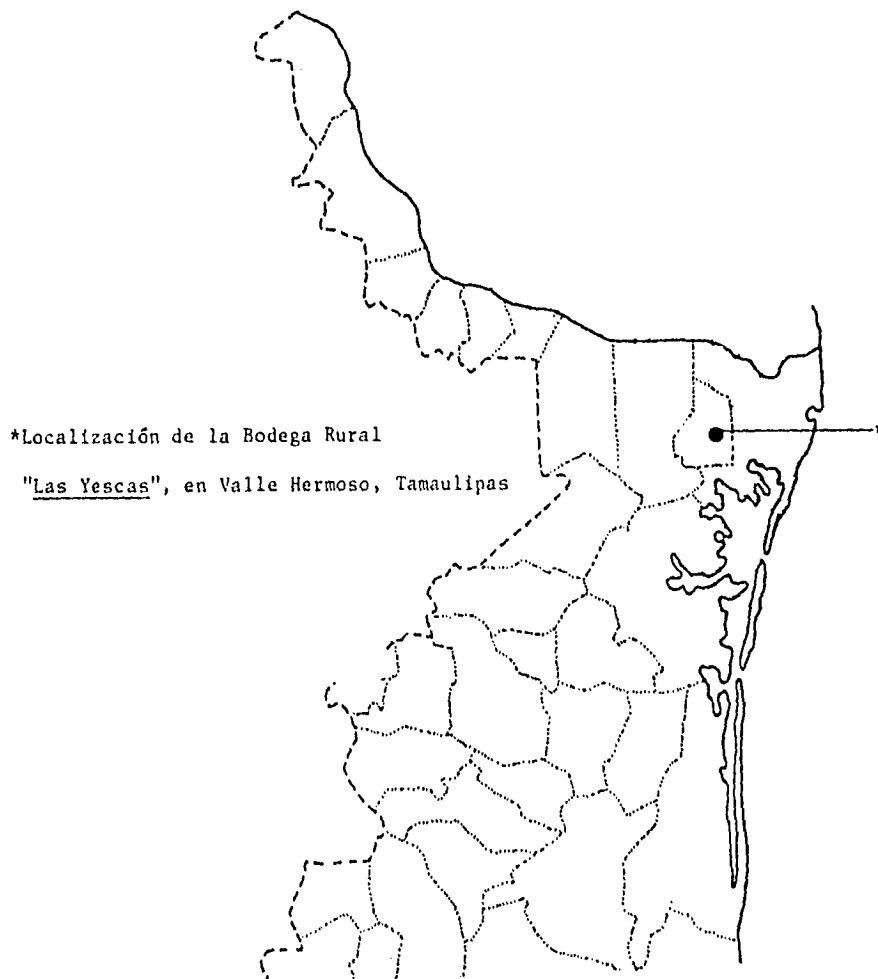


Figura 7: Localización de la bodega rural "Las Yescas" en el Estado de Tamaulipas.

6. Biología del género *Aspergillus*.

Este género de hongos es de gran importancia dadas sus implicaciones en salud vegetal, animal y humana. Comprende las dos especies que producen la mayor cantidad de aflatoxinas que son: *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*.

A. flavus y *A. parasiticus* producen contaminación de las semillas a nivel de campo y crecen en forma de saprófitos en los desechos de las cosechas que se encuentran en los suelos de cultivo. Una fuente más de contaminación primaria suelen ser los esclerocios de *A. flavus*, que se forman en los granos dañados y sanos de maíz (Figura 8).

Resulta importante identificar a las principales especies productoras de aflatoxinas, que al pertenecer al mismo género, comparten muchas características. Sin embargo, estas dos especies pueden ser identificadas por medio de análisis morfológicos y químicos.

La producción de aflatoxinas en maíz es casi exclusiva de *A. flavus*, esta especie también es dominante en algodón y nueces; mientras que *A. parasiticus* ha sido aislado con más frecuencia de cacahuete (Krogh, 1987)³⁰

Aspergillus flavus, (Diener & Davis, 1987)⁹ produce en el maíz únicamente aflatoxinas del tipo B₁ y B₂. Una diferencia importante entre las dos especies es la producción por parte de algunas cepas de *A. flavus* de ácido ciclopiazónico además de las aflatoxinas, por el otro lado la producción de este metabolito no se ha reportado para *A. parasiticus*.

Los mismos autores han caracterizado a *A. flavus* como un hongo proteolítico, (es decir, que posee enzimas llamadas proteasas, capaces de degradar y utilizar fuentes proteicas) y al hongo *A. parasiticus* como lipolítico, (es decir, que posee enzimas llamadas lipasas capaces de degradar y utilizar fuentes lipídicas) (Tabla 2).

En los Estados Unidos, se considera comúnmente que la especie productora de aflatoxinas predominante en el maíz es *A. flavus*, que produce aflatoxinas B₁ y B₂ y también se considera a *A. parasiticus*, como la especie usualmente responsable de la producción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en cacahuates (maní).

Algunos investigadores no están de acuerdo con lo anterior e incluyen la presencia de *A. parasiticus* (y por consiguiente la de todos los tipos de aflatoxinas) en maíz (Mirocha & Christensen, 1983)³⁸.

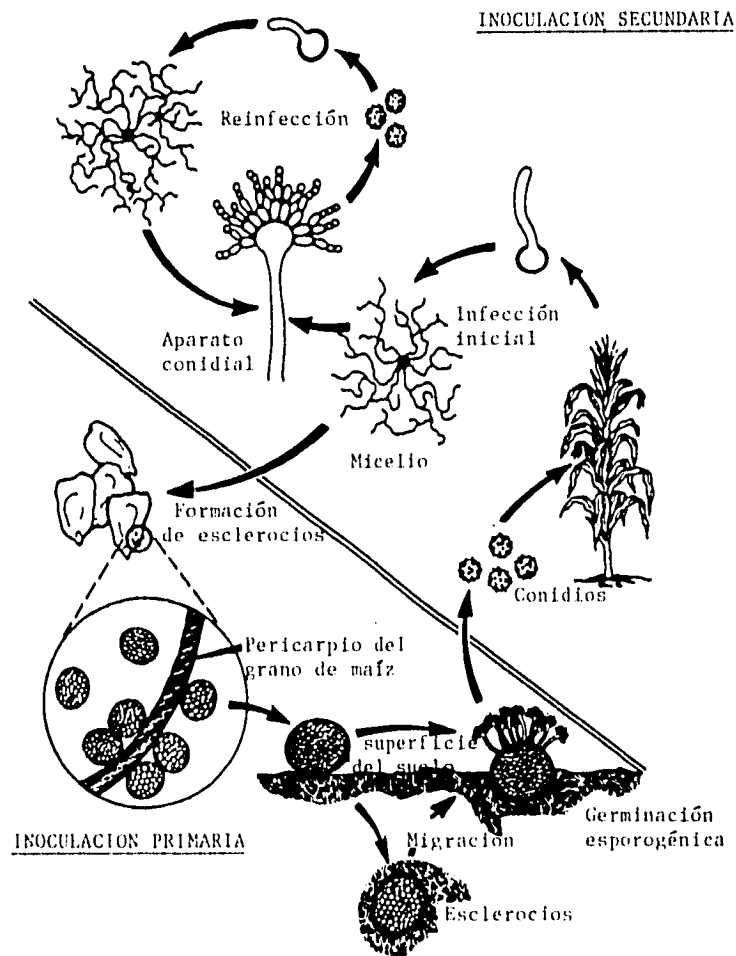


Figura 8: Ciclo de vida de los hongos del género *Aspergillus* (Tomado de Diener and Davis, 1987)⁹.

Tabla II: Características diferenciales entre *A. flavus* y *A. parasiticus* (Diener & Davis, 1987)⁹.

Características diferenciales	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Arreglo del esporangio.	Biseriado	Mixto, generalmente uniseriado.
Conidio	De liso a ligeramente rugoso	Claramente verrucoso
Color de la colonia	Verde amarillento (limón)	Verde hiedra (bandera)
Superficie de la colonia	Irregular	Compacto
Análisis químico	AFB ₁ + AFB ₂ + ác. ciclopiazónico	AFB ₁ + AFB ₂ + AFG ₁ + AFG ₂ + AFM ₁
Características metabólicas	Proteolítico	Lipolítico

Otras características taxonómicas importantes que se deben considerar al intentar diferenciar especies tan cercanas como *A. flavus* y *A. parasiticus*, son el crecimiento en placas de agar, es necesario que las cepas a comparar crezcan en las mismas condiciones que en este caso se consideran las siguientes (Raper, 1965)⁴³ :

- **Composición del sustrato.**

Los diferentes sustratos o fuentes de nutrientes en los distintos medios de cultivo, pueden afectar sobre todo la forma y color de las colonias, así como en la velocidad de crecimiento y durabilidad de la cepa. Es necesario utilizar medios de cultivo selectivos, es decir que contengan sustancias que inhiban microorganismos que no son de interés y que permitan el crecimiento casi exclusivo de las especies que se deseen aislar. El medio de Malta-Sal-Agar acidificado, se utiliza comúnmente para el aislamiento de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que resisten una alta concentración de sal en el medio y condiciones de pH hasta 3.5.

- **Temperatura de incubación.**

Es importante que todas las colonias a estudiar crezcan en el mismo rango de temperaturas, ya que los organismos crecen a distintas velocidades de acuerdo con la temperatura de incubación, esto afecta el tamaño y etapa de desarrollo de las colonias a estudiar.

- **Edad del cultivo.**

Los organismos cambian sus formas a medida que se desarrollan, son distintos en la fase de crecimiento respecto a la adulta. Es conveniente trabajar con cultivos jóvenes, con estructuras identificables y que se encuentran presentes todas las etapas de desarrollo en una misma colonia.

- **Color de las partes aéreas.**

Incluyendo el micelio vegetativo, las cabezas conidiales y esclerocios, el color de cada especie varía en tonalidad dependiendo del medio de cultivo y de la edad. En cuanto a la morfología, el color tamaño, forma y arreglo de estas partes son características de la especie o de un grupo. Las de *A. flavus* usualmente muestran una variabilidad característica en tamaño, forma y son amarillo verdosas; mientras que las colonias de *A. parasiticus* son muy parecidas en tamaño y forma pero el color es más oscuro apareciendo generalmente con un color verde bandera.

- **Diámetro de crecimiento de la colonia.**

En condiciones específicas, en un mismo medio, el tamaño de la colonia difiere de una especie a otra. Es un parámetro de diferenciación entre colonias muy parecidas de especies muy cercanas entre sí. Si se obtienen crecimientos de distintos tamaños en las mismas condiciones podemos sospechar que se trata de especies distintas.

7. Importancia de la tesis.

Siendo las aflatoxinas potentes mutágenos y cancerígenos, su presencia en el maíz representa un peligro para la salud tanto de animales como de humanos. El maíz de "Las Yescas" se ha utilizado para forraje y la fabricación de licores para humanos, de aquí la importancia de investigar su estado sanitario; la realización de este proyecto es de gran importancia para el gobierno del Estado de Tamaulipas, para la Secretaría de Salud y para otras instancias gubernamentales y privadas.

Los datos de este trabajo ayudan a conocer los niveles de contaminación del maíz de la bodega rural de "Las Yescas", así como la biología del hongo que las produce. Al aportar nueva información, y por tanto, conocer el problema más a fondo se puede calcular el posible daño o peligro por el consumo de este maíz y al proporcionar esta información a la Secretaría de Salud, se ayuda a que la población de México consuma alimentos sanos. Al realizar la identificación del hongo que contamina el maíz almacenado en la Bodega Rural "Las Yescas" en el Estado de Tamaulipas determinamos el tipo de aflatoxinas presentes en dicho maíz. Como se sabe, el maíz es considerado como la base de la alimentación de la mayor parte de las personas en México, y se consume principalmente en forma de tortillas. La cantidad de maíz que se consume por lo tanto es inmensa sin contar lo que se utiliza para la alimentación animal. Un problema de contaminación en el maíz es pues un grave problema de salud pública a nivel nacional. Conocer a fondo las causas del problema, nos llevará a poder defendernos mejor.

Ahora bien, existe una problemática paralela a la determinación de aflatoxinas, la cuestión es la utilización incorrecta que se practica actualmente por los laboratorios encargados de la determinación de aflatoxinas dependientes de CONASUPO. Se usan los estándares y la calibración de la marca Aflatest siguiendo la metodología y utilizando las columnas de la marca Biocode.

Esto se debe en parte a que los fabricantes no indican la correlación de la cantidad de sulfato de quinina que usan para cada estándar, con la cantidad de anticuerpos de cada columna. En un principio se utilizaban las columnas y la metodología de Aflatest, luego cuando se decidió cambiar la marca de las columnas, no se contó con los estándares de Biocode con quien correlacionar los anticuerpos de dicha columna y se decidió usar la calibración y los estándares Aflatest usados hasta ese momento. En esta tesis, se resuelve este problema de calibración ya que después de varios experimentos con ambos estándares, se llega a una gráfica de equivalencia entre ambas.

II. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- a. Conocer la biología del hongo del género *Aspergillus* presente en la mencionada bodega y detectar si aún está vivo después de tanto tiempo.
- b. Realizar un estudio químico y de microscopía óptica y electrónica de barrido del hongo para identificar taxonómicamente la especie de *Aspergillus spp.* productora de aflatoxinas en dicha bodega.
- c. Determinar los tipos y niveles de aflatoxinas presentes en muestras de maíz de dicha bodega y concluir sobre la seguridad de su utilización.
- d. Resolver el problema de calibración del fluorómetro con las 2 marcas de estándares que existen (Aflatest y Biocode).

III. MATERIALES Y METODOS

1. Obtención de la cepa del hongo.

a. Medios de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó para aislar cepas de *Aspergillus spp.* fue "Agar con extracto de malta" (MSA) de la casa comercial Bioxon cuya formulación para 1000 ml de medio líquido es la siguiente:

Sustancia	Gramos por litro de medio
Extracto de malta	12.75
Dextrina	2.75
Glicerina	2.35
Peptona de gelatina	0.78
Agar-agar	15.00
Agua destilada	completar a un litro
pH final	4.6 +/- 0.2

A este medio comercial le fueron añadidos 75 g de cloruro de sodio por cada 1000 ml de agua para lograr un medio con una mayor especificidad y selectividad hacia *Aspergillus spp.* que es el organismo que nos interesó aislar (Tuite, 1969)⁵².

b. Condiciones de esterilización.

Esterilización del medio de cultivo:

Se preparó el medio de cultivo de malta sal agar con la composición arriba mencionada y se esterilizó en un autoclave marca American Esterilizer Company a condiciones de 110°C y 20 libras de presión durante 20 minutos.

Esterilización de cajas de Petri :

Se esterilizaron 20 cajas de Petri de vidrio marca Pyrex en un horno eléctrico marca Despatch Oven a 180 °C por 1 hora. Después se enfriaron dentro del mismo horno apagado.

Se vació el medio de malta sal agar en las cajas de Petri estériles y éstas se incubaron a 28°C durante dos días para comprobar su buena esterilización.

El medio se vacía dentro de las cajas de Petri estériles utilizando una campana de flujo laminar para evitar al máximo una posible contaminación.

Además se esterilizaron 10 cajas de Petri con el papel filtro (microfibras de vidrio) colocado dentro de ellas para la obtención de la cepa sobre papel filtro.

c. **Obtención de cepas a partir del grano de maíz sobre papel filtro.**

Se esterilizó agua destilada con el objeto de utilizarla en la obtención de la cepa sobre papel filtro.

Las cajas petri con el papel filtro estériles sirven como cámaras húmedas, una vez estériles, las cajas con papel filtro se dejaron enfriar en el mismo horno apagado. Ya frías, sobre el papel se colocaron los granos de maíz de "Las Yescas" y agua destilada estéril suficiente para humedecerlo (+/- 3 ml.).

Con objeto de conocer si los hongos están por fuera o por dentro del grano de maíz, se procedió de dos modos: el primero fue colocar el grano de maíz en forma directa sobre el papel y el segundo fue desinfectar el grano de maíz con hipoclorito de sodio (1:2 v/v con agua destilada) dos veces por un minuto cada vez y después se lava el grano otro minuto con agua destilada antes de colocarlo sobre el papel filtro.

La colocación de los granos de maíz y del agua estéril sobre el papel filtro se realizó bajo la campana de extracción, colocando de 1 a 5 semillas de maíz de "Las Yescas" en cada caja.

El número de semillas se determina de acuerdo al "tipo" de maíz que se esté inoculando, de modo que del maíz negro sin cribar y sin tratamiento con hipoclorito se sembró solo una semilla y del maíz cribado y tratado con hipoclorito de sodio se sembraron 5 semillas por caja ya que en el primer caso esperamos una mayor cantidad del hongo que en el segundo caso.

Las cajas se colocaron en el cuarto de incubación que se encontraba a una temperatura de 25 °C y permanecieron ahí por 4 días.

De este modo se presenta el desarrollo de hongos en condiciones pobres en nutrientes, lo que permite obtener un crecimiento moderado. Una vez que se observó crecimiento fungal, con la ayuda de una asa micológica se sembraron en cajas con MSA, para desarrollarlos e identificar las colonias de *Aspergillus spp.*

d. **Obtención de cepas a partir de muestras de tierra y maleza.**

Se analizaron muestras de tierra de "Las Yescas", tomadas a 30 cm. de profundidad del suelo, ya que en 1990 se mezcló con arado de tractor al maíz contaminado con la tierra, pues se consideró que este tratamiento iba a descontaminar a las aflatoxinas del maíz. Se analizaron las muestras de tierra para ver si se encuentra el hongo a 30 cm de profundidad y en la superficie, y si dichas muestras tienen aflatoxinas después de 3 años.

Se obtuvieron muestras de malezas del terreno en que se enterró el maíz, y se analizaron para ver si tenían aflatoxinas, o bien a cepas de *Aspergillus spp.*

Para aislar cepas de *Aspergillus spp.* de las muestras arriba mencionadas se procedió de la siguiente manera:

1. En el caso de las muestras de tierra, se realizaron diluciones 1:1000 y 1:10,000, utilizando para ello agua esterilizada. Las muestras foliares de maleza se cortaron a un tamaño aproximado de 3 mm trabajando siempre bajo campana de extracción.
2. Se vacían 1 ml de cada una de las diluciones de tierra en distintas cajas de Petri con malta-sal-agar. El tratamiento para las muestras de maleza fue colocar de 3 a 5 cortes en el medio en condiciones de esterilidad.
3. Las cajas inoculadas se incubaron a 28 °C durante 72 horas para observar el crecimiento de las colonias de hongos.
4. Las colonias se seleccionaron de acuerdo con las características de *Aspergillus spp.* y con base en las observaciones al microscopio.
5. Las colonias seleccionadas se sembraron en nuevas cajas con malta-sal-agar, utilizando esta vez una caja para cada colonia seleccionada.

Se observaron e identificaron las diferentes estructuras del hongo: esporangios, conidios, vesículas, esterigmas, esclerocios, micelio, etc., pues la presencia de esclerocios nos indicará un estado de resistencia del hongo, en el que éste puede sobrevivir hasta 7 años o más.

2. Pruebas de identificación del hongo.

a. Prueba bioquímica para la identificación de cepas lipolíticas.

La prueba bioquímica permite distinguir cepas lipolíticas de las que no lo son y de este modo tener otro criterio para distinguir *A. flavus*, ya que esta especie no es lipolítica.

Para llevar a cabo esta prueba es necesario preparar un medio de cultivo que contenga uno o más reactivos que permitan identificar cepas lipolíticas. En este caso, el reactivo es la tributirina, a partir de su degradación se producen halos transparentes alrededor de las colonias de las cepas que tengan actividad lipolítica, en contraste con el resto del medio que se mantiene turbio. Es importante que el medio no contenga otro lípido en su composición, ya que se trata de que el hongo metabolice la tributirina y no una fuente lipídica alternativa, para poder caracterizarla como lipolítica.

Para estas pruebas se prepara un medio de cultivo con la siguiente fórmula. Según la composición del medio de Merck "Agar tributirina".

Sustancia	Gramos por litro de medio
Peptona de carne	2.5
Peptona de caseína	2.5
Extracto de levadura	3.0
Agar-agar	12.0
Tributirina	10.0 ml
Agua	completar a 1 litro

El medio se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se esterilizó en autoclave a 110 °C y 10 libras de presión durante 20 minutos.

Una vez inoculado el hongo con asa, se incubó por 72 horas en condiciones de temperatura óptima (28°C). Las colonias lipolíticas muestran halos claros en contraste con el resto del medio de cultivo turbio.

b. Estudio de microfotografía.

El objetivo de este estudio fue tener una prueba confirmativa de identificación del hongo que se logró aislar.

Las microfotografías de microscopio óptico se sacaron a $60 \times 15 \times 1.5 = 1350$ aumentos. Las de microscopía estereoscópica fueron de $10 \times 2 = 20$ aumentos (Figura 12).

Se realizaron varias preparaciones frescas con agua, a partir de colonias jóvenes con el objeto de sacar microfotografías de las diferentes estructuras asexuales del hongo *Aspergillus spp.* como son el micelio, conidios, esterigmas, vesículas, etc.

El proceso al que se sometieron las muestras para la obtención de las microfotografías en el microscopio electrónico se divide en varias etapas:

i) Fijación:

La fijación consiste en preservar los tejidos para que sea posible su observación en el microscopio electrónico ya que no se puede observar material vivo. La calidad de la preservación está dada por el grado de "estabilización" que proporcionen los agentes fijadores. En la actualidad, para obtener imágenes con una mayor información y detalle, se utiliza el proceso de doble fijación, que consiste en tratar el material sometiéndolo a la acción de dos agentes fijadores: **glutaraldehído y tetraóxido de osmio**.

El glutaraldehído produce puentes transversales entre las proteínas y las estabiliza, protege el sistema de microtúbulos y fibras, sin distorsionar a los organelos celulares. El tetraóxido de osmio reacciona con una gran variedad de componentes celulares, es soluble en fase acuosa y en fase lipídica y posee una potente inhibición enzimática; además contribuye de manera importante en los fenómenos de "tinción" al permitir la incorporación de átomos pesados.

ii) Deshidratación:

El proceso de deshidratación es importante ya que las resinas que se utilizan en el paso de inclusión no se mezclan con los fijadores que son acuosos, de este modo se debe sustituir al agua por otro disolvente que permita el proceso de infiltración e inclusión. El agente deshidratante más utilizado es el etanol que se emplea en una serie gradual de concentraciones crecientes.

iii) Inclusión:

El proceso de inclusión sirve para proporcionar al tejido la consistencia necesaria (sólida) para poder obtener cortes ultrafinos sin que sufra deformaciones. La inclusión con resina tipo "epoxi" de baja viscosidad también llamada "inclusión de Spurr" (utilizada en este trabajo) aporta varias ventajas, entre ellas es que casi no producen daño a los tejidos durante la polimerización (formación de la red de resina), no subliman durante el bombardeo electrónico protegiendo a las estructuras de la distorsión y tiene una excepcional penetración en todo tipo de tejido.

iv) Microtomía:

Para el caso especial de la microscopía electrónica, se requieren cortes ultrafinos (25 a 90 nm) que se obtuvieron en un ultramicrotomo marca MT8000 que, cuentan con cuchillas de vidrio o diamante de filos muy agudos y fuertes. El mecanismo de los ultramicrotomos que hace avanzar el tejido hacia la cuchilla puede ser mecánico o térmico, el primero hace uso de poleas y engranes y el segundo, aprovecha la propiedad de dilatación térmica de los metales para hacer avanzar al tejido. Actualmente, se cuenta con aparatos que llevan a cabo el proceso de corte de manera automática. Para poder obtener cortes con las características adecuadas se debe cuidar antes de cortar la calidad del bloque de inclusión, el tipo de navaja y filo.

El objetivo primordial de las técnicas de microtomía es la obtención de cortes ultrafinos que tengan suficiente consistencia para soportar el haz de electrones y que sean afines a los colorantes. De este modo, para obtener un rendimiento óptimo en la calidad fotográfica se debe considerar:

El espesor de los cortes, el tipo de tejido incluido, el tipo de vidrio de la navaja (en su caso) y el ángulo de la navaja y de corte, la extensión del corte, las vibraciones, el líquido del recipiente de la navaja (agua), el estiramiento de los cortes, la manipulación y la contaminación entre los más importantes.

v) Tinción:

Los tejidos deben ser teñidos para dar un mejor contraste o bien para contribuir especialmente a los estudios citoquímicos. Existen varios métodos de tinción pero los más aceptados actualmente utilizan el acetato de uranilo, el citrato de plomo y el ácido fosfotúngstico. Al fijar los cortes con el tetraóxido de osmio (N° atómico 190) introduce átomos pesados en los lugares donde reaccionó (principalmente membranas, lípidos insaturados y grupos reactivos de proteínas). La mayoría de los laboratorio utilizan actualmente la combinación de dos colorantes, acetato de uranilo y citrato de plomo, uno después del otro, como método para obtener un mejor contraste.

Técnica usada para la obtención de fotografías en microscopio electrónico (Ureña, 1986).⁵⁰

1. Se fijaron cortes del hongo (tomadas de colonias puras y jóvenes) en glutaraldehído al 2.5 % diluido en Na_2HPO_4 , a un pH de 7.4 por tres horas.
2. Se lavaron los cortes tres veces durante 15 minutos en una solución buffer de cacodilato de sodio (pH = 7.2).
3. Se desechó el buffer de los lavados y los cortes se fijaron ahora con tetraóxido de osmio durante una hora.

iv) Microtomía:

Para el caso especial de la microscopía electrónica, se requieren cortes ultrafinos (25 a 90 nm) que se obtuvieron en un ultramicrotomo marca MT8000 que, cuentan con cuchillas de vidrio o diamante de filos muy agudos y fuertes. El mecanismo de los ultramicrotomos que hace avanzar el tejido hacia la cuchilla puede ser mecánico o térmico, el primero hace uso de poleas y engranes y el segundo, aprovecha la propiedad de dilatación térmica de los metales para hacer avanzar al tejido. Actualmente, se cuenta con aparatos que llevan a cabo el proceso de corte de manera automática. Para poder obtener cortes con las características adecuadas se debe cuidar antes de cortar la calidad del bloque de inclusión, el tipo de navaja y filo.

El objetivo primordial de las técnicas de microtomía es la obtención de cortes ultrafinos que tengan suficiente consistencia para soportar el haz de electrones y que sean afines a los colorantes. De este modo, para obtener un rendimiento óptimo en la calidad fotográfica se debe considerar:

El espesor de los cortes, el tipo de tejido incluido, el tipo de vidrio de la navaja (en su caso) y el ángulo de la navaja y de corte, la extensión del corte, las vibraciones, el líquido del recipiente de la navaja (agua), el estiramiento de los cortes, la manipulación y la contaminación entre los más importantes.

v) Tinción:

Los tejidos deben ser teñidos para dar un mejor contraste o bien para contribuir especialmente a los estudios citoquímicos. Existen varios métodos de tinción pero los más aceptados actualmente utilizan el acetato de uranilo, el citrato de plomo y el ácido fosfotúngstico. Al fijar los cortes con el tetraóxido de osmio (N° atómico 190) introduce átomos pesados en los lugares donde reaccionó (principalmente membranas, lípidos insaturados y grupos reactivos de proteínas). La mayoría de los laboratorio utilizan actualmente la combinación de dos colorantes, acetato de uranilo y citrato de plomo, uno después del otro, como método para obtener un mejor contraste.

Técnica usada para la obtención de fotografías en microscopio electrónico (Ureña, 1986).⁵⁶

1. Se fijaron cortes del hongo (tomadas de colonias puras y jóvenes) en glutaraldehído al 2.5 % diluido en Na_2HPO_4 , a un pH de 7.4 por tres horas.
2. Se lavaron los cortes tres veces durante 15 minutos en una solución buffer de cacodilato de sodio (pH = 7.2).
3. Se desechó el buffer de los lavados y los cortes se fijaron ahora con tetraóxido de osmio durante una hora.

4. Se lavaron los cortes tres veces durante 15 minutos en una solución buffer de cacodilato de sodio (pH = 7.2).
5. Los cortes se deshidrataron utilizando soluciones de etanol al 50%, 70% y 90%, dejando los cortes durante 15 minutos en cada solución luego, los cortes se trataron tres veces durante 15 minutos con etanol al 100% o absoluto.
6. Se colocaron en recipientes con resina de Spurr durante una hora con agitación lenta para que ésta se infiltre en los cortes. La resina Spurr se preparó en el momento con la siguiente composición:

Sustancia	Proporción
Dióxido de vinil ciclohexeno (VCD)	10
Eter diglicídico de propilen-glicol (DER)	6
Anhídrido nonenilsuccínico (NSA)	26
Dimetil aminoetanol (DMAE)	0.4

7. Una vez transcurrido el tiempo de inclusión, se trasladaron los cortes a cubetas que contenían resina y se colocaron en la estufa a 70 °C durante 8 horas para que se formara el polímero.
8. Se sacaron los cortes de la estufa y se cortaron en un ultramicrotomo. Se obtuvieron cortes de 90 a 150 nm de grosor que se colocaron en rejillas de cobre.
9. Se procedió a la tinción de los cortes colocando las celdillas sobre gotas de acetato de uranilo ($C_8H_6O_6U$) al 4 % en agua - etanol (1:1), de modo que los cortes quedaron en contacto con el acetato y se dejaron ahí por 30 minutos. Se lavaron tres veces sumergiéndolos en agua destilada.
11. Se colocaron sobre gotas de citrato de plomo del mismo modo que en el caso del acetato y se dejaron ahí por 5 minutos. El citrato de plomo se preparó mezclando 2.66 g de nitrato de plomo y 3.52 g de citrato de sodio en 60 ml de agua hervida y fría, se agregaron 16 ml de NaOH 1N a la mezcla anterior, aforando a 100 ml.
12. Se repitieron los tres lavados con agua y las muestras estuvieron listas para la observación en el microscopio electrónico.

3. Calibración.

Definición:

Calibración es un término utilizado para denominar al conjunto de operaciones que sirven para hacer que los aparatos de medición adquieran precisión y exactitud en las determinaciones que en él se realicen (Skoog, 1984)⁴⁷.

En el caso del fluorómetro utilizado para la cuantificación de aflatoxinas totales, la calibración adquiere un sentido distinto, ya que lo que se hace es adecuar la escala en la que el fluorómetro interpreta la intensidad de fluorescencia emitida por los estándares de los fabricantes de las columnas ya sean Aflatest o Biocode, pues el método indicado por las compañías citadas es diferente; al cambiar los reactivos utilizados como disolventes y reveladores, además de la cantidad de muestra que se requiere, la intensidad de la fluorescencia y por lo tanto la lectura final de la concentración se ven afectadas.

El fluorómetro debe ser calibrado con la escala que marcan los estándares de sulfato de quinina, Biocode o Aflatest, según la marca de columna y la metodología que se esté utilizando ya que los estándares Biocode, están correlacionados con la cantidad de anticuerpos presentes en las columnas Biocode. Es lógico que se cambie la metodología oficial para utilizarlos, sin embargo, los laboratorios en el Programa de Supervisión de toda la cosecha de maíz de Tamaulipas siguen utilizando estándares Aflatest con sus valores de calibración aunque utilizan columnas y metodología de Biocode.

Se pretende demostrar que existe una correspondencia de las escalas de aflatoxinas totales de ambas marcas de estándares utilizando columnas Biocode para que cambiando sólo la forma de calibrar el fluorómetro, se puedan utilizar los estándares Aflatest de manera indistinta con los Biocode.

Con objeto de poder eliminar las posibles interferencias debido a fluorescencia de los solventes, se recomienda que el estándar 0 o sea el blanco, sea una celdilla de borosilicato con 3 mililitros de metanol puro + 2 mililitros de la solución de revelador que se esté usando, ya sea bromuro de piridinio perbrómico (PBPB 50 mg/litro en H₂O) o bien bromo molecular (1/200 000 en H₂O), de este modo estamos restando la posible fluorescencia debida a unos solventes o reveladores sucios o viejos.

4. Análisis químico.

a. Método Biocode para cuantificación de aflatoxinas totales. (Carvajal, 1994. Comunicación personal)

Este método se basa en la separación de las aflatoxinas por medio de columnas que contienen anticuerpos de aflatoxinas totales obtenidos de cultivos monoclonales, a partir de hibridomas. Los hibridomas son células que resultan de la conjugación de células de bazo, productoras de anticuerpos, con células de mieloma de ratón que tienen gran resistencia y capacidad de reproducción. Los anticuerpos monoclonales reciben ese nombre por provenir de una sola célula o clon que en este caso son los hibridomas.

Los hibridomas conjugan la capacidad de producción de anticuerpo (que proviene de las células de bazo) con la capacidad de reproducción de la célula cancerosa, teniendo así la posibilidad de tener lotes homogéneos de anticuerpo sin tener que depender de las condiciones de variabilidad que representa la obtención de anticuerpos policlonales por métodos tradicionales a partir de ratón, que además de una gran dispersión entre las características del anticuerpo no pueden proporcionar cantidades suficientes para hacer que el costo de estos baje a niveles accesibles.

La técnica de purificación de aflatoxinas por medio de columnas de inmunoadfinidad Biocode, consiste en un rápido y sencillo protocolo de extracción utilizando metanol y agua destilada como solventes y NaCl como agente clarificante, seguida de la separación de aflatoxinas haciendo pasar el extracto por la columna que contiene al anticuerpo, finalmente se eluyen las aflatoxinas de la columna y se determina su concentración con la ayuda de un fluorómetro.

El fluorómetro, relaciona la intensidad de la fluorescencia en la celda que contiene el extracto de aflatoxinas con la concentración de éstas. La relación entre la concentración de aflatoxinas totales y la intensidad de la fluorescencia está dada por la ley de Lambert y Beer que señala que la intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la concentración de aflatoxinas, sólo que en este caso, la potencia de la fuente (P_0) es constante y lo que se "mide" con base en una escala arbitraria (que se selecciona al calibrar el aparato con los estándares), es la intensidad de fluorescencia (P).

Este tipo de métodos (columnas de inmunoadfinidad) pueden detectar hasta partes por trillón de cierto tipo de sustancias, este método en particular está diseñado para detectar concentraciones del orden de partes por billón.

Una de las grandes ventajas que representa este método es la alta selectividad hacia las aflatoxinas evitando así interferencias debidas a otro tipo de sustancias que al igual que las aflatoxinas fluorescan bajo la luz ultravioleta.

El método de extracción de aflatoxinas por inmunoadfinidad en columnas con anticuerpos monoclonales se muestra en la figura 10.

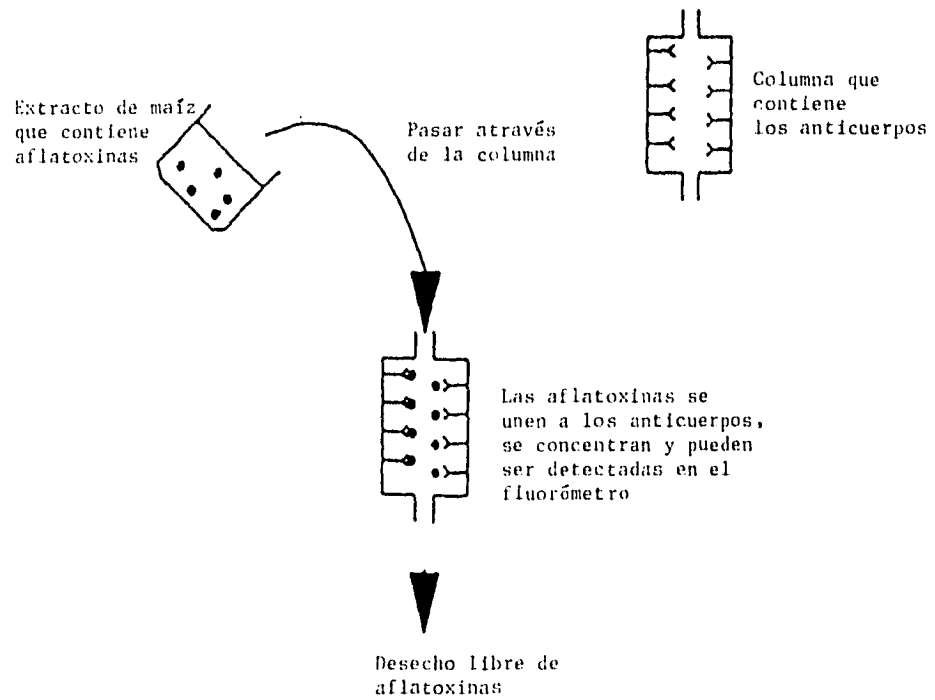


Figura 9: Principio de extracción por inmunoafinidad. Tomado de Biocode "Technical Manual", 1992.



Figura 10: Comparación de las columnas de inmunoafinidad de las marcas **Biocode** y **Aflatest** para cuantificar aflatoxinas totales. Como se puede observar la columna Biocode contiene mayor cantidad de gel con anticuerpos que la columna Aflatest.

a. **Método Biocode (1992).**

1. Se licúan 50 g de maíz de muestra con 5 g de cloruro de sodio y 100 ml de una solución de metanol-agua al 80% (v/v) por dos minutos y después se filtra usando papel Whatman # 1.
2. Se diluyen 3 ml del filtrado con 12 ml de PBS (buffer de fosfatos). Se filtra nuevamente utilizando un filtro de fibra de vidrio y se toman 10 ml de filtrado.
3. Por otro lado, se prepara la columna de inmovilización adicionándole 20 ml de PBS a razón de 5 ml por minuto, se debe tener cuidado de no secar la columna en esta etapa.
4. Ya preparada la columna se aplican 10 ml de la muestra preparada (paso 2) a la columna, a la misma razón de flujo teniendo cuidado de no secar la columna.
5. Se lava la columna usando 20 ml de agua destilada y se seca haciendo pasar aire con la jeringa.
6. Lentamente se eluyen las aflatoxinas de la columna aplicando 1.5 ml de metanol puro recibiendo el eluido directamente en la celdilla. Se seca la columna haciendo pasar aire.
7. Se adiciona 1 ml de solución reveladora de bromo molecular 1:200,000.
8. Se calibra el fluorómetro utilizando los estándares Biocode y se lee en el fluorómetro las partes por billón de aflatoxinas totales en la muestra.

b. **Método de Thomas, Eppley & Trucksess para la determinación de los tipos de aflatoxinas en muestras de maíz.**

Este método fue desarrollado con el objeto de cuantificar aflatoxinas, pero tiene la desventaja de ser costoso, tardado y peligroso. La cromatografía de capa fina utilizada en este método permite la separación e identificación de los principales tipos de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

En este trabajo se utiliza el método de Thomas, Eppley & Trucksess únicamente para la identificación de los tipos de aflatoxinas presentes en el maíz de la bodega rural "Las Yescas", esta determinación sirve como una prueba más de identificación de las aflatoxinas, lo que también determina la especie de *Aspergillus spp.* causante de la producción de aflatoxinas en dicho maíz (ver Tabla II).

De este modo, la presencia de aflatoxinas de la serie 'G' indica la presencia de *Aspergillus parasiticus*. La identificación de los tipos de aflatoxinas se logra al colocar en la placa cromatográfica estándares puros de las distintas aflatoxinas y luego comparando el corrimiento en la placa de los extractos de las muestras contra el corrimiento en la placa de los estándares.

El método de Thomas, Eppley & Trucksess propone un protocolo de extracción que utiliza como solventes el metanol y el cloroformo, seguido a la extracción se realizan varios pasos de purificación que incluyen la separación de los pigmentos entre otras sustancias capaces de interferir con la cromatografía.

Método de Thomas, Eppley & Trucksess para la identificación de aflatoxinas.

1. Se licúan 50 g de maíz, con 250 ml de una solución preparada en una proporción de 60 ml de metanol con 40 ml de agua (por cada 100 ml de solución), a alta velocidad por dos minutos.
2. El licuado se filtra a través de papel filtro Whatman No. 4 y se colectan 125 ml del filtrado en un embudo de separación de 250 ml.
3. Se adicionan 30 ml de una solución saturada de cloruro de sodio y 50 ml de hexano, al embudo de separación y se agita durante un minuto, degasificando el embudo durante la agitación.
4. Se deja reposar para que se separen las fases, después, se transfiere la fase inferior de metanol-agua a otro embudo de separación. La fase orgánica superior se desecha.
5. Para hacer la extracción del metanol acuoso, se añaden 50 ml de cloroformo, se agita y se degasifica durante la agitación.
6. Después de que se separan las fases, la inferior con cloroformo se transfiere a un matraz de 250 ml que contenga 5 g de carbonato cúprico para precipitar los pigmentos, se agita hasta que se complete el mezclado con la sal de cobre.
7. Posteriormente, se deja asentar el carbonato cúprico. En un embudo se colocan papel filtro Whatman No. 2 con 5 g de sulfato de sodio anhidro y a través de esto se decanta el extracto que contiene al carbonato cúprico asentado y el filtrado se colecta en un matraz de 125 ml.
8. El carbonato cúprico que queda en el matraz se lava nuevamente con 25 ml de cloroformo y se decanta a través del sulfato de sodio anhidro colectándose en el mismo matraz de 125 ml.

9. Se evapora el extracto hasta que queda en el matraz aproximadamente 1 ml, éste se transfiere a un frasco vial limpio y se deja evaporar por completo. La temperatura máxima de la estufa debe ser 40°C.
10. En seguida, se resuspende el extracto del vial con 1.5 ml de metanol, se agita en el vórtex durante 1 minuto.
11. Por último, se desarrolla la cromatografía en capa fina, colocando 50 microlitros de muestra en cada carril.

5. Experimentos sobre calibración del fluorómetro.

a. Aspectos técnicos sobre la estructura del fluorómetro (Willard *et. al*, 1978)⁶⁰

Prácticamente, todos los instrumentos de fluorescencia, emplean óptica de doble haz para compensar las variaciones en la potencia de la fuente. El haz de la fuente que generalmente emite radiaciones en el U.V. (ej. lámparas de vapor de mercurio), pasa primero a través de un filtro primario o de excitación que está seleccionado para dejar pasar longitudes de onda de excitación específicas para la sustancia a analizar.

Existen distintos tipos de fuentes de iluminación y cada una de ellas emite distintas longitudes de onda, en el caso de la radiación ultravioleta para fluorimetría generalmente se utilizan lámparas de vapor de mercurio.

Las líneas principales del espectro de emisión en una lámpara de vapor de mercurio están en las posiciones 303, 313, 334, 365, 405, 436, 546, 577/579 nm. Este haz que pasa el filtro primario pasa por una placa de abertura que controla la cantidad de luz que incide directamente en la celda que contiene a la muestra la cual, emite radiación fluorescente (visible) en todas direcciones, pero se observa mejor perpendicularmente al haz de excitación; en esta posición se encuentra el filtro secundario o de emisión que está seleccionado para que sólo pasen aquellas longitudes de onda que corresponden a la máxima emisión fluorescente de las aflatoxinas.

La radiación fluorescente emitida por la muestra llega a un detector fotoeléctrico que convierte la señal de luz en energía eléctrica susceptible de leerse en una escala con registro automático.

El tipo de fluorómetro que se utilizó para este trabajo, funciona de una manera similar, solo que los filtros de excitación y de emisión, son "fijos", de tal modo que solamente permitan el paso de las longitudes de onda que, en el primer caso exciten a las aflatoxinas (223, 265 y 362nm) y en el segundo caso la longitud de onda que es emitida al fluorescer (425nm). Ver figura 11.

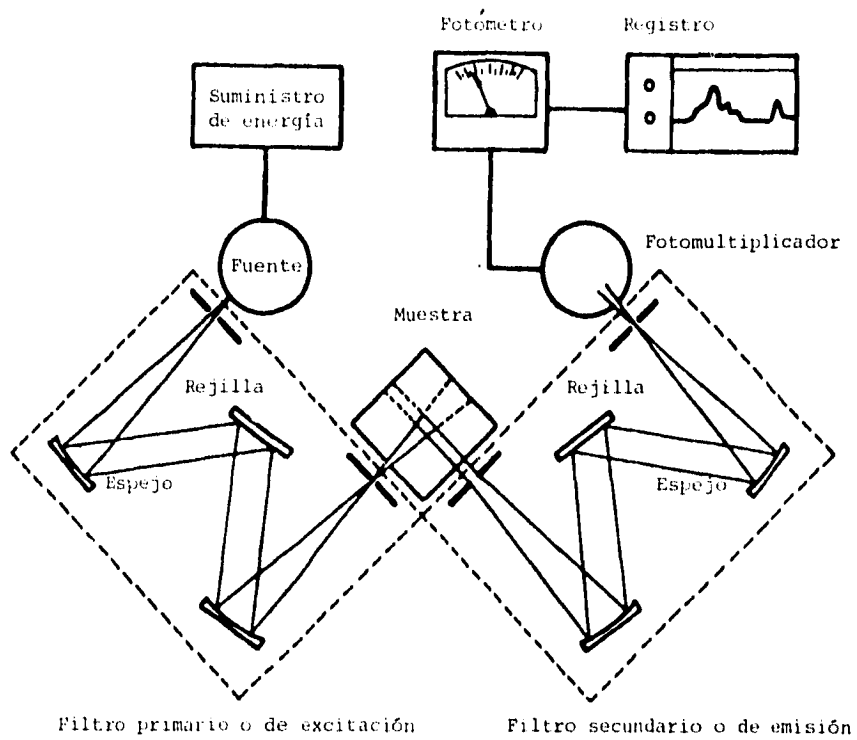


Figura 11: Estructura del fluorómetro. Tomado de Willard, 1978⁰⁰.

b. Significado de la ganancia del fluorómetro:

La ganancia en el fluorómetro es un valor numérico que se puede seleccionar y que significa las veces que la señal será amplificada, de tal modo que los datos se ajusten a los requerimientos de cada técnica. También es útil cuando se está trabajando con sustancias cuyos valores de concentración casi no varien en la pantalla es estos casos se puede seleccionar una ganancia mayor de tal modo que el valor sea "multiplicado" y se puedan apreciar las diferencias de concentraciones evitando "aproximaciones".

Para lograr lo anterior, el fluorómetro cuenta con un dispositivo llamado fotomultiplicador que intensifica la señal de emisión de la muestra, esto permite manejar muestras en un rango de concentraciones muy amplio, ya que la ganancia puede ser ajustada según las necesidades del experimento para obtener en el registrador (pantalla) datos manejables. Es entonces un dispositivo que nos facilita el manejo de los datos numéricos al reportarlos multiplicados o divididos por el valor numérico de la ganancia.

Con objeto de conocer a fondo la calibración y sus implicaciones en la cuantificación de aflatoxinas totales por medio del método de columnas de inmunoafinidad y fluorometría, se realizaron 4 experimentos que a continuación se describen.

En todos los experimentos se utilizó 1 ml de Bromo molecular 1:200,000 en agua como revelador.

c. Experimento 1: Valdez del método Biocode.

A menudo se reportan trabajos sobre nuevas técnicas de cuantificación de muchas sustancias de interés, para que una técnica química sea considerada como valiosa es necesario que demuestre ser rápida, barata y exacta.

Para validar la precisión y exactitud de los métodos en prueba, se utilizan las técnicas de cromatografía de líquidos (HPLC), ya que son las que obtienen los valores más reproducibles y cercanos al valor real.

El objetivo de este experimento es demostrar de una manera muy sencilla, la precisión y exactitud del método Biocode, utilizando los estándares de esta misma marca.

Se usaron extractos puros de maíz con aflatoxinas conocidas y medidas en cromatografía de líquidos (0, 13, 20, 26 y 50 ppb) con los rangos de interés que son los que están alrededor del 20 ppb, que es el límite máximo permitido para separar el maíz "dentro o fuera de norma". Se analizaron estas muestras utilizando la metodología y los estándares Biocode.

Método:

1. Se inoculó el maíz con una cantidad conocida de aflatoxinas (medidas previamente por HPLC), según la metodología y reactivos Biocode.
2. Se calibró el fluorómetro con los estándares Biocode en 0 (verde), 50 (rojo) y 25 (amarillo).
3. Se introdujo la celdilla en el fluorómetro y se obtuvo la lectura de aflatoxinas totales en ppb.

d. Experimento 2: Comparación de métodos con extractos de aflatoxinas medidos en HPLC.

Este experimento ejemplifica lo que ocurre cuando se calibra el fluorómetro utilizando estándares que no corresponden a las columnas y metodología empleada.

Método:

1. Se tienen estándares de aflatoxinas totales con las siguientes cantidades: 0, 13, 20, 26 y 50 ppb medidos en HPLC.
2. Se cuantifican aflatoxinas totales de los estándares utilizando columnas y metodología de Biocode.
3. Se calibró el fluorómetro con 2 diferentes juegos de estándares según las indicaciones correspondientes a cada uno de ellos:
 - +) Los estándares Aflatest a 0 (verde), 13 (amarillo) y 26 (rojo).
 - +) Los estándares Biocode a 0 (verde), 25 (amarillo) y 50 (rojo).
4. Se obtuvieron entonces dos lecturas por muestra (de la misma celdilla) en donde la diferencia en los valores de aflatoxinas estuvo dado únicamente por los estándares que se utilizaron al calibrar el fluorómetro.

e. Experimento 3: Equivalencia de estándares.

En el Programa de Supervisión de aflatoxinas totales en maíz de Tamaulipas, se usó la calibración con estándares Aflatest y el método y las columnas de Biocode durante 1992 y 1993 por lo que se considera de gran importancia hacer una equivalencia de estándares para obtener las mismas medidas de aflatoxinas utilizando el método de Biocode con las dos marcas de estándares.

Para entender mejor lo que significa una variación en la escala de interpretación basta imaginar que se mide una misma distancia con una regla en centímetros y con una regla en pulgadas, los resultados numéricos serán totalmente distintos y es necesario hacer las conversiones a unas u otras unidades para poder comparar los datos. Del mismo modo leer concentraciones de aflatoxinas obtenidas con el método (Biocode) en una escala que utiliza las intensidades de los anteriores (Aflatest) es incompatible y erróneo.

Se realizó un experimento sobre calibración del fluorómetro con dos diferentes tipos de estándares: Aflatest y Biocode, para conocer la "equivalencia" de valores precisa para usar en el futuro con los primeros estándares.

De este modo, el experimento tiene como objetivo encontrar la equivalencia entre los valores de los estándares Aflatest-10 (para cereales) y Aflatest-P (para oleaginosas) con los estándares Biocode que son específicos para el método de cuantificación de aflatoxinas con columnas Biocode.

Método:

1. Fijar el cero usando el estándar verde de Biocode.
2. Fijar en 50 ppb con el estándar rojo de Biocode.
3. Insertar el estándar amarillo de Biocode, la lectura debe dar 25 ppb.
4. Ahora insertar los estándares verde de Aflatest-P y ver la lectura que da, después el estándar rojo obtener la lectura. Realizar lo mismo con Aflatest-10 para obtener la lectura correspondiente.

El experimento se realizó 5 veces con diferentes kits de estándares de cada tipo, para obtener un promedio.

f. Experimento 4: Calibración ajustada.

El objeto de este experimento es comprobar que los valores encontrados en el experimento de equivalencia de estándares, pueden ser utilizados para calibrar el fluorómetro utilizando estándares Aflatest y que, utilizando las columnas y metodología propuesta por Biocode, es posible obtener datos equivalentes a los que se obtienen en HPLC.

Metodología:

1. Se calibra el fluorómetro con los estándares Aflatest ajustando con el vial verde en -10 y el vial rojo en 66.
2. Se miden las muestras de concentración conocida (HPLC**) en las dos diferentes marcas de fluorómetros (Vicam y Sequoia Turner).

** Las determinaciones de las muestras y patrones en el cromatógrafo de líquidos (HPLC), fueron realizadas previo a este trabajo por la Dra. Magda Carvajal en las instalaciones del Instituto de Biología. En este trabajo sólo se utilizaron los datos generados en el cromatógrafo para comparar con determinaciones realizadas en columnas de inmovinoafinidad con los diferentes estándares.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Obtención de la cepa de hongo.

a. Obtención de cepas a partir de grano de maíz sobre papel filtro.

A pesar de que se esperaba lograr el crecimiento más rápido del maíz negro sin tratar, el crecimiento sospechoso (color verde olivo) se obtuvo del maíz cribado sin tratar; esto se debió a que el daño en el maíz negro es tal, que ya no representa un medio nutritivo para el crecimiento de los hongos. Entonces, se tomó el inóculo del grano cribado para aislar al hongo en las cajas de Petri con medio de malta sal agar.

En sólo dos días se obtuvo un crecimiento exitoso en las cajas con el MSA al aislarse colonias puras de *Aspergillus spp.* de color verde típico de *A. flavus*.

El reconocimiento preliminar de las colonias aisladas se complementó con observaciones de preparaciones del hongo teñidas con fuccina ácida al microscopio óptico a 1350 aumentos. Se observaron los conidios, micelia, esterigmas y esporangios apreciándose las formas típicas para *Aspergillus spp.* y en particular el esterigma biseriado típico de *A. flavus* (ver Tabla II), en todas las colonias aisladas.

Se logró asimismo el aislamiento de otro tipo de cepas que se diferenciaron desde las características de crecimiento de las colonias (color, textura, tamaño, forma) en las cajas de petri y se confirmó que se trataba de hongos del género *Penicillium spp.*

b. Obtención de cepas a partir de muestras de tierra y maleza.

Se sembraron un total de 10 cajas petri con MSA con las diluciones de tierra 1:1 000 y 10 cajas con la dilución 1:10 000. Al mismo tiempo, se inocularon 5 cajas de petri con pedazos de maleza cortados en cuadros de 4 milímetros aproximadamente.

El crecimiento incipiente de colonias se observó a las 24 horas de incubación, en este punto no era posible distinguir características de las colonias que se lograron aislar. Pasadas otras 72 horas, las colonias se seleccionaron por su color y forma.

Se aislaron colonias puras con las características correspondientes a *Aspergillus spp.* y en particular con el color verde olivo típico de *A. flavus*.

Junto con el crecimiento descrito arriba, se obtuvieron colonias de un color verde oscuro (botella), las que debido a su diferencia en la apariencia macroscópica (aterciopelada y plana) se descartó como crecimiento de hongos del género *Aspergillus*. Estas colonias se observaron también al microscopio óptico y se apreció que efectivamente no pertenecen al género de interés, sino al género *Penicillium*.

El reconocimiento preliminar de las colonias aisladas se complementó con observaciones de preparaciones del hongo teñidas con fuccina ácida al microscopio óptico a 1350 aumentos. En estas preparaciones se observaron estructuras como conidios, micelio y esterigmas, apreciándose las formas típicas para *Aspergillus spp.* y en particular el esterigma biseriado típico de *A. flavus* (ver Tabla II), en todas las colonias aisladas.

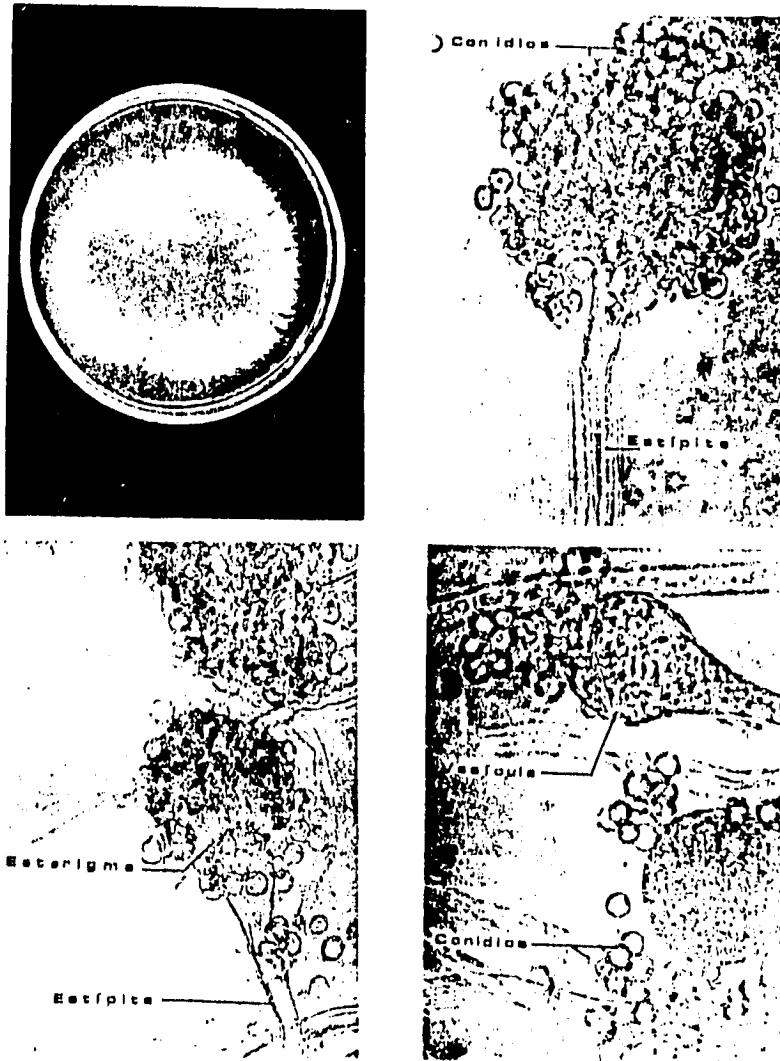


Figura 12: 12 a. Colonia de *Aspergillus flavus* en PDA.
 12 b, 12 c, 12 d. Fotografías al microscopio óptico (60 x 15 x 1.5 = 1350 aumentos).

2. Pruebas de identificación del hongo.

a. Identificación de cepas lipolíticas.

Para detectar cepas lipolíticas y distinguirlas de las que no lo son se inoculó en medio de cultivo con tributirina. En cada una de las cajas se sembraron cuatro diferentes colonias aisladas de la misma fuente: en una caja se sembraron 4 colonias de *Aspergillus spp.* a partir de maíz cribado; en otra caja se sembraron 4 colonias de la tierra y en una caja distinta se sembraron 4 colonias de la maleza.

Todas las colonias sembradas en el medio con tributirina dieron resultado negativo, es decir, ninguna de ellas presentó un halo transparente alrededor de sus bordes después de 72 horas de incubación a 28 °C, quedando el medio de cultivo turbio.

Estos resultados, indican que las colonias de hongo aisladas a partir de grano de maíz, tierra y maleza de la bodega rural de "Las Yescas" son de *A. flavus* puesto que no tienen actividad lipolítica y por lo tanto podemos descartar que se trate del hongo *Aspergillus parasiticus* especie lipolítica (tabla II).

b. Estudio de microfotografía.

Según Raper y Fennell, (1965)⁴³, las esporas asexuales de *Aspergillus flavus* tienen un diámetro que varía de 3.0 a 6.0 μ pero más frecuentemente miden entre 3.5 y 4.5 μ .

Las esporas tienen forma elíptica cuando se acaban de formar pudiendo conservarla así hasta madurar y miden de 3.5 a 4.5 μ de ancho por 4.5 a 5.5 μ de largo. El mismo autor reporta para *A. parasiticus* que las esporas asexuales miden de 3.5 a 5.5 μ de diámetro. Por tanto las esporas no son un criterio taxonómicamente válido ni confiable para poder distinguir entre las colonias de *A. flavus* y las colonias de *A. parasiticus*.

En la tabla III, se observan datos de tamaño de esporas obtenidas a partir de colonias aisladas a partir de maíz cribado de "Las Yescas", en la misma tabla se pueden comparar los datos obtenidos con los datos que reporta Raper⁴³ para las dos especies de *Aspergillus* que nos interesan.

Tabla III. Medición del ancho y largo de las esporas de *Aspergillus spp.* de maíz cribado.

N° de espora	Ancho (micras)	Largo (micras)
1	3.718	5.070
2	2.028	3.380
3	4.225	5.070
4	5.070	5.070
5	3.211	4.225
6	3.380	5.070
7	3.380	4.225
8	3.380	5.070
9	1.690	3.380
10	3.380	5.070
11	3.380	5.070
12	3.211	4.225
13	3.380	5.070
14	2.535	4.225
15	2.535	4.225
16	2.535	2.535
17	3.380	3.380
18	3.380	5.070
19	3.380	4.225
20	3.380	4.225
PROMEDIO**	3.230	4.390
* <i>A. flavus</i>	3.5 - 4.5	4.5 - 5.5
* <i>A. parasiticus</i>	3.5 - 5.5	3.5 - 5.5

* Datos tomados de Raper y Fennell (1965).

** Datos obtenidos en la presente tesis.

No es concluyente hacer la diferenciación de la especie basándose en el tamaño y forma de las esporas asexuales, debido a que las medidas de las esporas son similares y dependen de la madurez de ellas y el tamaño de las esporas asexuales puede variar con la edad y el desarrollo del conidio que cambia de forma de elíptica a esférica (Raper & Fennell, 1965)⁴³.

Sin embargo, los resultados obtenidos indican que las esporas de la colonia aislada de maíz cribado pertenecen al hongo *A. flavus* en una fase temprana de desarrollo lo cual es congruente con el hecho de que las muestras se tomaron de la parte externa (en donde las estructuras asexuales son jóvenes en relación con las del centro) de una colonia joven. Por otro lado, la forma de las esporas es elíptica en casi todos los casos y Raper reporta que las esporas de *A. parasiticus* son esféricas en todas sus fases de desarrollo.



Figure 13: Microfotografías en el microscopio electrónico de los hongos obtenidos.
 13 a. Corte de hifa y conidios (6,000 aumentos).
 13 b. Detalle de un conidio (10,000 aumentos).
 13 c. Células de esterigma (6,000 aumentos).
 13 d. Detalle de células de esterigma (10,000 aumentos).

3. Experimentos sobre calibración del fluorómetro.

Se presentan y discuten a continuación los resultados de los cuatro experimentos de calibración descritos en la metodología, realizados todos con el fluorómetro Sequoia Turner excepto en el experimento 4 en donde también se utilizó un fluorómetro de la marca Vicam.

Las determinaciones de las muestras y patrones en el cromatógrafo de líquidos (HPLC), fueron realizadas por la Dra. Magda Carvajal en las instalaciones del Instituto de Biología. Para estas mediciones se utilizó un cromatógrafo de líquidos de la marca Perkin Elmer LC-100 con una columna C-18 y metanol-agua como solvente.

a. Experimento 1: Comprobación usando estándares Biocode.

Tabla IV: Comparación de las mediciones obtenidas de las mismas muestras, con cromatografía de líquidos (HPLC) y con fluorimetría y calibración con estándares Biocode.

Lectura de muestras contaminadas con ppb de aflatoxinas conocidas y medidas con HPLC.	Lectura en ppb de aflatoxinas con calibración Biocode.
0	0
13	11
20	21
26	27
50	48

Discusión del experimento 1:

Los resultados obtenidos en la tabla IV indican que el método de cuantificación de aflatoxinas totales de Biocode es confiable y sus resultados son equivalentes (± 2 ppb) a los que se obtienen midiendo las muestras en el cromatógrafo de líquidos.

La variación en los datos es muy pequeña e incluso puede atribuirse a la variación de la exactitud propia del fluorómetro, ya que los fabricantes indican dentro de sus especificaciones una variación de ± 2 ppb para este tipo de aparatos.

Con este sencillo experimento se validaron las condiciones y reactivos con los que se realizaron las determinaciones de aflatoxinas totales por el método Biocode en este trabajo y como se puede apreciar, las condiciones y reactivos fueron adecuados para llevar a cabo la cuantificación por este método.

b. Experimento 2: Comparación con extractos medidos en HPLC.

Tabla V: Comparación de cantidades conocidas de aflatoxinas totales medidas con cromatógrafo de líquidos y comparadas con mediciones del fluorómetro a dos diferentes calibraciones utilizando columnas y metodología Blocode.

Muestras con cantidades de aflatoxinas totales conocidas (HPLC), en ppb.	Calibración con estándares Blocode a 0, 25 y 50.	Calibración con estándares Aflatest a 0, 13 y 26.
0	0	2
0	0	2
13	11	6
20	21	9
26	24	10
50	49	19

Discusión de resultados del experimento 2:

La razón de realizar este experimento es que en 1992 y 1993 en el Programa Gubernamental de detección de aflatoxinas en el maíz del Estado de Tamaulipas, se utilizó la extracción con el método y columnas de Biocode, pero la calibración del fluorómetro se realizó con los estándares y la calibración de Aflatest obteniéndose resultados erróneos como se puede ver al comparar los resultados de la calibración Aflatest y los resultados obtenidos por HPLC. La calibración con estándares Biocode da una lectura prácticamente igual a la de las muestras conocidas, ya que la exactitud del fluorómetro es de ± 2 , así el cero de la muestra, el cero con estándares Biocode y el 2 con los estándares Aflatest son iguales o equivalentes. Cuando hay 13 ppb de aflatoxinas, la lectura con estándares Biocode es de 11 (que como es ± 2 , es equivalente), pero con la calibración de Aflatest da 6 ppb, rango fuera de los ± 2 y por lo tanto erróneo. De igual modo, los 20 ppb de aflatoxinas de la muestra conocida, dan 21 con los estándares Biocode, pero con la calibración de Aflatest da 9, dato bajo y erróneo.

Hasta aquí desde el punto de vista práctico no hay problema, pues estamos trabajando con maíz "dentro de norma", pero cuando ponemos una muestra medida y conocida con 50 ppb de aflatoxinas, con la calibración de Biocode da 49 que es similar o igual, pero con la calibración de Aflatest da 19 que está "dentro de norma", en un maíz que claramente está contaminado. Por lo tanto, el usar la calibración de Aflatest con el método y las columnas de Biocode da lecturas erróneas y bajas lo cual representa un peligro para la salud pública si se utilizan estándares que no corresponden a la metodología y las columnas empleadas.

En 1992, casi todo el maíz cosechado en el estado de Tamaulipas salió dentro de norma, es decir, que contenía menos de 20 ppb de aflatoxinas totales, y quizá la razón fue la utilización de estándares Aflatest con columnas y metodología de Biocode, pero no había modo de ajustar calibraciones, hasta tener ambos kits de estándares ya que en ese entonces no estaban disponibles en el mercado los estándares Biocode.

c. **Experimento 3: Equivalencia de estándares.**

Como ya se dijo en la parte de metodología, en este experimento, se busca la equivalencia de los tres estándares Aflatest, con los Biocode para poder calibrar el fluorómetro con los primeros y así, obtener resultados equivalentes a los que se obtendrían con la calibración con estándares de Biocode.

La diferencia entre las 2 modalidades de la marca Aflatest - 10 y Aflatest - P pertenecientes a la misma casa comercial es la recomendación de uso del fabricante en el sentido de utilizar los primeros para maíz y los segundos para cacahuates.

Tabla VI: **Medición de estándares de calibración Aflatest-P y Aflatest-10 equivalentes a la calibración ajustada al método y estándares Biocode.**

Marcas	Vial verde					Vial amarillo					Vial rojo				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Biocode	0	0	0	0	0	25	24	28	25	25	50	51	50	52	50
Aflatest-P	-9	-10	-10	-10	-10	28	28	28	28	28	69	69	69	68	68
Aflatest-10	-8	-9	-9	-9	-9	27	25	25	25	25	63	61	62	60	62

Discusión del experimento 3:

Como se puede observar el estándar verde de Biocode en cero, equivale en general a un -10 de los estándares correspondientes al vial verde de Aflatest, el número negativo es sólo la interpretación que el fluorómetro registra para aquellas intensidades de fluorescencia por debajo del cero fijado con anterioridad y sigue siendo proporcional a éstas.

El estándar rojo de Biocode de 50 (+/- 2), corresponde a los estándares rojo de Aflatest con un rango de 62 a 69 cuya media es 66; aunque es recomendable utilizar la equivalencia correspondiente a los estándares Aflatest-P o Aflatest-10 según se cuente con ellos.

La única posibilidad de usar los estándares Aflatest cuando se trabaja con columnas y metodología de Biocode, es utilizar una equivalencia de los niveles máximo y mínimo de calibración, con las intensidades de fluorescencia de los estándares Biocode, dado que los estándares están diseñados por los fabricantes de acuerdo con su correspondiente metodología y a la concentración y tipo de anticuerpo en la columna.

Con estos resultados, se puede resolver el problema que surgió en Tamaulipas en donde se utilizaron durante dos años las columnas y la metodología de Biocode calibrando el fluorómetro con los estándares y la calibración de Aflatest obteniendo resultados erróneos en alrededor de 80,000 análisis realizados.

Una vez fijados los niveles de calibración mínima y máxima de Biocode en cero y 50 equivalentes a -10 y 66 de los de Aflatest ya se puede realizar la lectura de las muestras extraídas por el método de Biocode.

Discusión del experimento 3:

Como se puede observar el estándar verde de Biocode en cero, equivale en general a un -10 de los estándares correspondientes al vial verde de Aflatest, el número negativo es sólo la interpretación que el fluorómetro registra para aquellas intensidades de fluorescencia por debajo del cero fijado con anterioridad y sigue siendo proporcional a éstas.

El estándar rojo de Biocode de 50 (+/- 2), corresponde a los estándares rojo de Aflatest con un rango de 62 a 69 cuya media es 66; aunque es recomendable utilizar la equivalencia correspondiente a los estándares Aflatest-P o Aflatest-10 según se cuente con ellos.

La única posibilidad de usar los estándares Aflatest cuando se trabaja con columnas y metodología de Biocode, es utilizar una equivalencia de los niveles máximo y mínimo de calibración, con las intensidades de fluorescencia de los estándares Biocode, dado que los estándares están diseñados por los fabricantes de acuerdo con su correspondiente metodología y a la concentración y tipo de anticuerpo en la columna.

Con estos resultados, se puede resolver el problema que surgió en Tamaulipas en donde se utilizaron durante dos años las columnas y la metodología de Biocode calibrando el fluorómetro con los estándares y la calibración de Aflatest obteniendo resultados erróneos en alrededor de 80,000 análisis realizados.

Una vez fijados los niveles de calibración mínima y máxima de Biocode en cero y 50 equivalentes a -10 y 66 de los de Aflatest ya se puede realizar la lectura de las muestras extraídas por el método de Biocode.

d. Experimento 4: Calibración ajustada.

Tabla VII: Comprobación de la calibración ajustada encontrada para los estándares Aflatest, utilizando metodología y columnas Blocode, en dos marcas de fluorómetros.

Extractos puros de muestras contaminadas medidas con HPLC.	Medición con fluorómetro Vicam y calibración de estándares Aflatest ajustados a -10 (verde) y 66 (rojo).	Medición con fluorómetro Sequoia Turner y estándares Aflatest ajustados a 10 (verde) y 66 (rojo)
kit 1:		
0	0	0
13	14	13
26	24	25
50	50	52
kit 2:		
0	0	0
13	11	12
26	26	24
50	50	48

Discusión del experimento 4:

Como se puede apreciar, cuando se ajusta la calibración del fluorómetro con los estándares Aflatest colocando el vial verde en -10 y el rojo en 66, se observa que los resultados obtenidos son equivalentes a las mediciones con la calibración usando los estándares Biocode en 0 el verde y 50 el rojo, que corresponden a las columnas y metodología empleada y también, corresponden a las mediciones realizadas con HPLC, que son de gran exactitud.

Se comprueba entonces que la calibración ajustada encontrada en el experimento 3 es válida cuando se pretende determinar la cantidad de aflatoxinas totales trabajando con la metodología y las columnas de Biocode, utilizando los estándares Aflatest para calibrar cualquiera de los fluorómetros promovidos por las distintas casas comerciales.

Hay que tomar en cuenta que debido a las cantidades tan pequeñas que se usan (microgramos/kilo), el fluorómetro tiene un rango de exactitud de ± 2 por lo que una variación dentro de este rango no se considera una determinación errónea.

4. Análisis químico.

- a. Resultados del método Biocode para cuantificación de aflatoxinas totales.

Tabla VIII-a: Cuantificación de aflatoxinas de maíz de la bodega "Las Yescas" de Tamaulipas por el método de fluorometría con columnas monoclonales Biocode (1992).

N° de muestra.	Cantidad de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$) con calibraciones:			Tipo de muestra
	Biocode (0,25,50)	Aflatest		
		Calibración ajustada. (-10,33,66)	Calibración normal. (0,13,26)	
M-1	79	78	33	Cribado.
M-2	65	65	28	Cribado.
M-3	43	41	20	Cribado.
M-4	76	75	32	Cribado.
M-5	40	40	19	Cribado.
M-6	15	16	10	Cribado*
M-7	82	80	34	Cribado
M-8	29	28	15	Cribado.
M-9	79	79	33	Cribado.
M-10	134	133	53	Cribado.
M-11	51	52	23	Cribado
M-12	54	55	24	Cribado.
M-13	104	102	42	Cribado.
M-14	82	81	34	Cribado.

N° da muestra.	Cantidad de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$) con calibraciones:			Tipo de muestra
	Biocode (0,25,50)	Aflatast		
		Calibración ajustada. (-10,33,66)	Calibración normal. (0,13,26)	
M-15	71	71	30	Cribado.
M-16	71	71	30	Cribado.
M-17	101	100	41	Cribado.
M-18	48	48	22	Cribado.
M-19	60	62	26	Cribado.
M-20	60	60	26	Cribado.
M-21	24	24	13	Cribado.
M-22	137	136	54	Cribado.
M-23	223	223	85	Cribado.
M-24	29	29	15	Cribado.
M-25	156	156	65	Cribado.
M-26	153	153	64	Cribado.
M-27	66	66	26	Cribado.
M-28	47	47	19	Cribado.
M-29	45	45	20	Cribado.
M-30	61	61	26	Cribado.
M-31	56	56	24	Cribado.
M-32	40	42	19	Cribado.
M-33	50	50	22	Cribado.

N° de muestra.	Cantidad de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$) con calibraciones:			Tipo de muestra
	Blocode (0,25,50)	Aflatest		
		Calibración ajustada. (-10,33,66)	Calibración normal. (0,13,26)	
M-34	18	17	11	Cribado*.
M-35	59	59	26	Cribado.
M-36	42	43	19	Cribado.
M-37	27	27	14	Cribado.
M-38	39	39	18	Cribado.
M-39	43	43	19	Cribado.
M-40	27	26	14	Cribado.
M-41	43	43	22	Cribado.
M-42	36	36	16	Cribado.
M-43	275	275	104	No cribado.
M-44	118	118	47	No cribado.
M-45	76	75	32	No cribado.
M-46	289	289	109	No cribado.
M-47	1971	1970	718	No cribado.
M-48	162	163	63	No cribado.
M-49	394	394	147	No cribado.
M-50	258	258	98	No cribado.
M-51	115	114	46	No cribado.
M-52	278	278	105	No cribado.

N° de muestra.	Cantidad de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$) con calibraciones:			Tipo de muestra
	Biocode (0,25,50)	Aflatest		
		Calibración ajustada. (-10,33,66)	Calibración normal. (0,13,26)	
M-53	184	184	71	No cribado.
M-54	596	596	220	No cribado.
M-55	209	209	80	No cribado.
M-56	270	270	102	No cribado.
M-57	482	482	179	No cribado.
M-58	372	373	139	No cribado.
M-59	250	250	95	No cribado.
M-60	65	65	28	No cribado.
M-61	98	98	40	No cribado.
M-62	372	372	139	No cribado.
M-63	126	126	50	No cribado.
M-64	103	103	44	No cribado.
M-65	357	357	130	No cribado.
M-66	302	302	114	No cribado.
M-67	340	340	123	No cribado.
M-68	98	98	43	No cribado.
M-69	448	448	164	No cribado.
M-70	134	133	52	No cribado.
M-71	109	109	43	No cribado.

N° de muestra.	Cantidad de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$) con calibraciones:			Tipo de muestra
	Blocode (0,25,50)	Aflatest		
		Calibración ajustada. (-10,33,66)	Calibración normal. (0,13,26)	
M-72	226	226	92	No cribado.
M-73	125	125	48	No cribado.
M-74	416	415	155	No cribado.
M-75	315	315	119	No cribado.
M-76	118	118	48	No cribado.
M-77	68	69	28	No cribado.
M-78	359	359	134	No cribado.
M-79	171	171	65	No cribado.
M-80	210	210	79	No cribado.
M-81	240	240	89	No cribado.
M-82	335	334	133	No cribado.
M-83	97	97	41	No cribado.
M-84	468	468	181	No cribado.
M-85	518	518	192	No cribado.
M-86	283	283	107	No cribado.
M-87	363	362	136	No cribado.
M-88	311	311	117	No cribado.
M-89	145	145	57	No cribado.
M-90	330	330	119	No cribado.

N° de muestra.	Cantidad de aflatoxinas ($\mu\text{g}/\text{kg} = \text{ppb}$) con calibraciones:			Tipo de muestra
	Biocode (0,25,50)	Aflatest		
		Calibración ajustada. (-10,33,66)	Calibración normal. (0,13,26)	
M-91	480	480	174	No cribado.
M-92	82	82	34	Tierra.
M-93	181	181	70	Tierra.
M-94	51	51	23	Tierra.
M-95	104	105	42	Tierra.
M-96	169	169	66	Tierra.
M-97	174	174	70	Tierra.
M-98	71	71	30	Tierra.
M-99	106	106	43	Tierra.
M-100	69	69	29	Tierra.

* Maíz cribado en norma para consumo humano, o sea con menos de 20 ppb de aflatoxinas totales.

Tabla VIII-b Resumen de los datos de aflatoxinas totales en el maíz cribado, sin cribar y en la tierra de la bodega "Las Yescas". Promedio de las 100 determinaciones analizadas.

TIPO DE MUESTRA	Promedio de aflatoxinas totales en ppb ($\mu\text{g} / \text{kg}$).		
	Calibración con estándares Biocode.	Calibración con estándares Aflatest.	
		Calibración ajustada -10, 33, 66	Calibración normal 0, 13, 26
Maíz cribado	74.80 *	72.29	31.52
Maíz sin cribar	333.61 **	335.52	125.21
Tierra	127.14 ***	139.58	50.30

- * Promedio de 42 muestras analizadas.
- ** Promedio de 49 muestras analizadas.
- *** Promedio de 9 muestras analizadas.

Los datos de maíz cribado y sin cribar, tanto con los estándares Biocode como de los estándares Aflatest, con la calibración ajustada, coinciden, la tierra no tuvo resultados similares. En cambio los resultados con estándares Aflatest en su calibración normal arrojan datos menores en más de un 50% del dato correcto en todos los casos, quizá por tener algunos minerales traza que afectan la fluorescencia.

Se realizó un análisis de regresión lineal con los datos de la tabla VIII-a; en este análisis se correlacionaron los datos de aflatoxinas con los estándares Biocode con los datos de aflatoxinas obtenidos con los estándares Aflatest utilizando la calibración "normal" (0, 13, 26).

En la figura 14 se puede apreciar que el coeficiente de correlación r , que indica en este caso si es o no válido realizar una comparación entre los niveles de aflatoxinas obtenidos con los distintos estándares, es igual a **0.994** para los datos menores de 100 ppb y muy cercana a 1 (que es valor para una correlación perfecta), **0.9996** para los 100 datos. Esto nos indica dos cosas:

Una, que es válido hacer una comparación entre los resultados con una gran confiabilidad; y otra, que es posible utilizar estos datos como una curva patrón para convertir los niveles de aflatoxinas obtenidos con los estándares Aflatest con su calibración normal a niveles de aflatoxinas que se obtendrían con estándares Biocode, con una interpolación en las gráficas de la figura 13. En esa misma figura se muestran las ecuaciones correspondientes a las rectas de la regresión lineal simple que se practicó con los datos representados en cada gráfica y el coeficiente de correlación correspondiente.

El uso de la interpolación como método para determinar valores de aflatoxinas sirve para resolver el problema que se presentó en 1992 y 1993 en el programa de cuantificación de aflatoxinas en el Estado de Tamaulipas; ya que **sirve cuando se utilizan las columnas y metodología de Biocode y se calibra el fluorómetro con los estándares Aflatest.**

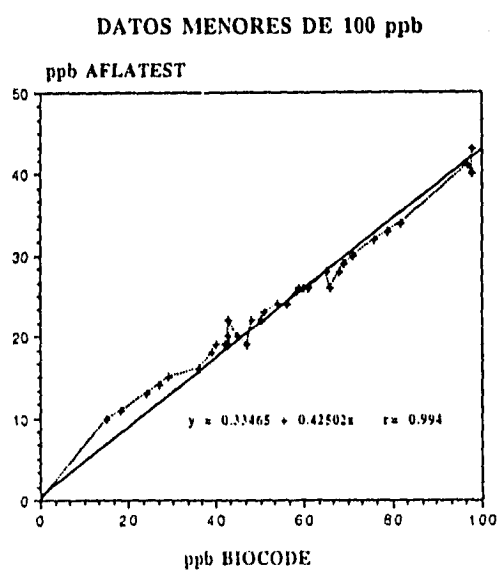
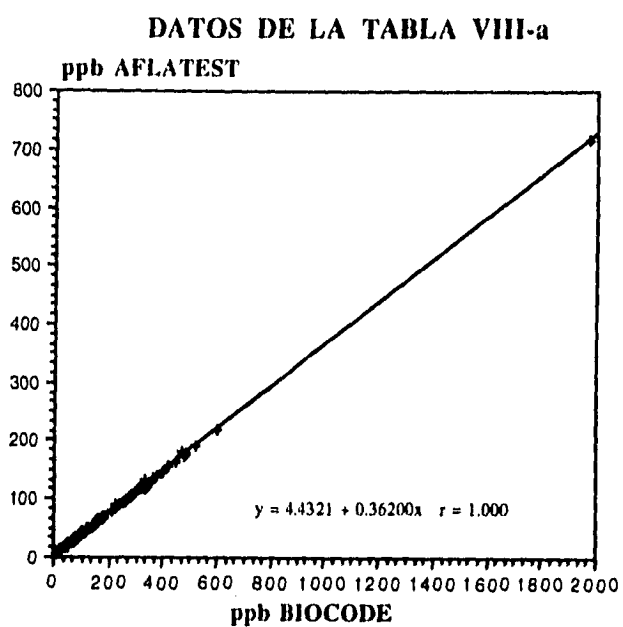


Figura 14: Correlación de las mediciones de aflatoxinas totales de las muestras analizadas con calibración y estándares Biocode y Aflatest.

Las cantidades de aflatoxinas en ppb son muy variables, pero todas excepto la muestra 6 y la 34 rebasan las 20 ppb permitidas en el maíz destinado a elaborar productos para consumo humano. Sin embargo, ya que el promedio de contaminación es de 74.80 ppb +/-2 podría ser utilizado para bovinos de engorda machos en fase final. El maíz sin cribar no puede ser utilizado ya que su promedio de contaminación es de 333.61 ppb +/-2. Los rangos de concentración van desde 19 ppb hasta 1971 ppb (ver tablas VIII-a y VIII-b).

La cantidad de aflatoxinas en el maíz cribado es de aproximadamente un 75% menor que en el maíz sin cribar, esto quiere decir que gran parte de las aflatoxinas en el grano se encuentran en la parte externa del mismo y en el tamo.

Las cantidades de aflatoxinas encontradas en las muestras de tierra indican que el hongo productor se aloja también en ella. La presencia de aflatoxinas en la tierra es perjudicial para futuros cultivos e indica una contaminación del suelo que hace que persista el problema.

Con la calibración del fluorómetro usando los estándares Aflatest utilizando la calibración ajustada se obtienen resultados muy similares a los que se obtienen utilizando los estándares Biocode, por lo que se recomienda el uso de esta calibración ajustada cuando se vaya a cuantificar aflatoxinas con columnas y metodología de Biocode y se cuente sólo con los estándares Aflatest para calibrar el fluorómetro.

El uso de los estándares Aflatest con su calibración normal, cuando se utiliza para cuantificar aflatoxinas en maíz utilizando columnas y metodología de Biocode, arroja datos de concentración de aflatoxinas un 70 % menor.

Se pudo observar que algunas de las muestras presentan desarrollo de diversos tipos de hongos, no obstante de que se han conservado en un cuarto frío aproximadamente a 4 °C por año y medio. Además, las muestras de tierra presentan igualmente desarrollo y crecimiento de diversos tipos de hongos.

b. **Resultados del método de Thomas-Eppley para identificación de aflatoxinas por cromatografía de capa fina.**

En un primer experimento, se corrieron 3 placas de silicagel de la marca comercial **MERCK**, con un espesor de capa de 0.2 mm. En la primera de las placas se colocaron 10 microlitros de cada uno de los 10 primeros extractos purificados de aflatoxinas obtenidos por el método **Blocode**; en la segunda placa se colocaron 20 microlitros y en la tercera se colocaron 30 microlitros.

Como agente desarrollador de la cromatografía se utilizó una mezcla de disolventes orgánicos en la siguiente proporción:

Sustancia	Por ciento en volumen
Acetona	17 %
Acetato de etilo	33 %
Tolueno	50 %

En cada una de las placas se colocaron en el mismo volumen estándares de aflatoxina B₁ y B₂.

Los resultados en estas tres placas no fueron los esperados, las manchas al nivel del *r_f* de los estándares aparentemente no aparecieron y en su lugar aparecieron manchas verdes que coinciden casi con la línea del disolvente. De acuerdo con el corrimiento de los estándares de aflatoxinas B₁ y B₂, estas manchas verdes no corresponden a estas sustancias pero pueden deberse a la presencia de otro tipo de micotoxina llamada zearalenona producida por el hongo del género *Fusarium*.

El experimento se repitió pero ahora con los mismos extractos concentrados hasta aproximadamente 1/3 de su volumen original.

Los resultados son similares. Las manchas verdes sobre la línea del disolvente siguen apareciendo en todas las muestras, el estándar de B₁ indica el máximo corrimiento para las aflatoxinas (recordemos que es la aflatoxina que más corre en la placa), y justo en esa distancia se encuentran ahora manchas de azul muy tenue en los carriles de las muestras.

Estos resultados se pueden explicar si se considera que las aflatoxinas son separadas por medio de un anticuerpo monoclonal que extrae sólo una parte proporcional de las aflatoxinas en la muestra, ya lo que se hace pasar por la columna es una porción diluida del extracto de la muestra de maíz, (ver método Biocode en Materiales y Métodos) por tanto la cantidad neta de aflatoxinas en la celdilla no es suficiente para dar una fluorescencia intensa. Las manchas verdes pueden ser o bien zearalenona como ya se mencionó.

Para remediar este problema, se efectuó la extracción de las aflatoxinas por el método rápido de extracción y cuantificación de aflatoxinas de **Thomas, Eppley & Trucksess (1975)** en el cual, la cantidad neta de aflatoxinas extraídas de la muestra pasa a la placa de sílica gel y por tanto, la fluorescencia es más evidente al ser más intensa (Tabla IX).

Resultados en la cromatografía con extractos obtenidos por el método de Thomas-Eppler:

Se tomó maíz y tierra de las muestras de la bodega rural "Las Yescas" que resultaron con los más altos valores en la cuantificación de aflatoxinas totales, así:

Tabla IX: Determinación de los tipos de aflatoxinas en muestras de maíz y tierra de la bodega rural "Las Yescas"

Nº Muestra	Tipo de muestra	Aflatoxinas totales en ppb	Tipo de aflatoxinas encontradas en la muestra
M-25	Cribado.	156	B ₁ , B ₂
M-26	Cribado.	153	B ₁ , B ₂
M-36	Cribado.	42	B ₁ , B ₂
M-65	No cribado.	357	B ₁ , B ₂
M-69	No cribado.	448	B ₁ , B ₂
M-83	No cribado	97	B ₁ , B ₂
M-84	No cribado.	468	B ₁ , B ₂
M-97	Tierra.	174	B ₁ , B ₂

En la placa se colocaron estándares de aflatoxina B₁, B₂, de zearalenona y de aflatoxinas totales. Se observaron manchas correspondientes con el estándar de aflatoxina B₁ y con el de B₂, la mancha del estándar de zearalenona quedó aislada de otras manchas en la placa con lo que se descarta la presencia de esta toxina en las muestras. No se encontraron manchas de otro tipo de aflatoxinas en la placa por lo que podemos decir que el hongo responsable de la producción de aflatoxinas en este maíz es *A. flavus* y no *A. parasiticus* (ver la tabla II).

V. CONCLUSIONES

1. Las observaciones realizadas tanto en el microscopio de luz como en el electrónico, así como la prueba bioquímica para cepas lipófilas y la presencia de solamente dos tipos de aflatoxinas (B_1 y B_2), indican que la especie productora en el maíz de la bodega rural de "Las Yescas" es *Aspergillus flavus*.
2. Los niveles de aflatoxinas son altos (mayores de 20 ppb) en prácticamente todas las muestras analizadas de maíz, tierra y maleza de la Bodega Rural "Las Yescas".
3. Las muestras de maíz cribado presentan valores de aflatoxinas aproximadamente 70 % menores a los del maíz sin cribar, sin embargo aún están fuera de las normas establecidas, sólo 2 de las 100 muestras están cumpliendo las normas.
4. Se pueden utilizar las gráficas de la figura 14 como una alternativa para convertir los datos de ppb obtenidos con columnas y metodología Biocode, utilizando los estándares Aflatest, (0, 13, 26) para calibrar el fluorómetro.
5. Los estándares Biocode con calibración de verde en cero, rojo en 50 y amarillo en 25 son correctos, ya que corresponden a la obtenida en HPLC de las mismas muestras.
6. Si se miden las aflatoxinas con el método Biocode y la calibración de Aflatest (0, 13 y 26) se está cometiendo un grave error, ya que el maíz que aparece como "en norma" con menos de 20 ppb, tiene hasta 50 ppb de aflatoxinas totales.
7. El estándar verde (cero) de Biocode corresponde al verde de Aflatest con un valor de $-10 (+/- 2)$. El estándar rojo (50) de Biocode corresponde al rojo de Aflatest con un valor de $66 (+/- 2)$. El estándar amarillo de Biocode (25), corresponde al amarillo de Aflatest con un valor de $33 (+/- 2)$.
8. Utilizando los estándares Aflatest en verde (-10) y rojo (66), para calibrar el fluorómetro cuando se han utilizado la metodología y las columnas de Biocode, se obtienen valores equivalentes a los obtenidos por HPLC para las mismas

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Ashai, T., Mori, Z., Majima, R., & Uritani, I. 1969. J. Stored Prod. Res. 5 In: Wyllie, Thomas D. & Morehouse, Lawrence G. "Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses". Vol. 3. 1978. Marcel Dekker Inc. E.U.A. 119-143.
2. Austwick, P.K.C. 1983. "Fungal nephrotoxins". Vet. Res. Comm. 7 (1): 145-154.
3. Bagley, E.B. 1979. "Decontamination of corn containing aflatoxin by treatment with ammonia". J. Amer. Oil Chem. 56 (9): 808-811.
4. Black, H.S., & Altschul R. 1965. "Gibberellic acid-induced lipase and alpha-amylase formation and their inhibition by aflatoxin". Biochem. Biophys. Res. Commun. 19: 661.
5. Campbell, T.C., & Hayes, J.R. 1976. "Role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion". Toxicol. Appl. Pharmacol. 35 (2): 199-222.
6. Capdevila, J. 1980. Hygia Pecoris II. En: Giralt Pont, Javierre Jordana, Piñol Campanera, Ramallo Arroyo. 1989. "El Problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2.ª Edición. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
7. Crisan, E.V. 1973. "Effects of aflatoxin on germination and growth of Lettuce" Appl. Microbiol. 25 (3): 206.
8. Detroy, R.W., Freer, S. & Ciegler, A. 1973. Aflatoxin and anthraquinone biosynthesis by nitrosoguanidine-derived mutants of *A. parasiticus*". Can. J. Microbiol. 19 (11): 1373-1378.
9. Diener, U.L. & Davis, N.D. 1987. "Biology of *Aspergillus flavus* & *A. parasiticus*". In: Zuber, Lillehoj & Renfro. 1987. "Aflatoxin in Maize: A Proceedings of the Workshop". 33 - 40. CIMMYT. México, D.F.
10. Doerr, J.A. 1974. "Impairment of hemostatic function during aflatoxicosis in young chicken". Poultry Science 53 (5): 1919.

11. Doerr, J.A. 1978. "Enhanced susceptibility to bacterial toxins during aflatoxicosis". Poultry science **57** (4): 1134.
12. Donkersloot, J.A., Mateles, R.I. & Yang, S.S. 1972. "Isolation of averufin from a mutant of *A. parasiticus* impaired in aflatoxin biosynthesis". Biochem. Biophys. Res. Commun. **47** (5): 1051.
13. Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F., Reinhold, V.N., Büchi, G. & Wogan, G.N. 1977. "Structural identification of major DNA adduct formed by AFB₁ *in vitro*". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74** (5): 1870-1874.
14. Fukuyama, K., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Hamasaki, T. & Hatsuda, Y. 1975. "Crystal and molecular structure of sterigmatocystin metabolite of *A. versicolor*". Bull. Chem. Soc. Jpn. **48** (5): 1639-1640.
15. Cole, G.T. Cole & Kendrick, B. 1981. "Biology of conidial fungi". Academic Press. U.S.A. 154-185.
16. Giambrone, J.J. 1978. "Aflatoxin on human and cell-mediated immunosystems of chicken". Am. J. Vet. Res. **39** (2): 305-308.
17. Giralt Pont, J., Piñol Campanera, J. y Arroyo, R. 1989. "El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2.ª Edición. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
18. Hagler, W.M. & Hamilton P.B. 1982. "Interactions between vitamin nutrition and aflatoxin in agricultural animals". Dev. Ind. Microbiol. **23**: 247-256.
19. Hamilton, P.B. 1975. In: Giralt Pont, J., Piñol Campanera, J. & Arroyo, R. 1989. "El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2.ª Edición. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
20. Hamilton, P.B. 1974. "Interaction of dietary aflatoxin with some vitamin deficiencies". Poultry Science **53** (3): 871-877.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

21. Hamilton, P.B. 1982. Refuah Vet. **39**. En: Giral Pont, J., Piñol Campanera, J. y Arroyo, R. 1989. "El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2.ª Edición. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
22. Hatsuda, Y. & Kuyama, S. 1954. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. **28**. In: Steyn, P.S. 1980. "The biosynthesis of mycotoxins". Academic Press. U.S.A. 105-150
23. Heathcote, J.G., Dutton, M.F., & Hibbert, J.R. 1976. "Biosynthesis of aflatoxins". Chem. Ind. (Londres). **(6)**: 270-272.
24. Howart, B. 1976. "Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability and progeny performance of broiler breeder hens". Appl. Environ. Microbiol. **31 (55)**: 680-684.
25. Hsieh, D.P.H., Lin, M.T., Yao, R.C., & Singh, R. 1976. "Biosynthesis of aflatoxin-conversion of norsolorinic acid and other hypothetical intermediates into aflatoxin B₁". J. Agric. Food Chem. **24 (6)**: 1170-1174.
26. Joffe, A.Z. 1969. "Relationships between *A. flavus*, *A. niger* and some other fungi in mycoflora of groundnut kernels". Plant soil. **31**: 57.
27. Katsube, Y., Tsykihara, T., Tanaka, N., Ando, K., Hamasaki, T., & Hatsuda, Y. 1972. "Crystal and molecular structure of averufin". Bull. Chem. Soc. Jpn. **45 (12)**: 3725.
28. Kingston, D.G, Chen, P.N., & Vercellotti, J.R. 1976. "Metabolites of *A. versicolor* 6,8-di-O-methynidurufin, griseofulvin, dechlorogriseofulvin and 3,8-dihidroxy-6-methoxy-1-methylaxanthone". Phytochemistry **15 (6)**: 1037-1039.
29. Koller, G. & Russ, H. 1937. Monatsh. Chem. **70**. In: Steyn, P. S. 1980. "The Biosynthesis of Mycotoxins". 1980. Academic Press. U.S.A. 105-150.
30. Krogh, Palle. 1987. "Mycotoxins in food". Academic Press. U.S.A. 65-95.
31. Lee, L.S., Bennett, J.W., Cucullu, A.F., & Stanley, J.B. 1975. "Synthesis of versicolorin-A by a mutant strain of *A. parasiticus* deficient in aflatoxin production". J. Agric. Food Chem. **23 (6)**: 1132-1134.

32. Lilly, L.J. 1965. "Induction of chromosome aberrations by aflatoxin". Nature (London) **207**: 433.
33. Lin, J.K., Miller, J.A. & Miller, E.C. 1977. "2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid-hydrolysis product of AFB₁-DNA or B₁-ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediate reactions and in rat liver *in vivo*". Cancer Res. **37 (12)**: 4430-4438.
34. Madhavan, T.V. 1967. "Tubular epithelial reflux in kidney in aflatoxin poisoning". J. Path. Bact. **93**: 329.
35. Maggon, K.K., Gupta, S.K. & Venkatasubramanian, T.A. 1977. "Effect of zinc on adenine-nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in *A. parasiticus*". Appl. Envir. **32 (6)**: 753-756.
36. Masri, M.S. 1969. "Aflatoxin M content of milk from cows fed known amounts of aflatoxin". Vet. Rec. **84**: 146.
37. Mirocha, C.J., Pathre, S.V. & Christensen, C.M. 1980. "Mycotoxins". In: Steyn, P.S. 1980. "The biosynthesis of mycotoxins". Academic Press. U.S.A. 105-150.
38. Mirocha, C.J., & Christensen, C.M. 1983. "Storage of cereal grains and their products". Chapter 8: "Mycotoxins". Academic Press. U.S.A. 242-270.
39. Papa, K.E. 1977. "Mutant of *A. flavus* producing more aflatoxin B₂ than aflatoxin B₁". Appl. Environ. Microbiol. **33 (1)**: 206.
40. Patel, J.M. & Pawar, S.S. 1974. "Riboflavin and drug-metabolism in adult male and female rats". Biochem. Pharmacol. **23 (10)**: 1467-1477.
41. Pier, A.C. 1979. "Implications of mycotoxins in animal-disease". J. Am. Vet. Me. **175 (6)**: 605.
42. Purchase, I.F.H. 1968. "Carcinogenicity of sterigmatocystin". Food Cosmet. Toxicol. **6**: 555.

43. Raper, K.B. & Fennell, D.I. 1965. "The genus *Aspergillus*". The Williams & Wilkins Company. U.S.A. 360-379.
44. Reiss, J. 1971. "Increase of activity of beta-indolylacetic acid by aflatoxin B₁". Z. Pflanzenphysiol. **64** (3): 260.
45. Roebuck, B.D. & Wogan, G.N. 1977. "Species comparison of 'in vitro' metabolism of aflatoxin B₁". Cancer Res. **37** (6): 1649-1656.
46. Shih, C.N. & Martin, E.H. 1974. "Aflatoxin formation, lipid-synthesis and glucose-metabolism by *A. parasiticus* during incubation with and without agitation". Biochim. Biophys. Acta. **338** (1): 286-296.
47. Skoog, D.A. 1984. "Análisis instrumental". 2ª edición. Interamericana. México 304-310.
48. Smith, T.K. 1982. "Influence of mycotoxins on protein and amino-acid utilization". Fed. Proc. **41** (11): 2828-2832.
49. Steyn, P. S. 1980. "The biosynthesis of mycotoxins". Academic Press. U.S.A. 105-150.
50. Stoloff, L. & Trager, W. 1965. "Recommended decontamination procedures for aflatoxin". J. Amer. Agr. **48**: 681.
51. Swenson, D.H., Lin, J.K., Miller, E.C. & Miller, J.A. 1977. "Aflatoxin B₁-2-3-oxide as a probable intermediate in covalent binding of aflatoxins B₁ and B₂ to rat-liver-DNA and ribosomal-RNA *in vivo*". Cancer Res. **37** (1): 172-181.
52. Tuite, J. 1969. "Plant pathological methods". Burgess Publishing Company. U.S.A. 45.
53. World Health Organization (OMS). 1979. Mycotoxins. Environmental Health Criteria II. Ginebra, Suiza. 35-52.

54. Tung, H.T. *et. al.* 1970. "Effects of aflatoxin on some marker enzymes of lysosomes". Biochem. Biophys. Acta **222 (3)**: 665. In: Steyn, P.S. 1980. "The biosynthesis of mycotoxins". Academic Press. U.S.A. 105-150.
55. Tung, H.T. 1971. "Aflatoxicosis and bruising in chicken". Poultry Science **50 (3)**: 795.
56. Ureña, F.C. 1986. "Manual de técnicas básicas para microscopía electrónica" Universidad de Costa Rica. 1-56.
57. Valle Vega, P. 1991. "Toxicología de Alimentos". ECO/OMS/OPS. México. 10-13.
58. Van Egmond, H.P. 1983. "Mycotoxins in dairy products". Food Chem. **11 (4)**: 289-307.
59. Wei, R.D. 1968. Chinese J. Physiol. **20**. En: Girait Pont, J., Piñol Campanera, J., Arroyo, R. 1989. "El problema de la contaminación fúngica en la industria de piensos". 2.ª Edición. Lucta, S.A. Barcelona, España. 33-65.
60. Willard, H.H. 1978. "Métodos instrumentales de análisis". Editorial Continental. México. 246 p.
61. Wyllie, T. D. & Morehouse, L.G. 1978. "Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses". Vol. 3. Marcel Dekker Inc. U.S.A. 119-143.
62. Yao, R.C. & Hsieh, D.P.H. 1974. "Step of dicurvos inhibition in pathway of aflatoxin biosynthesis". Appl. Microbiol. **28 (1)**: 52-57.
63. Yen, C.C. & Hamilton, P.B. 1979. "Interaction of vitamin-A-deficiency and aflatoxicosis". Poultry Science **58 (4)**: 1124.

VII. APENDICE.

a. Clave de identificación de *Aspergillus spp.* (Raper, 1965)⁴³

I. Cabezas conidiales de color amarillo pálido a intenso o sombreados con amarillo-verdoso cuando están jóvenes:

A. Las colonias no cambian a café en el agar de Czapek; esporas definitivamente equinuladas

1. Esterigma uniseriado o biseriado con este último predominante; cabezas radiadas o muy vagamente columnares: *A. flavus* Link

2. Esterigma típicamente sencillo

a. Cabezas columnares; esterigma uniseriado *A. flavus*
var. columnaris.

b. Cabezas radiadas; esterigma uniseriado *A. parasiticus* Speare

B. Colonias que cambian a café-verdoso claro en agar de Czapek; esporas irregularmente rugosas o lisas

1. Esporas grandes, comúnmente 4.5 a 7.0 μ pero hay también de 8.0 o 10.0 μ , elípticas al principio y luego globulares o subglobulares, lisas o irregularmente rugosas

a. Los conidióforos nacen principalmente del substrato *A. oryzae*
Cohn

b. Los conidióforos nacen principalmente como pequeñas ramas de las hifas aéreas *A. oryzae* Cohn var. *effusus*

2. Esporas pequeñas, ovaladas o elípticas, generalmente 3.0 a 3.5 μ por 2.4 a 3.0 μ , lisas o casi lisas

a. Crecimiento pobre en agar de Czapek; estructuras conidiales abundantes, arreglo zonal en agar de malta; esporas lisas o casi lisas *A. zonatus* Kwon & Fenell

b. Crecimiento difundido en agar de Czapek y en agar de malta; esporas notablemente rugosas *A. clavato-flavus*

- II. Cabezas conidiales amarillo-verdosas sombreados con café-olivo cuando son jóvenes; esporas notablemente verrucosas
 - A. Cabezas conidias que cambian de amarillo-verdosas a café en agar de Czapek *A. tamarit* Kita
 - B. Cabezas conidiales que cambias rápidamente a café-olivo y luego a café oscuro en agar de Czapek *A. flavo-furcatis* Batista & Maia
- III. Cabezas conidiales en color amarillento a sombreados con gris; esporas lisas o casi lisas
 - A. Esporas notablemente equinuladas *A. subolivaceus*
 - B. Esporas lisas o casi lisas *A. avenaceus* Smith