



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**Evaluación de un método cualitativo para la  
determinación visual de cepas aflatoxigénicas  
en granos de maíz**

**T E S I S:**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

**MÓNICA PÉREZ ACEVEDO**

ASESORES:

**M en C. MARÍA CRISTINA JULIA PÉREZ REYES**

**M en M. GABRIELA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX.**

**2011**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefa del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Evaluación de un método cualitativo para la determinación visual de cepas  
 aflatoxicénicas en granos de maíz.

Que presenta la pasante Mónica Pérez Acevedo

Con número de cuenta: 403100187 para obtener el título de:  
 Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
 Cuautitlan Izcalli, Mex. a 25 de febrero de 2011

PRESIDENTE	MC. Ma. Cristina <sup>a</sup> Julia Pérez Reyes	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	Dra. Elsa Gutiérrez Cortez	
1er SUPLENTE	MC. Ma. Guadalupe Amaya León	
2º SUPLENTE	MC. Enrique Martínez Manrique	

## DEDICATORIA

Doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta a esta etapa de mi vida.

A mis padres por el apoyo, la fe y el amor que siempre me han brindado, gracias, los amo.

Esta tesis es el esfuerzo de muchas personas que están en mi vida: Mis Padres, Esposo, familiares, amigos y hermanos que siempre estuvieron a mi lado apoyándome, dándome un consejo y en repetidas ocasiones extendiéndome su mano cuando me sentía sin fuerzas para seguir adelante.

A mis compañeros de la Universidad que me brindaron su amistad incondicional, Francisco, Selina, Claudia, Adriana, Manuel, Braulio, Carlos, Adela.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento a la M en C. María Cristina Julia Pérez Reyes y a la M en M. Gabriela Sánchez Hernández por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo.

A la M en M. Josefina Moreno Lara por el apoyo técnico en la determinación de aflatoxinas.

Al Físico Epifanio Cruz Zaragoza, del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, por el apoyo brindado en la irradiación del grano de maíz utilizado en este trabajo.

A todos mis profesores que me dieron la formación profesional como Ingeniera en Alimentos.

A los miembros del Jurado por su tiempo y su valiosa contribución en la revisión de este trabajo.

A la Unidad de Investigación de Granos y Semillas (UNIGRAS), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por las facilidades brindadas en el desarrollo de la fase experimental.

## CONTENIDO

Pág.

Resumen	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	4
1. Hongos en granos y semillas	4
1.1. Definición	4
1.2. Clasificación de los hongos que invaden granos y semillas	4
1.2.1. Hongos de campo	4
1.2.2. Hongos de almacén	5
1.2.3. Hongos de deterioro avanzado	5
1.3. Clasificación del género <i>Aspergillus</i>	6
1.4. Características de algunas especies de <i>Aspergillus</i>	7
1.4.1. <i>Aspergillus flavus</i> Link	7
1.4.2. <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	7
1.4.3. <i>Aspergillus clavatus</i> Desmazieres	7
1.4.4. <i>Aspergillus candidus</i> Link	7
1.4.5. <i>Aspergillus ochraceus</i> K. Wilhem	8
1.4.6. <i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn	8
1.4.7. <i>Aspergillus pseudotamarii</i> Ito	8
1.4.8. <i>Eurotium chevalieri</i> L. Mangin	8
2. Micotoxinas	9
2.1. Aflatoxinas	11
2.1.1 Características químicas de las aflatoxinas	13
2.1.2 Biosíntesis de las aflatoxinas	14
2.1.3 Presencia de aflatoxinas en alimentos	16
2.1.4 Ingesta diaria admisible	16
3 Otras micotoxinas	16
3.1 Ácido ciclopiazónico	16
3.1.1 Características del compuesto	17

3.1.2	Toxicología	19
3.1.3	Presencia en alimentos	19
3.1.4	Ingesta diaria admisible	20
3.2	Ácido kójico	21
3.2.1	Características químicas	21
3.2.2	Toxicología	21
3.2.3	Presencia en alimentos	22
3.2.4	Ingesta diaria admisible	22
3.3	Esterigmatocistina	22
3.3.1	Características químicas	22
3.3.2	Toxicología	23
3.3.3	Presencia en alimentos	23
3.3.4	Ingesta diaria admisible	24
4.	Factores determinantes en el desarrollo de hongos y producción de micotoxinas	24
4.1	Factores intrínsecos	24
4.1.1	Sustrato	25
4.1.2	Actividad de agua	25
4.1.3	Influencia de pH	25
4.2	Factores extrínsecos	26
4.2.1	Temperatura	26
4.2.2	Oxígeno	26
4.2.3	Luz	27
4.2.4	Humedad relativa	27
5.	Métodos utilizados para determinar aflatoxinas	27
5.1	Métodos basados en técnicas cromatográficas	28
5.2	Métodos basados en técnicas inmunológicas (ELISA)	28
5.3	Cromatografía de inmunoafinidad	29
5.4	Métodos basados en técnicas de análisis del DNA	29
5.5	Métodos basados en la utilización de medios de cultivo diferenciales.	29

6.	Ciclodextrinas	32
6.1	Historia	32
6.2	Nomenclatura	32
6.3	Características	33
7.	Desoxicolato de sodio	33
7.1	Características	33
8.	Maíz	34
8.1	Origen e historia	34
8.2	Clasificación taxonómica del maíz	35
9.	Hongos y micotoxinas en maíz	35
10.	Importancia socioeconómica	37
11.	Composición química del maíz	41
12.	Uso del maíz	42
III.	Justificación	44
IV.	Objetivos	44
	Objetivo general	44
	Objetivos particulares	44
V.	Materiales y métodos	46
1.	Procedencia de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas	46
1.1	Actividades preliminares	47
2.	Primer etapa experimental <i>in vitro</i>	47
2.1.	Determinación visual de cepas aflatoxigénicas	47
2.1.1.	Preparación de medios de cultivo	47
2.1.2.	Preparación del inóculo	48
2.1.3.	Evaluación del crecimiento y formación del halo en cepas de <i>Aspergillus</i>	48
2.1.4.	Determinación visual de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas a través de luz UV (365 nm)	49
2.1.5.	Determinación de la presencia total de aflatoxinas por el método 991.31 de cromatografía de inmunoafinidad	50

	de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC) 1995	
3.	Segunda etapa experimental <i>in vivo</i>	51
3.1.	Irradiación de maíz	51
3.2.	Determinación del contenido de humedad	51
3.3.	Ajuste del contenido de humedad	52
3.4.	Selección de cepas productoras de aflatoxinas	52
3.5.	Inoculación de cepas productoras en maíz	52
3.6.	Almacenamiento del maíz	53
3.7.	Detección visual de aflatoxinas en grano de maíz	53
3.8.	Determinación de aflatoxinas por cromatografía	53
4.	Caracterización macromorfológica de especies de <i>Aspergillus</i>	54
4.1.	Macromorfología	54
VI	Resultados y Discusión	55
1.	Primer etapa experimental	55
2.	Segunda etapa experimental <i>in vivo</i>	67
3.	Características de la macromorfología de las cepas no productoras y productoras de aflatoxinas inoculadas en granos de maíz	70
3.1.	Cepas no productoras de aflatoxinas	70
3.2.	Cepas productoras de aflatoxinas	71
VII	Conclusiones	73
VIII	Recomendaciones	75
IX	Referencias bibliográficas	76
X	Anexo	86

## ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	Pág.
1. Subgéneros y secciones de <i>Aspergillus</i> productoras de micotoxinas	6
2. Producción de micotoxinas del género <i>Aspergillus</i>	9
3. Principales géneros productores de micotoxinas y número de especies micotoxígenas	11
4. Especies productoras de aflatoxinas	12
5. Principales especies productoras de ácido ciclopiazónico (ACP)	17
6. Especies del género <i>Aspergillus</i> productoras de ACP	19
7. Presencia de ACP en diversos alimentos	20
8. Estimación de la exposición ( $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ ) y porcentaje de contribución a la IDA de ACP, a través de la ingesta de diferentes alimentos en México	20
9. Incidencia de ácido kójico en alimentos	22
10. Incidencia de esterigmatocistina en alimentos	24
11. Actividad de agua óptima para el desarrollo de algunas especies del género <i>Aspergillus</i>	25
12. Temperatura óptima para el desarrollo de algunas especies del género <i>Aspergillus</i>	26
13. Avance de la producción de maíz, de riego y temporal durante ciclo agrícola primavera-verano 2007-2008 en México	39
14. Avance de la producción de maíz, de riego y temporal durante ciclo agrícola otoño-invierno 2007-2008 en México	40
15. Composición química proximal de las partes principales de granos de maíz	41
16. Hongos del género <i>Aspergillus</i> utilizados para la determinación visual de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas <i>in vitro</i>	46
17. Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género <i>Aspergillus</i> en SB	58

18. Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género <i>Aspergillus</i> en YES	61
19. Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género <i>Aspergillus</i> en YED	64
20. Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género <i>Aspergillus</i> en CZ	65
21. Determinación visual de aflatoxinas en medio SB, YES y YED	67
22. Determinación de la macromorfología <i>in vivo</i> de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en granos de maíz	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Pág.
1 Fase de crecimiento fúngico y síntesis de micotoxinas	10
2 Aflatoxinas del grupo B,G y M	13
3 Biosíntesis de aflatoxinas	15
4 Estructura química del ácido ciclopiazónico	18
5 Estructura química del ácido kójico	21
6 Estructura química de la esterigmatocistina	23
7 Estructuras química de ciclodextrinas	32
8 Estructura química del desoxicolato de sodio	34
9 Ciclo de enfermedad de <i>Aspergillus flavus</i> en maíz	36
10 Estructura física del grano de maíz	42
11 Cuadro metodológico	45
12 Siembra de las especies de <i>Aspergillus</i> en diferentes placas de agar	48
13 Método de medición de cepas	49
14 Determinación visual de halo beige bajo luz UV 365 nm	50
15 Metodología para la determinación de aflatoxinas	51
16 Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de <i>Aspergillus</i> bajo luz UV a 365 nm en medio SB	56
17 Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de <i>Aspergillus</i> bajo luz UV a 365 nm en medio YES	60
18 Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de <i>Aspergillus</i> bajo luz UV a 365 nm en medio YED	63
19 Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de <i>Aspergillus</i> bajo luz UV a 365 nm en medio CZ	66
20 Formación de halo beige en grano de maíz inoculado y observado bajo luz natural	68

## RESUMEN

Uno de los factores que condicionan el nivel y la síntesis de aflatoxinas es el sustrato, de esta manera se han desarrollado medios de cultivo con elevadas concentraciones de carbohidratos y ácidos grasos, los cuales favorecen la producción de aflatoxinas. Se ha encontrado que el uso de aditivos como la  $\beta$ -ciclodextrina al medio de cultivo tiene la propiedad de incrementar la fluorescencia natural de las aflatoxinas al ser observadas bajo luz UV (365 nm). Asimismo, el desoxicolato de sodio actúa como inhibidor del crecimiento micelial de las colonias de hongos, y forma alrededor de cepas aflatoxigénicas un anillo de color beige al ser observadas bajo luz natural. El objetivo de este trabajo fue implementar un método cualitativo para la detección visual de aflatoxinas *in vitro* de 19 cepas correspondientes al género *Aspergillus* (aflatoxigénicas y no aflatoxigénicas) e *in vivo* en granos de maíz inoculados con cepas de *Aspergillus* productoras y no productoras de aflatoxinas. En la primera etapa experimental *in vitro* se evaluaron cinco medios de cultivo: Sabouraud (SB), Czapek (CZ), malta-sal-agar (MSA), dextrosa extracto de levadura agar (YED) y extracto de levadura sacarosa agar (YES), adicionados con  $\beta$ -ciclodextrina al 0.3% y desoxicolato de sodio al 0.4%. De los cinco medios utilizados el Sabouraud (SB) resultó ser el mejor, permitiendo detectar visualmente la producción de aflatoxinas a las 48 h de incubación. El halo beige alrededor de las colonias, permaneció concentrado por más tiempo en comparación de los otros medios; permitiendo así la detección visual de aflatoxinas por un periodo de tiempo más largo, mostrando una fluorescencia verde azul brillante para *Aspergillus flavus* y azul cielo brillante para *Aspergillus parasiticus* al ser observadas bajo luz UV (365nm); confirmando cuantitativamente la síntesis de aflatoxinas por el método de columnas monoclonales. En la segunda etapa *in vivo* los medios SB, YES y YED, nos permitieron determinar visualmente la formación del halo beige en cepas aflatoxigénicas, fluorescencia de aflatoxinas bajo luz UV y la confirmación de la producción de las mismas por el método de columnas monoclonales en granos de maíz inoculados con cepas aflatoxigénicas. Sin embargo, en el medio de cultivo SB se observó una mayor producción de aflatoxinas y el halo beige permaneció concentrado por más tiempo en comparación con el medio de cultivo YED. En el medio YES la determinación visual de aflatoxinas se observó hasta las 96 horas.

Palabras clave: Aflatoxinas, medios de cultivo,  $\beta$ -ciclodextrina, desoxicolato de sodio.

## I. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos utilizados por el hombre es un tema cada vez más importante a nivel mundial. Muchos tipos de contaminantes pueden estar presentes prácticamente en todos los alimentos incluyendo granos y sus derivados. Las especies *Aspergillus flavus* Link ex Fries, *Aspergillus parasiticus* Speare y *Aspergillus nomius* Kurtzman son productoras de aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987). Hasta hace poco tiempo estas tres especies se habían reconocido como productoras de estas micotoxinas. Sin embargo, estudios recientes demuestran que otras dos especies, *A. pseudotamarii* y *A. ochraceus*, producen aflatoxinas y en ésta última además esterigmatocistina (Cabañales *et al.*, 2007). Estos hongos, que pertenecen a la sección Flavi, no solo actúan como agentes que deterioran los productos que contaminan, sino también, bajo condiciones propicias del sustrato, humedad y temperatura que se dan durante el almacenamiento, e incluso en el campo; son capaces de desarrollarse y producir aflatoxinas. Se ha demostrado que estos metabolitos secundarios resultan hepatotóxicos, teratógenos, carcinógenos y mutágenos por ingestión crónica. Además del interés sanitario de las aflatoxinas, se debe considerar el interés económico que ocasiona la presencia de éstas en alimentos. Con el fin de minimizar el impacto económico, se invierten grandes cantidades de dinero en el desarrollo e implementación de métodos de prevención y control de la presencia de hongos y aflatoxinas en materias primas y productos alimenticios, así como en métodos analíticos para su detección y cuantificación. Uno de los factores que condiciona el nivel y la síntesis de aflatoxinas es el sustrato, de esta manera se han desarrollado medios de cultivo especiales con elevadas concentraciones de carbohidratos, licor de maíz, extracto de coco, ácidos grasos, entre otros; los cuales favorecen la producción de toxinas para aislar e identificar cepas de hongos aflatoxigénicas y así detectarlas en la misma placa donde se está desarrollando la colonia de hongos.

En la búsqueda de sustancias que ayuden a aumentar la débil fluorescencia de las aflatoxinas se han empleado aditivos como la  $\beta$ -ciclodextrina, encontrando que tiene la propiedad de incrementar la fluorescencia natural de las aflatoxinas debido a su estructura pentaheterocíclica oxigenada con alto grado de insaturación, al observar las cepas bajo luz ultravioleta 365 nm (UV). Otro aditivo utilizado es el desoxicolato de sodio, el cual actúa

como inhibidor de crecimiento micelial de las colonias de hongos, formando alrededor de las cepas aflatoxigénicas un anillo de color beige al ser observadas bajo luz natural (Fente *et al.*, 2002).

Con la finalidad de establecer un método rápido y visual para la identificación de cepas productoras de aflatoxinas, en este trabajo se evaluaron cinco medios de cultivo adicionados con  $\beta$ -ciclodextrina y desoxicolato de sodio; se seleccionaron los tres mejores y se evaluaron en granos de maíz inoculado con cepas productoras, no productoras y un control, determinando por apreciación visual las cepas aflatoxigénicas y no aflatoxigénicas.

## II. ANTECEDENTES

### 1. Hongos en granos y semillas

#### 1.1 Definición

Los hongos son organismos eucariontes heterótrofos, carecen de clorofila, el talo somático de la mayoría está constituido por un conjunto de hifas llamado micelio, sin embargo existen hongos unicelulares como las levaduras. Presentan una pared celular bien definida y se reproducen asexual y sexualmente formando esporas; la respiración es fundamentalmente aerobia, aunque muchos hongos son microaerófilos o anaerobios facultativos, la alimentación es por absorción, su distribución generalmente es cosmopolita pudiendo vivir como saprobios, simbioses o parásitos (Ulloa y Herrera, 1990).

#### 1.2 Clasificación de los hongos que invaden granos y semillas

Los hongos que crecen sobre productos agrícolas, en especial los que invaden granos y semillas durante su desarrollo, cosecha o almacenamiento; han sido clasificados, ecológicamente por Christensen y Kauffman (1969) en tres tipos: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado los cuales se describen a continuación.

##### 1.2.1 Hongos de campo

Los hongos de campo requieren para su desarrollo una humedad relativa entre el 90 y 100% y un contenido de humedad en las semillas de 22 a 23%, con un amplio rango de temperatura entre 0 y 30 °C, aunque algunos pueden desarrollarse a 35 °C o más. Los principales géneros y agentes causales de enfermedades de los cultivos son *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, entre otros. En los cereales, estos hongos persisten si el grano está suficientemente seco como para soportar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente. Cuando en una muestra de grano se aíslan solamente hongos de campo, se pueden inferir dos situaciones: que el grano es recién cosechado o que ha sido bien conservado. Los hongos de campo tienden a desaparecer en periodos de almacenamiento prolongados, pero las micotoxinas no (Moreno, 1988).

### **1.2.2 Hongos de almacén**

Los hongos presentes en los productos almacenados son especies principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos otros xerófilos (Carrillo, 2003). Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de humedad del substrato, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento, así como, la actividad de insectos y ácaros que facilitan la diseminación. Requieren para su desarrollo menor humedad relativa (70 - 90%) y contenido de humedad en las semillas y granos (13.0 - 20% para cereales y 5 -12% para oleaginosas), pero el rango de temperatura es más amplio (0 – 45 °C) y pueden crecer en concentraciones bajas de oxígeno (Christensen y Sauer, 1982). En una muestra de grano si se determina la presencia de una o más especies de hongos de almacén, nos señala las condiciones de humedad a las que se ha almacenado y por la diversidad o abundancia de estos hongos presentes en el grano o semilla se puede inferir el cuidado que se les ha tenido después de la cosecha. Los restos vegetales abandonados en el campo suelen albergar estructuras de resistencia, entre ellas los esclerocios, como en el caso de *A. flavus*, que serán la fuente de contaminación del cultivo en la temporada siguiente (Carrillo, 2003). Así mismo, se ha encontrado que pueden invadir el grano desde el campo, especialmente cuando las condiciones ambientales (sequía, invasión por insectos) favorecen su desarrollo.

### **1.2.3 Hongos de deterioro avanzado**

El tercer grupo de hongos requieren alta humedad relativa superior al 90% para su desarrollo y en la naturaleza se les encuentra colonizando materia orgánica en proceso de descomposición, lo cual es indicativo de que otros hongos han antecedido en la sucesión microbiana. Los géneros causantes de un deterioro avanzado son: *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* y algunas especies del género *Aspergillus*, entre otros. Si los hongos aislados de granos pertenecen a los hongos de deterioro avanzado, quiere decir que existe una mala calidad de esa materia prima (Moreno, 1988; Carrillo, 2003).

### 1.3 Clasificación del género *Aspergillus*

*Aspergillus* es un género que corresponde a la División Deuteromycota, clase Hyphomycetes, orden Moniliales y familia Moniliaceae el cual se reproduce asexualmente por la formación de fialoconidios (Ulloa y Herrera, 1990). Se reconocen alrededor de 180 especies (Pitt, 2000). Algunas especies se reproducen sexualmente, las cuales corresponden a ocho o más géneros teleomórficos. La taxonomía del género más utilizada y completa es la de Raper y Fennell (1965), aunque algunos conceptos han quedado ya obsoletos, el número de especies ha variado considerablemente. Actualmente los grupos se han dividido en siete subgéneros, cada uno de los cuales están subdivididos a su vez en una o más secciones (Cuadro 1). Algunos manuales de laboratorio incluyen claves y descripciones de las especies más habituales en los alimentos. Las especies más importantes como productoras de micotoxinas se encuentran agrupadas en cinco secciones, que se pueden distinguir teniendo en cuenta algunas características, de la macromorfología de las colonias, como el color de los conidios, diámetro de la colonia, aspecto y color micelial, presencia de esclerocios, etc; micromorfología de las colonias: seriación, tipo de vesícula (monoseriada o biseriada), características de los conidios, presencia de células de Hülle, presencia o ausencia de cleistotecios, estructura de la pared cleistotecial, tipo de ascosporas, etc. (Klich, 2002).

**Cuadro. 1** Subgéneros y secciones de *Aspergillus* productoras de micotoxinas

<b>Subgénero</b>	<b>Sección</b>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus, Restricti</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati, Cervini</i>
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes, Versicolores, Usti, Terrei, Flavipedes</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii, Flavi, Nigri, Circumdati, Candidi, Cremei, Sparsi</i>
<i>Stilbothamnium</i>	<i>Stilbothamnium</i>

**Fuente:** Gams *et al.* (1985)

## **1.4 Características de algunas especies de *Aspergillus***

### **1.4.1 *Aspergillus flavus* Link**

*A. flavus* es una especie cosmopolita, está distribuida por todo el mundo. Este hongo coloniza la vegetación que se encuentra en deterioro, granos y semillas, antes y después de la cosecha así como muchos otros sustratos en diversos ambientes. Es un agente carcinógeno muy potente por producir aflatoxinas, se ha distribuido ampliamente en los últimos años en una proporción mayor a la prevista, su distribución se da principalmente en una latitud de los 26 a los 35 grados (Klich, 2002).

### **1.4.2 *Aspergillus parasiticus* Speare**

*A. parasiticus* es una especie de la cual se tienen pocos aislamientos, lo cual se puede atribuir en parte a la falta de investigadores para distinguir *A. parasiticus* de *A. flavus*. Ha sido encontrada en una gran variedad de suelos y frecuentemente en semillas, plantas e insectos, también es productor de aflatoxinas (Klich, 2002).

### **1.4.3 *Aspergillus clavatus* Desmazieres**

Es un hongo con una distribución muy amplia en suelos especialmente en clima caliente. Sin embargo, también se ha encontrado en zonas desérticas, bosques y suelos cultivados en latitudes entre 25 y 36 grados. Se distribuye en una gran variedad de alimentos como cereales almacenados, frutas (manzanas, melocotones, peras, uvas, etc.) y derivados (zumos de fruta) pero más frecuente en la cebada malteada que constituye un ambiente especialmente apto para su crecimiento y esporulación (Klich, 2002).

### **1.4.4 *Aspergillus candidus* Link**

*A. candidus* es una especie comúnmente predominante en regiones tropicales y subtropicales. Se ha encontrado en el suelo, granos, semillas, harina, frutas, otros productos alimenticios y estiércol (Klich, 2002).

#### **1.4.5 *Aspergillus ochraceus* K. Wilhem**

La mayoría de la información de esta especie es principalmente en áreas tropicales (0-15 grados de latitud) en suelos desértico, sin embargo también se ha encontrado en otros suelos, rizósferas de plantas, semillas almacenadas, una amplia gama de alimentos y en el ambiente de casas (Klich, 2002).

#### **1.4.6 *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn**

*A. oryzae* ha sido encontrado en suelo, plantas, semillas y en fábricas de algodón. Esta especie es usada en alimentos fermentados y producción de sake, tofu, miso, salsa de soya y como fuente de enzimas industriales. Se distribuye en suelos tropicales (0-25 grados de latitud) y se ha encontrado con una alta frecuencia relativa en estudios realizados en suelos húmedos (Klich, 2002).

#### **1.4.7 *Aspergillus pseudotamarii* Ito**

Es una especie que presenta características morfológicas y fisiológicas semejantes a *Aspergillus tamarii*; sin embargo en un trabajo relativamente reciente se encontró que una cepa identificada como *Aspergillus tamarii* era productora de aflatoxinas, provocando una revisión de la taxonomía de esta especie en cepas aflatoxigénicas y no aflatoxigénicas. Demostrándose por estudios de genética y morfología las diferencias en cuanto a la producción de aflatoxinas, que los aislamientos caracterizados como *A. tamarii* productores de aflatoxinas corresponden a la especie *A. pseudotamarii* (Ito *et al.*, 2001).

#### **1.4.8 *Eurotium chevalieri* L. Mangin**

*E. chevalieri* es un hongo xerófilo, se ha aislado comúnmente en zonas tropicales y subtropicales entre 26 y 35 grados de latitud. Se encuentra en semillas de algodón y varias clases de alimentos secos (Klich, 2002).

Algunas de estas especies además de causar deterioro en diversos sustratos son productoras de diferentes micotoxinas. En el Cuadro 2 se mencionan los principales metabolitos tóxicos de género *Aspergillus* para el hombre y animales, producidos algunos de ellos en forma frecuente en los alimentos (Klich, 2002).

**Cuadro. 2.** Producción de micotoxinas del género *Aspergillus*

<i>Especies</i>	<i>Producción de micotoxina</i>
<i>A. ochraceus</i>	Emodina, ácido kójico, ocratoxinas, <sup>a</sup> ácido penicílico, ácido secalónico A, xantomegnina, viomelleína, ácido aspergílico, vioxantin.
<i>A. candidus</i>	Candidulina, terfenilina, xantosina.
<i>A. clavatus</i>	Ascladiol, clavatul, ácido kójico, patulina, citocalasina E.
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas, <sup>a</sup> aflavinina, ácido aspergílico, ácido ciclopiazónico, <sup>a</sup> ácido 3-nitropropiónico, paspalinina.
<i>A. oryzae</i>	Ácido 3-nitropropiónico, orizacidina, maltorizina, ácido ciclopiazónico.
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas, <sup>a</sup> ácido kójico, ácidos aspergílicos.
<i>A. tamaraii</i>	Ácido ciclopiazónico, fumigaclavina A.
<i>E. chevalieri</i>	Xantocilina

<sup>a</sup> Toxinas frecuentes en alimentos.

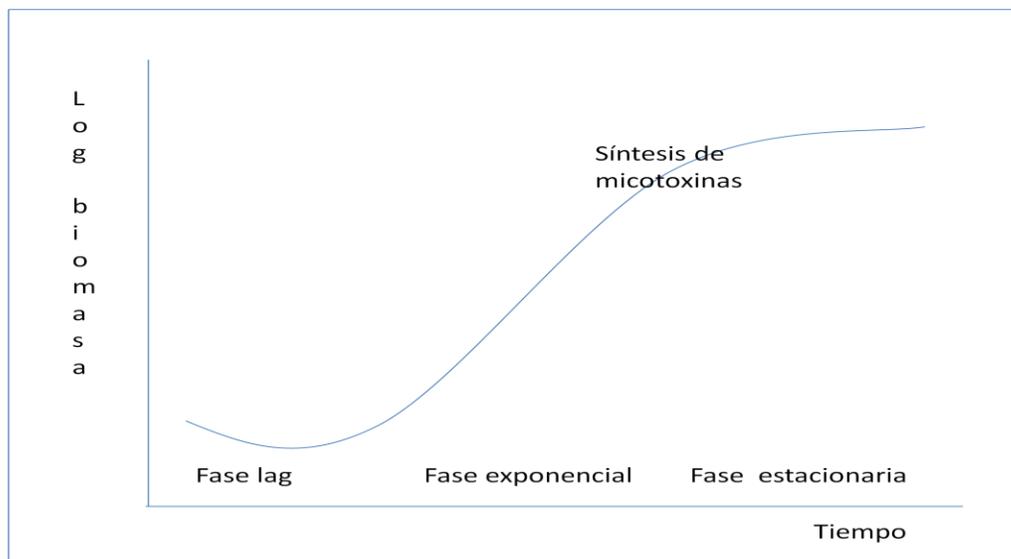
Fuente: Lewis *et al.* (1994)

## 2. Micotoxinas

Los hongos utilizan para su crecimiento sustancias químicas denominadas metabolitos primarios: ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, principalmente. La producción de estos metabolitos se presenta en la fase de crecimiento exponencial (Fig. 1). Los metabolitos secundarios son compuestos que no son esenciales para el crecimiento como son: antibióticos, alcaloides, ácido giberélico, pigmentos y micotoxinas, entre otros. Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que están presentes en una gran parte de los suministros alimentarios mundiales y pueden representar una amenaza potencial para la inocuidad de los alimentos (Soriano *et al.*, 2007). La posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona) en dosis inferiores suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda, dado que algunas de esas sustancias son carcinógenos muy poderosos y la exposición a ellas es muy amplia. Las micotoxinas se

sintetizan cuando la fase de crecimiento llega a su fase estacionaria, siendo a menudo asociada con la diferenciación y la esporulación (ver figura 1).

El interés por las micotoxinas se da en 1960 cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos murieron en Inglaterra a causa de una enfermedad conocida como enfermedad X de los pavos, que se atribuyó a la presencia de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* en harina de cacahuate importada de Sudamérica. Debido a su estabilidad, las micotoxinas pueden persistir aún cuando hayan muerto las esporas. Las micotoxicosis son las intoxicaciones provocadas por micotoxinas (Ruíz y Font, 2007).



Fuente: Soriano *et al.* (2007)

**Figura 1.** Fase de crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas

Las especies de hongos productores de micotoxinas que son de gran importancia desde el punto de vista agroalimentario y que participan en procesos de micotoxicosis naturales son: aflatoxinas, citrinina, fumonisinas, ocratoxina A, patulina, tricotecenos y zearaleonona. Fundamentalmente son producidas por especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, que son los que agrupan un mayor número de especies productoras (Cuadro 3). Estas especies infectan los cultivos y sintetizan las micotoxinas en diferentes productos vegetales antes de su recolección. Sin embargo, existen algunas especies que invaden en el almacén, éstas producen las micotoxinas, o incrementan su producción,

cuando el producto ya se ha recolectado y las condiciones de almacenaje permiten o favorecen su crecimiento.

**Cuadro 3.** Principales géneros productores de micotoxinas y número de especies micotoxígenas

<b>Género</b>	<b>No. de especies micotoxígenas</b>
<i>Penicillium</i>	32
<i>Aspergillus</i>	15
<i>Fusarium</i>	12
<i>Byssochlamys</i>	2
<i>Stachybotrys</i>	2
<i>Trichoderma</i>	2
<i>Alternaria</i>	1
<i>Chaetomium</i>	1
<i>Paecilomyces</i>	1
<i>Rhizopus</i>	1

Fuente: Cabañales *et al.* (2007)

## 2.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas primeramente estudiadas fueron designadas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, debido a su fluorescencia azul (del inglés *blue*, azul, para las designadas B) o verde (del inglés *green*, verde, para las designadas G), respectivamente, en placas de cromatografía de capa fina (Ulloa y Herrera, 1990). Así, *A. flavus*, produce solo aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, y ácido ciclopiazónico, mientras que *A. parasiticus* y *A. nomius* producen aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. En el Cuadro 4 se incluyen también otras dos especies dentro de la sección *Flavi* que han sido recientemente descritas como productoras de aflatoxinas; *A. pseudotamaritii* y *A. bombycis*, la primera especie produce ácido ciclopiazónico (Juan *et al.*, 2007).

**Cuadro 4.** Especies productoras de aflatoxinas

<b>Especie</b>	<b>AFB</b>	<b>AFG</b>	<b>ACP</b>
<i>A. flavus</i>	+	-	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-
<i>A. nomius</i>	+	+	-
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	-

AFB: aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>

AFG: aflatoxinas G<sub>1</sub>, y G<sub>2</sub>,

ACP: ácido ciclopiazónico

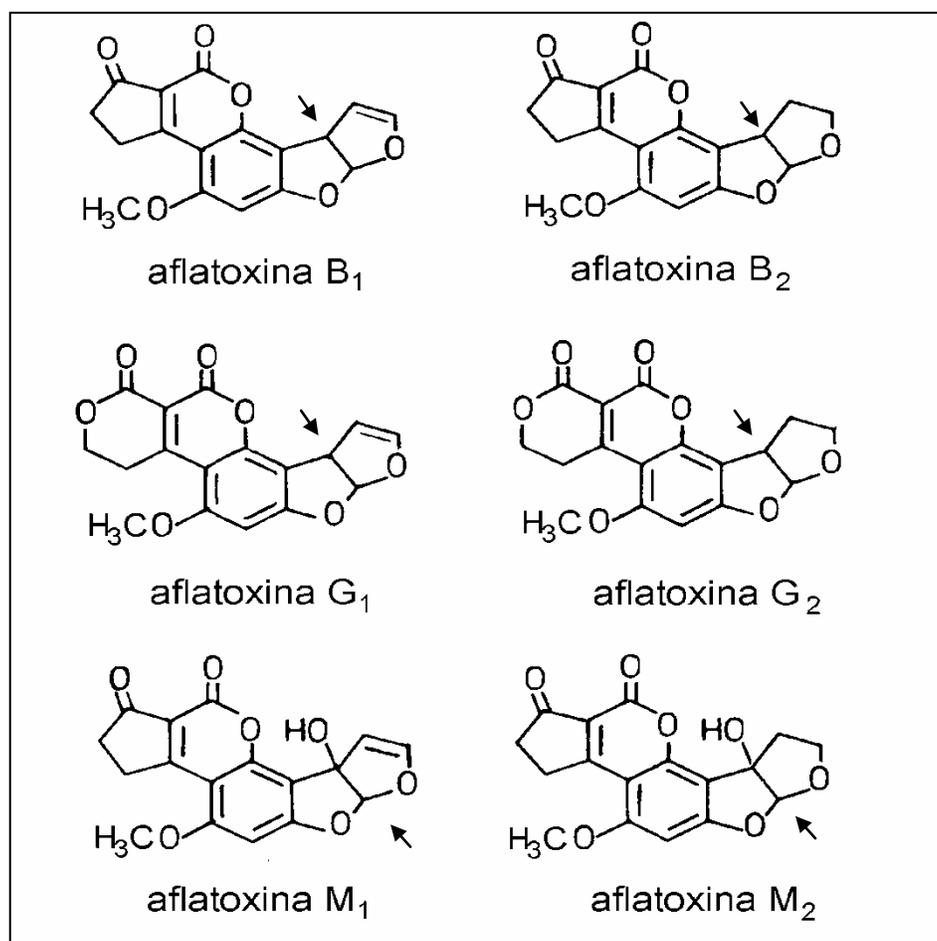
Fuente: Cabañales *et al.* (2007)

Las aflatoxinas del grupo M (del inglés *milk*, leche) son los 4-hidroxiderivados de (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>) las aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, respectivamente. Es una toxina producida por los mohos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* al desarrollarse sobre alimento o forraje para el ganado. Se ha encontrado que las vacas biotransforman una parte de la aflatoxina B ingerida, en su derivado hidroxilado y lo elimina a través de la leche. Se ha reportado que en vacas que han ingerido alimento contaminado con aflatoxina B<sub>1</sub> después de 12 a 24 h se detecta la presencia de aflatoxina M en la leche producida. Sin embargo, la aflatoxina M desaparece de la leche de la vaca a los 2-4 días después de la ingestión de aflatoxina B. Se estima que entre 1-3% de la aflatoxina B ingerida es eliminada en forma de aflatoxina M. En el caso de leche contaminada con aflatoxina M, se observa que el 40-60% de la misma, pasa al queso elaborado a partir de esta leche y sólo el 2% de la misma pasa a la mantequilla obtenida a partir de la leche en cuestión. La aflatoxina M ha sido identificada como carcinogénica en animales, pero se necesitan más evidencias sobre su toxicidad en humanos (Roser y Mestres, 2004).

La presencia de cepas aflatoxigénicas dependerá no solo del genotipo sino también de toda una serie de factores ambientales que van a ejercer su influencia sobre el crecimiento y metabolismo de la misma. Los hongos aflatoxigénicos pueden infectar los cultivos en crecimiento y producir toxinas antes de la cosecha o bien durante la recolección y posterior almacenamiento.

### 2.1.1 Características químicas de las aflatoxinas

Las aflatoxinas son sustancias biogénicas y están estructuralmente relacionadas; químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano que le confiere la toxicidad y configuración tipo lactona responsable de la fluorescencia, los cuales son debidamente señalados (ver figura. 2). Sus pesos moleculares oscilan entre 312u y 350u, la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos como el cloroformo o el metanol. Las aflatoxinas purificadas en forma cristalina son termorresistentes, estables en un rango de pH entre 3 y 10 y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C (Juan *et al.*, 2007).



Fuente: (Juan *et al.*, 2007)

**Figura.2** Aflatoxinas del grupo B, G y M

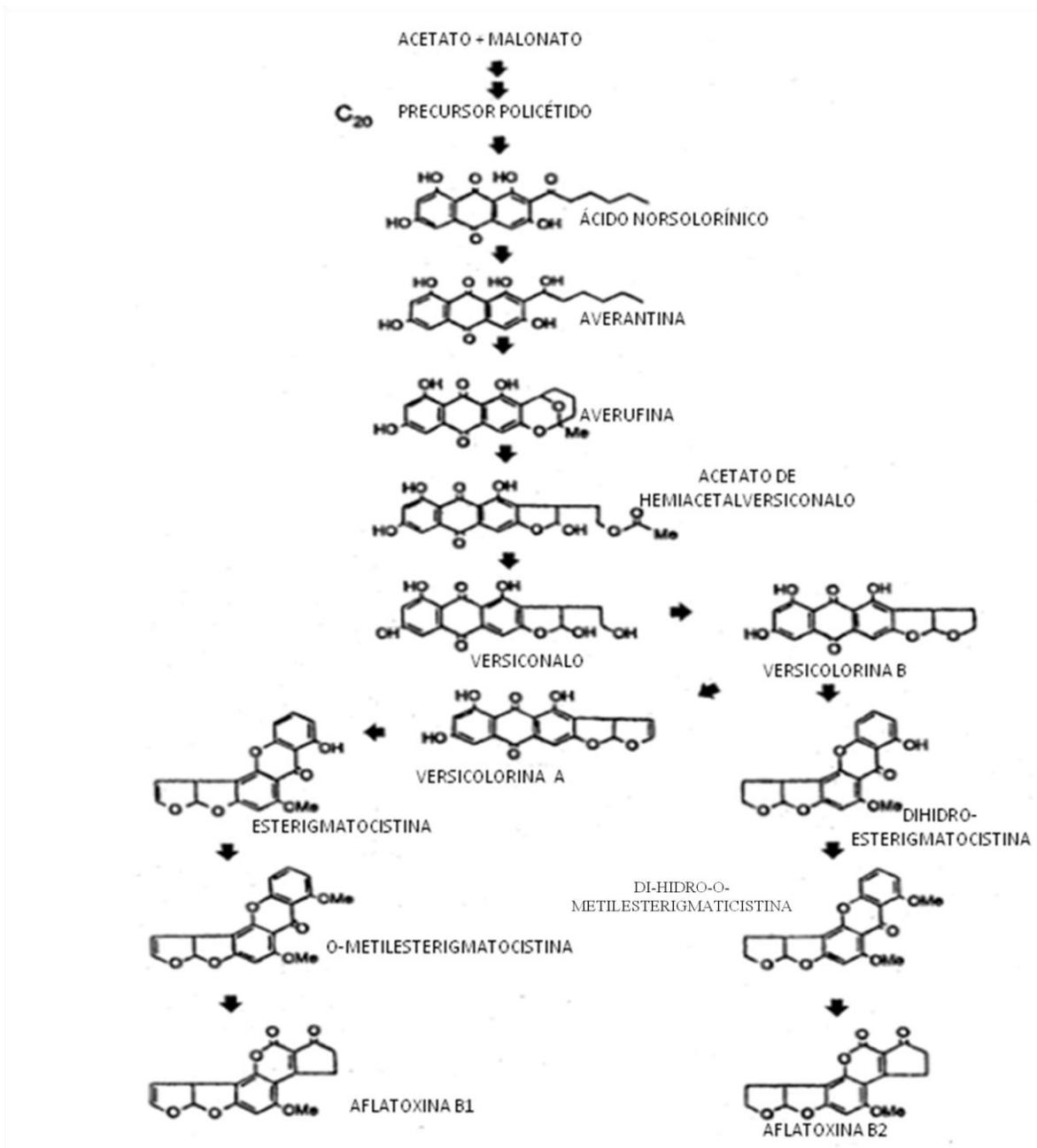
### **2.1.2 Biosíntesis de la aflatoxinas**

La síntesis de las principales cuatro aflatoxinas varía de acuerdo a las características genéticas de las cepas y a las condiciones culturales del crecimiento fúngico.

Casi todos los estudios realizados se han centrado en la biosíntesis de la aflatoxina B.

Se ha encontrado que al inicio del crecimiento del hongo existe poca o ninguna producción de aflatoxinas, pero al reducirse los niveles de fosfatos y nitrógeno en el medio, el metabolismo primario se desorganiza, acumulándose varios metabolitos y a partir de precursores del metabolismo primario se empiezan a sintetizar las aflatoxinas siguiendo la ruta metabólica de los policétidos (Drew y Demian, 1987).

Básicamente los policétidos se sintetizan mediante la carboxilación de acetyl CoA derivado del catabolismo de carbohidratos simples formando manolil CoA, (ver figura. 3), posteriormente tres o más moléculas de manolil CoA se condensan con acetyl CoA y forman una cadena, la cual sufre una ciclización para formar anillos los cuales presentan varios tipos de modificaciones (pérdida o adición de oxígeno de grupos carboxilo, etc.) formando diferentes productos precursores de las aflatoxinas (Payne y Brown, 1998).



Fuente: Bennett *et al.* (1994)

**Figura. 3** Biosíntesis de aflatoxinas

### **2.1.3 Presencia de aflatoxinas en alimentos**

Las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* se aíslan frecuentemente en zonas tropicales y subtropicales y presentan una afinidad especial por frutos de nuez y semillas de oleaginosas. Los cultivos de maíz, semillas de algodón, cacahuete, algunos cereales y especias se encuentran habitualmente contaminados por estas especies. En un alimento, la ausencia del hongo productor de micotoxinas no indica que no pueda contener la micotoxina. Los hongos presentes inicialmente en las materias primas pueden haber dejado de ser viables después de un determinado tratamiento tecnológico (calor), pero las micotoxinas formadas, debido a su termorresistencia, pueden encontrarse. Por otro lado, una cepa potencialmente productora puede estar presente en un alimento, pero no tiene por qué significar que la micotoxina esté presente en el mismo. Esto puede suceder debido a que las condiciones en las que se ha elaborado o mantenido el alimento no son idóneas para que el hongo produzca la micotoxina.

### **2.1.4. Ingesta diaria admisible (IDA)**

Actualmente no es posible eliminar en su totalidad la presencia de aflatoxinas en los productos alimenticios, por lo cual la concentración más baja permitida en la Unión Europea de AFB<sub>1</sub> en alimentos tales como los cereales y ciertos frutos secos, está establecida en 2 µg/kg. De hecho, la AFB<sub>1</sub> es una micotoxina del grupo 1, por lo tanto la dosis debería ser lo más cercano a riesgo cero (Juan *et al.*, 2007).

La FDA (Food and Drug Administration) estimó en 1978 que la IDA de AFB<sub>1</sub> era en promedio de 2.73 ng/kg por día, con un máximo de 9.03 ng/kg por día (Park, 1993).

## **3. Otras micotoxinas**

### **3.1. Ácido ciclopiazónico**

El ácido ciclopiazónico (ACP) es una micotoxina producida por distintas especies del género *Aspergillus* sección *flavi* y de *Penicillium spp.* (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Principales especies productoras de ácido ciclopiazónico (ACP)

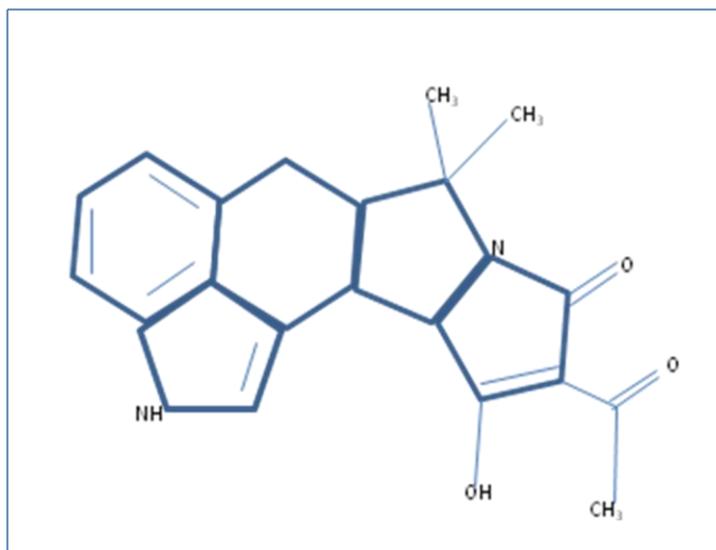
Género	Especie
<i>Aspergillus</i>	sección <i>Flavi</i> <i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. pseudotamarii</i> <i>A. tamarii</i>
<i>Penicillium</i>	subgénero <i>Penicillium</i> sección <i>Penicillium</i> serie <i>Urticicolae</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. dipodomyicola</i>

Fuente: Cabañales *et al.* (2007)

### 3.1.1 Características del compuesto

El ácido ciclopiazónico (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) es un ácido indol tetramínico, cuyo punto de fusión es 245 °C; soluble en cloroformo, metanol, acetonitrilo, diclorometano y dimetilsulfóxido, tiene el aspecto de un polvo blanco, que es higroscópico y estable, cuando se encuentra en lugar seco; y se almacena a 4 °C ( ver figura. 4).

Se aisló e identificó como un metabolito tóxico a partir de *Penicillium cyclopium* Westling, y los primeros datos de contaminación natural por ACP fueron en maíz y cacahuete. Esta micotoxina no se tomó en cuenta durante la famosa epidemia de mortalidad de pavos en Inglaterra, cuando Asplin dio el primer paso hacia el descubrimiento de las aflatoxinas, sin embargo, a *posteriori*, pudo demostrarse que la característica sintomatológica que padecieron los pavos era de origen neurológico (y/o muscular) causada por la presencia simultánea de ambas micotoxinas en el mismo alimento (ACP y aflatoxinas) (Pacin y Resnik., 2007).



**Figura. 4.** Estructura del ácido ciclopiazónico

*A. flavus* fue detectado por Gallagher en 1978 como uno de los principales productores de ACP, por esta razón se investigó la capacidad micotoxigénica de otros *Aspergillus*, aislados de diferentes sustratos alimentarios. En el Cuadro 6 se presenta la capacidad de biosintetizar ACP por diferentes especies del género *Aspergillus*: *A. oryzae*, *A. tamarii* y *A. pseudotamarii*, junto con *A. flavus* (*A. flavus* y *A. parasiticus* son las principales especies productoras de aflatoxinas).

En condiciones óptimas de crecimiento (temperatura 25 °C, actividad de agua de (0,99) se producen 4 a 6 mg de ácido ciclopiazónico/g en medio YES y Czapek-levadura (Gqaleni *et al.*, 1996). Se han encontrado hasta 340 mg de toxina/kg en forrajes y 250 mg/kg en quesos. El ACP, como ocurre para con todas las micotoxinas, es un compuesto químico sintetizado por un organismo biológico, en una matriz alimenticia, pero esta síntesis está influenciada por aspectos ambientales, tales como geográficos, climáticos, de manejo de las variedades o híbridos y condiciones de procesos en la elaboración de alimentos (Pacin y Resnik, 2007).

**Cuadro 6.** Especies del género *Aspergillus* productoras de ACP

Especie del género <i>Aspergillus</i>	Capacidad de producción
<i>A. flavus</i> grupo I	±
<i>A. flavus</i> grupo II	+
<i>A. oryzae</i>	±
<i>A. parasiticus</i>	+
<i>A. tamarii</i>	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+

Fuente: Pacin y Resnik. (2007)

### 3.1.2 Toxicología

En 1983 se realizó el primer estudio sobre la toxicidad de ACP en la ingesta diaria de pollos a diferentes niveles, demostrando la relación dosis-efecto y aspectos bioquímicos. Se demostró que administrada en ratas preñadas no existen efectos teratogénicos, pero retardan el crecimiento en el producto, y en ratones ocasiona abortos. Algunas afecciones en animales como: desórdenes gastrointestinales y neurológicos; cambios degenerativos y necrosis en vísceras (Carrillo, 2003).

### 3.1.3 Presencia en alimentos

El ACP contamina cereales, granos, leche, huevo, tejido visceral y muscular, fruta y alimentos elaborados. La incidencia de micotoxinas implica la identificación y cuantificación de ACP en una determinada matriz biológica. Existen pocos datos sobre la presencia de ACP en diversos alimentos (Cuadro 7), probablemente debido a que la identificación y cuantificación analítica no ha sido resuelta aún satisfactoriamente como con otras micotoxinas (Pacin y Resnik, 2007).

**Cuadro 7.** Presencia de ACP en diversos alimentos

Alimento	Presencia/total de muestras	Promedio (ng/g)
Cáscara de arroz	6/40	22.7
Cáscara de queso	11/20	-
Derivados de maíz	0/27	-
Fruta	2/10	125
Gluten de maíz	0/40	-
Maíz	23/46	212.1

Fuente: Pacin y Resnik. (2007)

**3.1.4 Ingesta diaria admisible**

Es necesario identificar aquellos alimentos que se encuentran contaminados por ACP, así como niveles y frecuencia de contaminación (Cuadro 8). La ingesta diaria admisible (IDA) estimada para el caso del ACP es de 10 µg/kg peso corporal por día, o en 700 µg/día y la presencia de ésta en alimentos.

**Cuadro 8.** Estimación de la exposición (µg/kg pc/día) y porcentaje de contribución a la IDA de ACP, a través de la ingesta de diferentes alimentos en México.

ALIMENTO	IDA (g) <sup>1</sup>	ACP		IDA (%)
		contaminación ng/g	exposición	
Huevo	43.8	267.5	0.2	1.7
Maíz	341.4	212.1	1.0	10.3
Cacahuete	3.3	404.8	0.0	0.2
Fruta	96.7	130.0	17961.0	1.8
Carne de aves	67.7	212.1	0.2	2.1
Tomates	30.4	98.0	0.0	0.4
Leche	345.8	236.0	0.8	8.3

<sup>1</sup> Dato estimado de ensayo experimental

IDA= Ingesta diaria admisible

ACP= Ácido ciclopiazónico

Fuente: Pacin y Resnik. (2007)

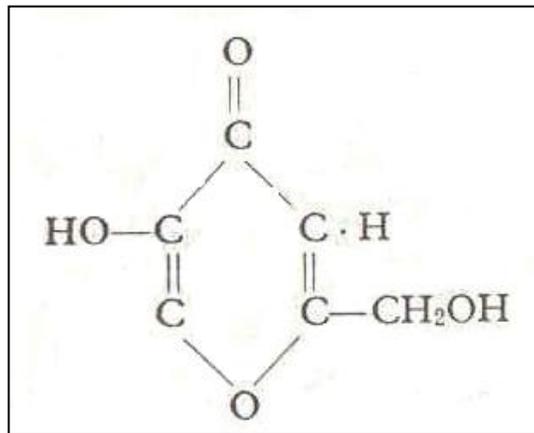
## 3.2 Ácido kójico

### 3.2.1 Características químicas

El ácido kójico fue por primera vez aislado a partir de *Aspergillus oryzae* por Saito (1907), actualmente se ha descubierto que es producido por otras especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Parrish *et al.*, 1956) y gran número de cadenas fúngicas aisladas a partir de alimentos fermentados procedentes de Japón (Kinosita *et al.*, 1968)

La estructura química del ácido kójico (ver figura 5) fue descrita por primera vez por Yabukawa, en 1916 y corresponde al 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona, constituido por agujas prismáticas a partir de acetona, etanol y éter o bien metanol y etil.

Es fácilmente soluble en agua, etanol y acetona. El ácido kójico actúa como un inhibidor competitivo y reversible de la polifenol, xantina y aminoácido oxidasa (Sandoval, 1999).



Fuente: Wikipedia. (2010)

**Figura. 5.** Estructura química del ácido kójico

### 3.2.2 Toxicología

Se requieren grandes cantidades para producir intoxicaciones severas (convulsiones y mutagenicidad) o muerte en animales. Hasta la fecha, no existen casos naturales de micotoxicosis en animales o en humanos (Catalá y Soriano, 2007). Ciertamente no hay casos documentados de la toxicidad humana que se podrían relacionar con la consumición de tales productos. Solo se ha conocido que es tóxico en insectos (Kubicek *et al.*, 1994)

### 3.2.3 Presencia en alimentos

En el Cuadro 9 se presentan las especies productoras de ácido kójico y sustratos donde han sido determinados.

**Cuadro 9.** Incidencia de ácido kójico en alimentos

Micotoxina	Especie productora	Alimentos implicados
ácido kójico	<i>A. candidus</i>	Arroz
	<i>A. flavus</i>	Higo
	<i>A. oryzae</i>	Maíz
	<i>A. parasiticus</i>	Soya
	<i>A. tamaraii</i>	Trigo
	<i>A. fumigatus</i>	Trigo
	<i>A. nidulans</i>	Trigo

Fuente: Catalá y Soriano. (2007)

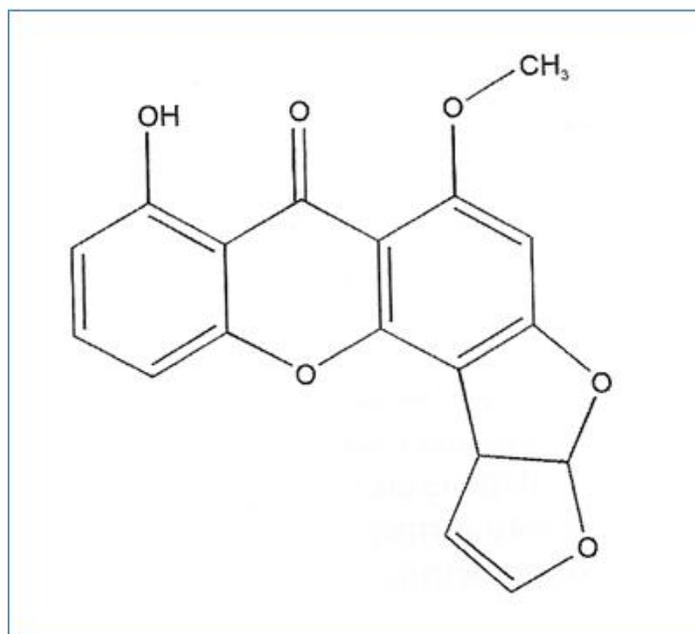
### 3.2.4 Ingesta Diaria Admisible

La DL<sub>50</sub> es de 1.031 mg/kg (oral), 500 mg/kg (intravenosa), entre 1.176 y 1.764 mg/kg (intraperitoneal).

## 3.3 Esterigmatocistina

### 3.3.1. Características químicas

La esterigmatocistina se aisló por primera vez en 1954 de cultivos de *A. versicolor* (ver figura 6). La producción óptima de esta micotoxina se da con una  $a_w$  de 0.92-0.93. Es un precursor de las aflatoxinas B<sub>1</sub> como de la G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. Son estables en soluciones de amonio al 2% mientras que las aflatoxinas no. Es una micotoxina de interés pues tiene relación estructural con la aflatoxina, por el anillo 7,8-dihidrofurano (2,3-b) furano, el cual está unido, en la esterigmatocistina, con la xantona hidroximetil-sustituída. Es un metabolito de especies de *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. sydowi* y *A. nidulans*), así como de *Bipolaris*, *Chaetomium* y *Emericella spp.* (Magan y Olsen, 2004).



Fuente: Catalá y Soriano. (2007)

**Figura. 6** Estructura química de la esterigmatocistina

### 3.3.2 Toxicología

Presenta una toxicidad aguda relativamente baja. Está relacionada con los carcinomas gástricos, hepáticos y esofágicos. A nivel celular, esta micotoxina tiene efectos inhibitorios sobre la síntesis de ADN. De hecho la presencia de esta micotoxina en los alimentos es baja (Cuadro 10), excepto en algunas zonas de China donde presentan alta relación de cáncer de estómago e hígado frente a otras zonas de bajo riesgo (45% vs 15%) con valores de 20 µg/kg vs 12 µg/kg, respectivamente (Catalá y Soriano, 2007).

### 3.3.3 Presencia en alimentos

La presencia de la esterigmatocistina en alimentos ha sido estudiada en Inglaterra, Canadá, Brasil, Italia y Dinamarca, y aparentemente es baja; sin embargo en China se ha analizado mediante la técnica de ELISA y la concentración encontrada es mayor, y está ligado a problemas de cáncer de hígado y estómago, contra áreas de bajo nivel de presencia (45% contra 15% en niveles mayores a 20 µg/kg) y un promedio de 20 µg/kg contra 12 µg/kg. Se ha encontrado en bajas concentraciones en queso contaminado con *A. versicolor*. Los límites para su detección, por métodos cromatográfico, son del orden de 20 µg/kg, y la esterigmatocistina no es tan fluorescente como la aflatoxina. Algunos métodos

competitivos de ELISA han sido aplicados para analizar cebada, trigo y otros cereales por Magan *et al.*; Lou *et al.*; y Li *et al.* (Magan y Olsen, 2004).

**Cuadro 10.** Incidencia de esterigmatocistina en alimentos

<b>Micotoxina</b>	<b>Especie productora</b>	<b>Alimentos implicados</b>
Esterigmatocistina	<i>A. versicolor</i>	Arroz
	<i>A. flavus</i>	Cebada
	<i>A. sydowi</i>	Cereales del desayuno, granos de café,
	<i>A. nidulans</i>	Hinojo, jamón, maíz, pimienta, queso, soya y trigo.

Fuente: Catalá y Soriano. (2007)

### 3.3.4 Ingesta diaria admisible

Esta toxina es un mutágeno *in vivo* y un cancerígeno humano potencial, por lo que el Departamento de Salud del Reino Unido estableció que no debe detectarse en los alimentos considerando que el límite de detección de las técnicas analíticas es 3 mg/kg. La dosis letal oral (DL50) para pollo, rata y laucha es 10-14, 120-166 y 800 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Carrillo, 2003).

## 4. Factores determinantes en el desarrollo de hongos y producción de micotoxinas

Los factores que influyen en el desarrollo de hongos y la síntesis de micotoxinas en alimentos los podemos dividir en factores intrínsecos y factores extrínsecos (Sanchis *et al.*, 2007), a continuación se describen cada uno de ellos.

### 4.1 Factores intrínsecos

Están relacionados con la composición del sustrato y/o alimento, actividad de agua y pH.

#### 4.1.1 Sustrato

Las fuentes de carbono influyen en la síntesis de micotoxinas, en experimentos *in vitro* se ha obtenido una mayor producción de micotoxinas, cuando se añade azúcar fermentable al medio de cultivo como glucosa o sacarosa, cuando se emplea fructosa, maltosa, manosa, galactosa, xilosa o arabinosa no se obtienen los mismo resultados.

#### 4.1.2 Actividad de agua

La actividad de agua ( $A_w$ ) es uno de los factores determinantes para el crecimiento fúngico. Microbiológicamente la  $A_w$  se usa como medida de disponibilidad de agua por parte de los microorganismos para su desarrollo, ya que dicha medida es independiente del sustrato o alimento al que se refiere, contrariamente lo que ocurre cuando se utiliza la humedad como parámetro. Las aflatoxinas, sin embargo, se producen en intervalos 0.95-0.99  $a_w$ , aunque se ha encontrado un mínimo de 0.71  $a_w$  para *A. flavus* (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Actividad de agua óptima para el desarrollo de algunas especies del género *Aspergillus*

Especie	Actividad de agua	
	Mínimo	Óptimo
<i>A. candidus</i>	0.74-0.79	0.98
<i>A. ochraceus</i>	0.76-0.84	
<i>A. clavatus</i>	0.88	
<i>A. flavus</i>	0.71-0.74	0.98
<i>A. oryzae</i>	0.74	
<i>A. parasiticus</i>	0.71	

Fuente: Kozakiewicz y Smith. (1994)

#### 4.1.3 Influencia del pH

Los hongos pueden crecer en intervalos de pH de 3 a 8, el grado óptimo es cercano a 5, pero el cambio de valor de pH de un sustrato o alimento puede alterar la respuesta fúngica. En las especies de *Aspergillus*, su crecimiento se ve menos afectado a valores de pH alcalinos, así mismo, se ha comprobado que en *A. parasiticus* a un pH inicial menor de 6.0, favorece la síntesis de aflatoxinas del grupo B, y a valores de pH superiores a 6.0, se favorece la síntesis de aflatoxinas del grupo G.

## 4.2 Factores extrínsecos

Están relacionados con los factores físico-químicos como la temperatura de almacenamiento, humedad relativa, concentración del oxígeno, presencia o ausencia de luz, etc.

### 4.2.1 Temperatura

Los mohos se desarrollan en un intervalo amplio de temperatura, por lo cual las condiciones más apropiadas para el desarrollo de estos microorganismos y la producción de micotoxinas son durante su formación en el campo, transporte y almacenamiento, pudiendo conducir a la contaminación de las materias primas utilizadas para la industria alimentaria (Cuadro 12). Al ser almacenada la materia prima en malas condiciones aumenta el riesgo del desarrollo de estos microorganismos y formación de sus toxinas. Para el caso de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* se ha encontrado que crecen desde temperaturas de 10 °C, siendo la óptima de 32-33 °C. Las aflatoxinas se sintetizan entre 12 y 40 °C.

**Cuadro 12.** Temperatura óptima para el desarrollo de algunas especies del género *Aspergillus*

Temperatura (°C)		
Especie	Rango	Óptima
<i>A. clavatus</i>	may-42	25
<i>A. candidus</i>	mar-44	25-32
<i>A. ochraceus</i>	dic-37	27
<i>A. flavus</i>	6-45	25-37

Fuente: Kozakiewicz y Smith. (1994)

### 4.2.2 Oxígeno

La mayoría de los hongos filamentosos son aerobios estrictos. Sin embargo, existen algunos hongos microaerófilos en donde la concentración mínima de O<sub>2</sub> para permitir su desarrollo puede ser muy baja, cercana al 1% o incluso inferior. El crecimiento de los hongos es bueno en concentraciones de CO<sub>2</sub> al 20% (Tabak y Cooke, 1968). Sin embargo

la producción de aflatoxinas en concentraciones superiores al 10% se inhibe (Landers *et al.*, 1967). La máxima producción de aflatoxinas depende no solo de la cepa del hongo sino también de la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, en combinación con la actividad de agua, pH y la temperatura de almacenamiento (Ellis *et al.*, 1993).

#### **4.2.3 Luz**

Los efectos de la luz sobre la esporulación para *A. flavus* y *A. parasiticus* han sido estudiados por Bennett *et al.* (1978) quienes reportaron que la formación de conidios y conidióforos fueron más abundantes en los hongos expuestos a la luz. Igualmente, observaron que la región azul de la luz blanca fue más efectiva en la fotorespuesta de los hongos. También encontraron que la fotorespuesta de los hongos es influenciada por la temperatura, la cual afecta la producción de aflatoxinas. Sin embargo, ellos demostraron que la producción de aflatoxinas es inhibida por la luz, a temperaturas bajas y altas, pero no para las temperaturas intermedias, entre 20 y 25 °C probadas en este estudio. El tipo de sustrato también afecta la fotorespuesta y producción de aflatoxinas. (Joffe y Lisker, 1969) señalaron que la producción de aflatoxinas fue inhibida en medio Czapek en presencia de la luz. La intensidad de la luz juega un papel importante en la destrucción de las aflatoxinas; Shantha *et al.* (1986) observaron un incremento en la degradación de aflatoxina B<sub>1</sub> con el incremento de la intensidad de luz.

#### **4.2.4 Humedad relativa**

La humedad relativa (HR) es la cantidad de agua de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HR se expresa en porcentaje y varía de unos alimentos a otros conforme su riqueza en hidratos de carbono o en materia grasa. Cualquier semilla almacenada en estado de equilibrio con una HR por debajo de 65%, está segura de no ser invadida por hongos.

### **5 Métodos utilizados para determinar aflatoxinas**

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones

sanitarias; establece el límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos, dicha norma establece que la contaminación no debe exceder de 20 µg/kg de aflatoxinas totales en granos y cereales para consumo humano. En granos y cereales para consumo animal se aceptan concentraciones de 21-300 µg/kg. La diferenciación entre las especies de cepas productoras de aflatoxinas y no productoras puede efectuarse analizando la producción de estos metabolitos secundarios utilizando las diferentes metodologías establecidas por dicha norma: método cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), fluorimetría, inmunoafinidad.

### **5.1 Métodos basados en técnicas cromatográficas**

Desde 1961, fecha en la que se descubrieron las aflatoxinas, la cromatografía de capa fina (Thin-Layer Chromatography, por sus siglas en inglés TLC) ha sido uno de los métodos de elección para la investigación y determinación de micotoxinas. En la TLC normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar, siendo los componentes de las muestras, con características más polares, arrastrados más despacio y permitiendo la separación de las micotoxinas a analizar.

Durante la década de los 80, se desarrolló la cromatografía de capa fina de alta resolución [*High-Performance Thin Layer Chromatography*, (HPTLC)] con desarrollo bidimensional, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

La cromatografía de gases [*Gas Chromatography*, (CG)] es una técnica basada en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria (Soriano *et al.*, 2007).

### **5.2 Métodos basados en técnicas inmunológicas (ELISA)**

Se han desarrollado métodos de detección de toxinas en hongos micotoxigénicos basados en la utilización de técnicas inmunológicas empleando anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra antígenos más o menos específicos de especies potencialmente productoras de micotoxinas. El problema de estos anticuerpos es que pueden dar reacciones cruzadas con otras especies fúngicas debido a la falta de

especificidad de los antígenos o anticuerpos elegidos, son incapaces de discernir entre cepas productoras o no productoras de micotoxinas de una misma especie. La técnica más utilizada de inmunoensayo enzimático sobre fase sólida es ELISA (*Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay*) (Cabañales *et al.*, 2007).

### **5.3 Cromatografía de inmunoafinidad**

Es un método que establece la detección de contaminación de aflatoxinas utilizando columnas de inmunoafinidad y la cuantificación, usando tanto los métodos fluorométricos como por HPLC. El método de cromatografía de líquidos (HPLC) es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial (AOAC, Association of Official Analytical Chemists, International 991.31) y como método de referencia para algunas micotoxinas.

Esta metodología cumple con los requisitos de análisis establecidos por el gobierno mexicano para usarse en la determinación de aflatoxinas en granos y cereales utilizados para el consumo humano y animal.

### **5.4 Métodos basados en técnicas de análisis del DNA**

Avances técnicos importantes han estimulado el uso de técnicas moleculares que son universalmente aplicables, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que ha permitido el análisis molecular de células fúngicas o aún esporas, material seco, u organismos extintos, como también a la sección de oligonucleótidos específicos para hongos, que han proporcionado el acceso fácil a las secuencias del ADN. Estos estudios en hongos apuntan a: estudios filogenéticos, taxonómicos, sobre todo a nivel de género y de especie (Gómez, 2008).

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

Se han probado medios de cultivo especiales para aislar e identificar a los hongos que favorecen la producción de las micotoxinas, y su presencia se puede detectar en la misma placa donde se está desarrollando la colonia de hongos mediante la aplicación de luz UV.

Si solamente se desea determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* se suele sembrar sobre el medio agar *Aspergillus flavus parasiticus* (AFPA), que es selectivo para dichas

especies. Otras especies del género *Aspergillus* se suelen sembrar en placas de malta-glucosa, Czapek-levadura, Czapek-glicerol o Czapek-20% sacarosa para su identificación (Cabañales *et al.*, 2007).

A continuación se mencionan algunos autores que han propuesto el uso de aditivos en los medios de cultivo para aumentar la débil fluorescencia natural de las aflatoxinas y poderlas identificar fácilmente.

Hara *et al.* (1974) propusieron modificar un medio de cultivo para la identificación de cepas aflatoxigénicas mediante el uso de Czapek sin fuente de nitrógeno, eliminando el  $\text{NaNO}_3$  y adicionándolo con licor de maíz, en otro utilizaron  $\text{HgCl}_2$  y  $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$  como fuente inorgánica de nitrógeno. Se obtuvieron resultados a partir del día séptimo hasta el décimo día, siendo evaluadas las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas visualmente bajo luz ultravioleta y los resultados fueron confirmados por el método de cromatografía de capa fina; encontrando que el mejor medio de cultivo es al que se le adicionó  $\text{HgCl}_2$  y  $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$  como fuente inorgánica de nitrógeno, ya que se observó una mayor intensidad en la fluorescencia de las aflatoxinas. El adicionado con licor de maíz no es recomendable ya que se encontró que contiene compuestos que muestran una fluorescencia similar a las que emiten las aflatoxinas.

Davis *et al.* (1987) utilizaron dos medios de cultivo para la identificación de cepas aflatoxigénicas, los cuales estaban compuestos por medio Czapek adicionado con licor de maíz (APA) y otro que contenía extracto de coco (CAM), obteniéndose un mayor crecimiento de las cepas en estudio en el medio CAM, pero menor fluorescencia, se observaron las cepas bajo luz UV 365 nm al reverso de la placa a partir del segundo al quinto día, se recomendó el uso de este medio por su fácil elaboración, es menos caro y más simple.

Lemke *et al.* (1989), propusieron la utilización de agar extracto de coco con la adición de desoxicolato de sodio al 0.8%, el cual disminuye el crecimiento de la colonia; lo que permitió la detección de cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* diferenciando así a las cepas aflatoxigénicas con una fluorescencia azul bajo luz UV a 365 nm, obteniendo resultados a partir del tercer al séptimo día de incubación a 25 °C con un diámetro de 3 a 10 mm.

Fente *et al.* (2001), desarrollaron otros medios de cultivo para la identificación de cepas aflatoxigénicas con la adición de un derivado metilado de  $\beta$ -ciclodextrina, los cuales fueron: extracto de levadura sacarosa (YES), Sabouraud (SB), medio para habilitar la producción de aflatoxinas (APA) y Czapek (CZ); la producción de aflatoxinas se determinó visualmente por la presencia de fluorescencia color azul-verde alrededor de la colonia observada bajo luz UV (365nm) después del tercer día de incubación a 28 °C. La presencia de aflatoxinas fue confirmada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Un año después Ordaz *et al.* (2002) describen un método simple, rápido y confiable para observar la producción de aflatoxinas en medio YES, CZ, APA, agregando un derivado metilado de  $\beta$ -ciclodextrina al 0.3% más desoxicolato de sodio al 0.6%. La detección fue fácilmente observada por la formación de un anillo beige alrededor de la colonia a partir del tercer día de incubación a 28 °C. Cuando fue examinado bajo luz UV observaron una fluorescencia azul y la producción de aflatoxinas fue confirmada por el método de HPLC. Atanda *et al.* (2005) utilizaron un sustrato de grano de palma (PKA) para la rápida identificación de cepas aflatoxigénicas obteniendo resultados después de 44 a 52 hrs de incubación.

En otro trabajo realizado por Fente *et al.* (2006) utilizaron 12 medios de cultivo, a los cuales se adicionaron metil- $\beta$ -ciclodextrina de 0.3 al 2% y desoxicolato de sodio al 0.6%, estos autores demostraron que es posible inducir la fosforescencia de compuestos aromáticos usando ciclodextrina y desoxicolato de sodio, ya que estas sustancias previenen la difusión de las moléculas de oxígeno hacia el microambiente donde existe fósforo. La máxima fluorescencia se detectó al cuarto día y se mantuvo hasta el décimo día. La mejor concentración de ciclodextrina fue del 0.2%, y 0.6% de desoxicolato de sodio. Aghamohammadi y Alizadeh. (2007) emplearon tres tipos de ciclodextrina:  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD),  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ -CD) y heptakia-2,6-dimetil-o- $\beta$ -ciclodextrina (ome-CD), para encontrar el tipo de comportamiento en la asociación de los complejos de ciclodextrina con la aflatoxina B<sub>1</sub>, demostrando que la ciclodextrina provee un aumento a la fluorescencia de AFB<sub>1</sub>. En relación a la fluorescencia encontraron que  $\alpha$ -ciclodextrina es de mayor intensidad, mientras que la  $\beta$ -ciclodextrina y ome-CD son más estables.

## 6 Ciclodextrinas

### 6.1 Historia

Fueron aisladas por primera vez en 1891 por Villiers. Schardinger los identificó como oligosacáridos. Entre 1911 y 1935 el químico alemán Pringsheim demostró que podían formar complejos de inclusión ya que la molécula exteriormente es hidrofílica y en su cavidad interior hidrofóbica donde pueden acoger moléculas orgánicas no polares (Wikipedia, 2010).

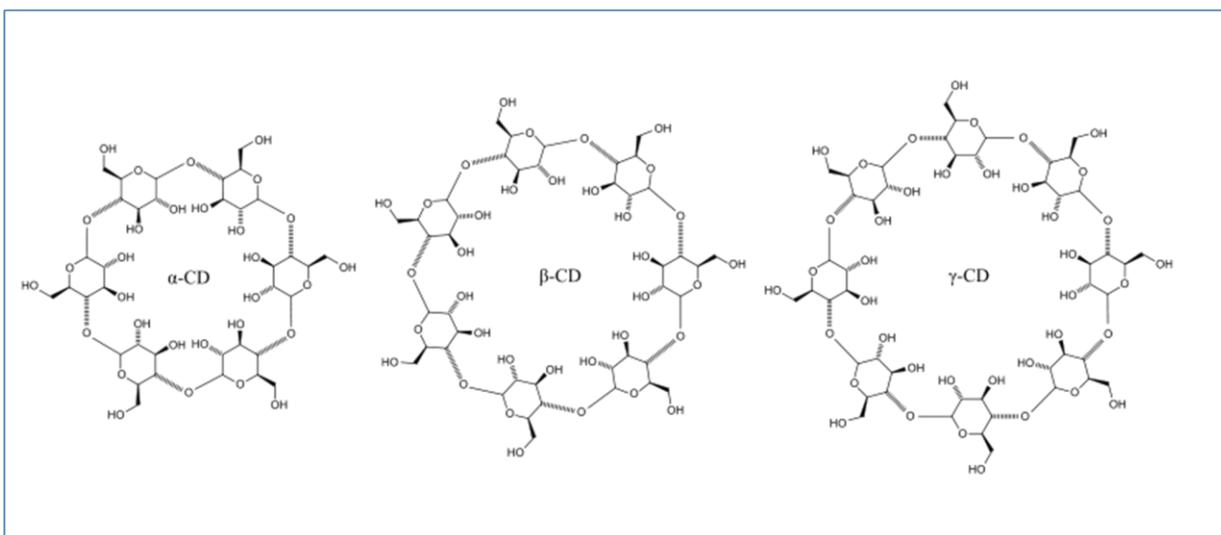
### 6.2 Nomenclatura

Según el número de unidades de glucosa que forman la ciclodextrina se denomina con una letra griega diferente (ver figura. 7):

$\alpha$ -Ciclodextrina:  $n = 6$  moléculas de glucosa (diámetro/altura de la cavidad: 4,7..5,3/7,9 Å).

$\beta$ -Ciclodextrina:  $n = 7$  moléculas de glucosa (diámetro/altura de la cavidad: 6,0..6,5/7,9 Å).

$\gamma$ -Ciclodextrina:  $n = 8$  moléculas de glucosa (diámetro/altura de la cavidad: 7,5..8,3/7,9 Å).



Fuente: Wikipedia. (2010)

**Figura. 7.** Estructura química de ciclodextrinas

### **6.3 Características**

Las ciclodextrinas son moléculas formadas por acción de la enzima ciclodextrin-transglicolasa sobre los dextranos. La propiedad más característica de estos oligómeros es su notable capacidad de formar complejos de inclusión con una amplia variedad de moléculas en su cavidad interna.

Las ciclodextrinas se obtienen en la degradación enzimática del almidón. El almidón más utilizado como materia prima es el del maíz.

El principal propósito en la síntesis de las ciclodextrinas es obtener un producto uniforme que contenga el máximo porcentaje del número de moléculas de glucosa por unidad deseado ya que las aplicaciones dependen mucho del tamaño de la cavidad. La fluorescencia natural de las aflatoxinas se deriva de su estructura pentaheterocíclica oxigenada. Resultados experimentales han revelado que la  $\beta$ -ciclodextrina y sus metil derivados poseen excelentes cavidades para exaltar la respuesta fluorescente de las aflatoxinas por medio de la formación de complejos de inclusión. En un trabajo realizado por Rojas (2004) adicionó  $\beta$ -ciclodextrina a cinco diferentes medios de cultivo, utilizando cepas representativas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas, dando como resultado el aumento en la respuesta fluorescente de estas toxinas.

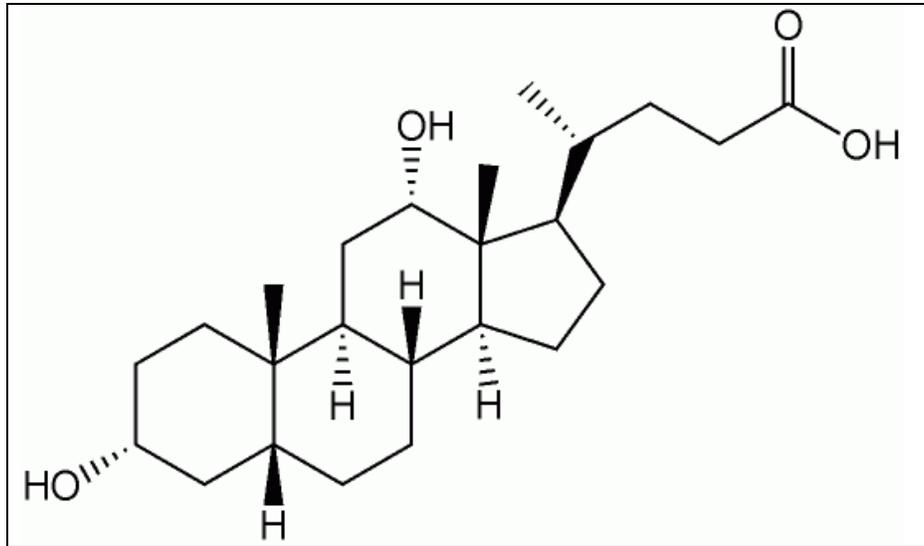
## **7 Desoxicolato de sodio**

### **7.1 Características**

El desoxicolato de sodio es la sal sódica del ácido desoxicólico, soluble en agua y al igual que otras sales biliares inhibe microorganismos formadores de esporas por lo que se utiliza en medios selectivos, como el agar desoxicolato-citrato y el agar desoxicolato-citrato modificado. Cuando es puro se presenta en forma de polvo cristalino de color blanco o casi blanco, con el punto de fusión en 174-176 °C. El ácido desoxicólico es uno de los cuatro principales ácidos producidos por el hígado.

El ácido desoxicólico es conocido también como desoxicolato de sodio, ácido colanoico y 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colanato (ver figura 8).

Fórmula química:  $C_{24}H_{39}NaO_4$ . Peso molecular 424.57, Acido cólico 45% mínimo. Pérdida al secado 4.9%. pH en solución al 2% 7.8



Fuente: Dibico, (2010)

**Figura.8.** Estructura química de desoxicolato de sodio

## 8. Maíz

### 8.1 Origen e historia

El cultivo del maíz tuvo su origen en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta el Canadá y hacia el sur hasta la Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y nutrición. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España (FAO, 1993).

El cultivo del maíz es considerado uno de los principales rubros en el ámbito nacional y mundial, por la importancia que representa este cereal en la dieta alimenticia de las personas y animales, las grandes extensiones de tierras cultivadas, así como la gran cantidad de empleos directos e indirectos que genera en toda su cadena de producción, procesamiento industrial y su comercialización desde la siembra hasta que es consumido por las personas (Jeglay y Cruz, 2006).

## **8.2 Clasificación taxonómica del maíz**

Orden: Ciperales

Familia: Poaceae

Tribu: Maydae

Género: *Zea*

Especie: *mays* L.

Nombre vulgar: maíz

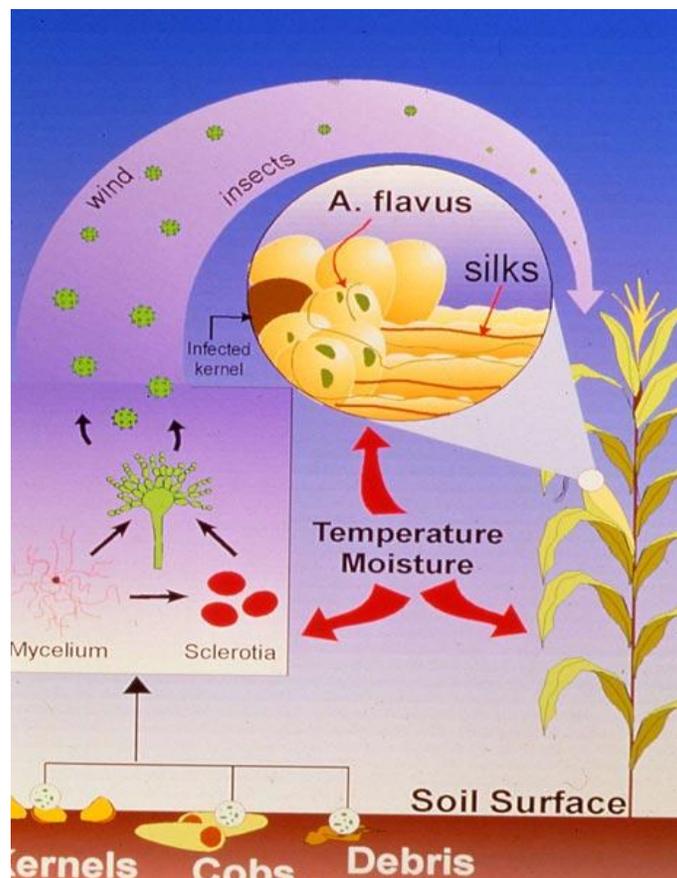
## **Descripción botánica**

La planta del maíz es de porte robusto, de fácil desarrollo y de producción anual. Existen variedades de maíz forrajero y para producción de grano. El maíz para grano se puede clasificar como: granos de color blanco para la elaboración de cereales; granos con alto contenido de azúcar para la alimentación humana; granos con alto contenido de aceite para la industria aceitera; granos con alto contenido de proteína y de lisina para la industria y la alimentación humana, y granos con mayor proporción de almidón duro o cristalino que se utilizan para elaborar rosetas o palomitas (Infoagro, 2010).

## **9. Hongos y micotoxinas en maíz**

La inocuidad de los alimentos utilizados por el hombre es un tema cada vez más importante a nivel mundial. Muchos tipos de contaminantes pueden estar presentes en prácticamente todos los tipos de alimentos, incluyéndose los granos y sus derivados (ver figura. 9). Los hongos que colonizan los granos del maíz, los cuales, bajo ciertas condiciones, pueden producir crecimientos mohosos visibles causándoles un grave deterioro. El daño físico no lo es todo, ya que algunas especies de hongos especialmente *Aspergillus* y *Penicillium*,

son capaces de producir micotoxinas afectando a los humanos o animales que consuman los alimentos contaminados. La presencia de aflatoxinas es inevitable en algunos lotes de maíz, dadas las condiciones en las que las micotoxinas se forman, tanto en la planta en pie, en el campo, como durante estados posteriores: cosecha, transporte, almacenamiento y utilización. Además, la presencia de aflatoxinas en este cereal no está limitada a una región climática o geográfica y no se encuentran en todo el maíz que se produce o se almacena (García *et al.*, 2001). Las aflatoxinas son de las toxinas más peligrosas, habiéndose demostrado que el consumo repetido de dosis bajas tiene un efecto mutagénico, teratogénico y cancerígeno en animales controlados de laboratorio, además de ser tóxicas a dosis altas. El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas ha sido correlacionado con cáncer hepático de algunas poblaciones humanas de África y Asia (aspergillusflavus.org, 2010).



Fuente: aspergillusflavus.org. (2010)

**Figura. 9.** Ciclo de enfermedad de *Aspergillus flavus* en maíz

La inocuidad de los granos de maíz y los posteriores subproductos que de ellos se elaboren es elemental. Por tanto, diversas agencias gubernamentales de muchos países, importadores o exportadores de maíz, involucradas en la sanidad de los alimentos, establecieron restricciones para algunas micotoxinas en la cadena alimentaria (Bucio *et al.*, 2003).

El maíz es el cereal básico para la alimentación en nuestro país y asimismo, constituye una importante fuente de empleos durante los procesos de producción, empaque, industrialización y comercialización. Las importaciones de este grano representan un alto riesgo para la agricultura mexicana, es necesario establecer medidas fitosanitarias que impidan la introducción de semillas que puedan ser transmisoras de enfermedades y plagas. Que de igual manera, se deben establecer las regulaciones fitosanitarias para prevenir la introducción y diseminación de enfermedades y plagas cuarentenarias del maíz en las principales regiones productoras del país. Para alcanzar los objetivos antes señalados, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-018-FITO-1995, en donde se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas y enfermedades del maíz.

En México se tienen datos sobre algunos periodos de cultivo de maíz, en los cuales se detectó contaminación con aflatoxinas. Así, en Tamaulipas, en 1989, se observó que el maíz estaba contaminado desde el campo, ya que muestreos previos a su almacenamiento reflejaron concentraciones de 45-65  $\mu\text{g}$  de  $\text{AFB}_1/\text{kg}$ . El mismo maíz, después de estar almacenado dos meses en condiciones de alta temperatura y humedad, alcanzó concentraciones de más de 250  $\mu\text{g}$  de aflatoxina  $\text{B}_1/\text{kg}$ . México es un país importante como productor y consumidor de granos, la contaminación del maíz con aflatoxina representa un riesgo potencial para la población, debido principalmente a que es un alimento básico (Bucio *et al.*, 2003).

## **10. Importancia socioeconómica**

En México la información disponible sobre la importancia y el impacto de salud y económico de las aflatoxinas es escasa; sin embargo, varios de los estados productores de grano en México poseen características climáticas que favorecen la presencia y el crecimiento de los hongos productores de micotoxinas. El maíz es un cereal de gran importancia a nivel mundial, para el año 1995 la demanda mundial de maíz era de 558

millones de toneladas y se estima que para el año 2020, esta demanda se aproximará a los 837 millones de toneladas, superando para ese momento la demanda mundial de trigo y arroz. En nuestro país se consumen 234 g de maíz como tortilla al día per capita y en zonas rurales el consumo llega a ser de 600 g per capita al día. En la dieta representa el 38.8% de proteína, el 45.2 % de calorías y el 49.1% del calcio (Rojas Molina *et al.*, 2007). En los cuadros 13 y 14 se presentan los avances de la producción de maíz durante los ciclos agrícolas primavera-verano y otoño-invierno 2007-2008 de los principales estados productores en la República Mexicana.

**Cuadro 13.** Avance de la producción de maíz, de riego y temporal, durante ciclo agrícola primavera verano 2007-2008 en México.

Estado	Superficie (ha)			Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
	sembrada	cosechada	siniestrada	obtenida	Obtenido
Aguascalientes	50,375	6,978	965	13,309	1.907
Baja California Sur	2,570	1,039	28	6,061	5.835
Campeche	156,113		69,584		
Coahuila	31,420	3,358	140	7,805	2.325
Colima	13,408	5		13	2.6
Chiapas	561,418	40,434	4,914	51,381	1.271
Chihuahua	278,654	68,037	27,732	247,252	3.634
D. F	6,235	347	150	531	1.531
Durango	210,346	9,555	1,412	9,456	0.99
Guanajuato	420,045	18,963	33,496	119,376	6.295
Guerrero	457,127	47,828	4,108	142,689	2.983
Hidalgo	235,907	41,623	16,767	89,542	2.151
Jalisco	620,255	2,808	12,464	14,081	5.015
México	580,316	4,940	2,251	14,869	3.01
Michoacán	466,213	19,403	10,801	62,806	3.237
Morelos	27,535	1,410		4,187	2.97
Nayarit	47,678	97		291	3
Nuevo León	56,735	30	154	57	1.9
Oaxaca	523,296	89,898	10,570	122,469	1.362
Puebla	554,629	27,598	79,848	85,328	3.092
Querétaro	116,807	1,811	6,541	17,085	9.434
Quintana roo	61,034	8,395	37,448	7,491	0.892
San Luis Potosí	246,860	67,546	54,146	77,683	1.15
Sinaloa	87,354	27,931	631	235,874	8.445
Sonora	6,009	656	15	3,080	4.696
Tabasco	46,448	9,458	13,950	14,539	1.537
Tamaulipas	76,354	3,206	2,717	5,356	1.671
Tlaxcala	125,202	21,462	5	47,182	2.198
Veracruz	374,922	21,495	66,598	43,958	2.045
Yucatán	163,787	4,923	4,470	5,913	1.201
Zacatecas	345,139	37,357	65,775	75,110	2.011
<b>TOTAL</b>	<b>6,950,189</b>	<b>588,591</b>	<b>527,680</b>	<b>1,524,772</b>	<b>2.591</b>

Fuente: SAGARPA. (2008)

**Cuadro 14.** Avance de la producción de maíz, de riego y temporal, durante ciclo agrícola Otoño-Invierno 2007-2008 en México.

Estado	Superficie (ha)			Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
	sembrada	cosechada	Siniestrada	obtenida	Obtenido
Baja California Sur	2,120	2,110	6	10,215	4.841
Campeche	5,563	5,476	87	7,075	1.292
Colima	1,926	1,926		6,018	3.124
Chiapas	110,099	110,069	30	165,256	1.501
Chihuahua	25	19	6	13	0.682
Durango	45	45		202	4.478
Guanajuato	1,938	1,938		13,990	7.22
Guerrero	22,590	22,481	110	78,682	3.5
Hidalgo	26,216	26,188	29	53,800	2.054
Jalisco	3,700	3,700		12,915	3.49
México	405	405		1,116	2.756
Michoacán	6,763	6,763		22,698	3.356
Morelos	1,427	1,427		5,197	3.642
Nayarit	5,984	5,979	5	33,198	5.552
Nuevo León	4,321	3,016	1,305	5,052	1.675
Oaxaca	72,856	72,802	55	148,564	2.041
Puebla	31,666	31,424	242	61,522	1.958
Querétaro	696	696		1,516	2.178
Quintana Roo	3,548	3,184	365	2,980	0.936
San Luis Potosí	13,007	12,887	120	19,894	1.544
Sinaloa	493,177	491,409	1,768	4,758,967	9.684
Sonora	17,096	17,086	10	112,055	6.558
Tabasco	39,172	36,381	2,792	61,132	1.68
Tamaulipas	112,356	107,171	5,185	516,919	4.823
Veracruz	173,156	172,573	583	380,046	2.202
Yucatán	1,414	1,413	1	3,742	2.648
Zacatecas	113	86	27	258	3
<b>TOTAL</b>	<b>1,151,381</b>	<b>1,138,652</b>	<b>12,725</b>	<b>6,483,021</b>	<b>5.694</b>

Fuente: SAGARPA. (2008)

## 11. Composición química del maíz

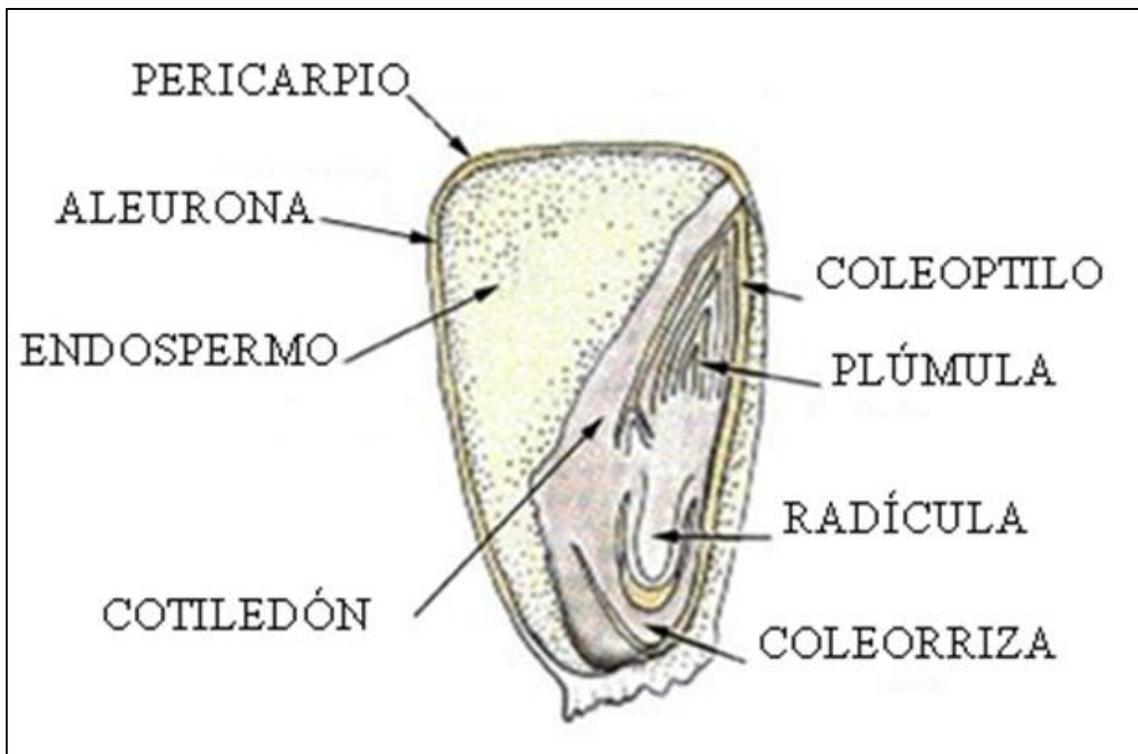
Como se muestra en el Cuadro 15, las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1 %) (Burge y Duensing, 1989). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), aproximadamente 8 por ciento de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo.

**Cuadro15.** Composición química proximal de las partes principales de granos de maíz

<b>Componente químico</b>	<b>Pericarpio (%)</b>	<b>Endospermo (%)</b>	<b>Germen (%)</b>
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

Fuente: El maíz en la nutrición humana FAO. (1993)

El germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33% por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (cercano al 20%) y minerales. En cuanto a la composición química de la capa de aleurona (Fig. 10), presenta un contenido relativamente elevado de proteínas (aproximadamente el 19%) y de fibra cruda. En la Figura 10 se muestran las estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cáscara o salvado; el endospermo; el germen o embrión; y la piloriza (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo). La anatomía general y la estructura microscópica, también han sido descritas por Wolf *et al.*, (1969).



Fuente: mejoravegetal.criba.edu.ar. (2010)

**Figura. 10.** Estructura física del grano de maíz

## 12. Usos del maíz

El maíz tiene una enorme cantidad de usos y en la actualidad se conocen cerca de 300 productos que, de una u otra forma, son derivados de éste o incluyen en su composición alguna de ellos: consumo humano, insumo para la industria, insumo para la producción (semilla). Su utilización para consumo humano como para la industria requiere de un proceso de transformación. En México el sistema agroindustrial del maíz incluye siete tipos de industrias, éstas son:

1. Fabricación de tortillas.
2. Molienda de nixtamal (masa para tortillas, tamales, atoles, etc.).
3. Industria para la fabricación de harina de maíz nixtamalizado (masa para tortillas, tamales, atole, etc.).
4. Fabricación de almidones, féculas, levaduras y productos similares, que incluyen los siguientes 16 productos (insumos de las industrias químicas, papelera, farmacéutica, textil, etc).

Glucosa.  
Glucosa sólida.  
Color caramelo.  
Almidón sin modificar.  
Almidón modificado.  
Dextrina.  
Almidón pregelatinizado.  
Féculas de maíz.  
Miel de maíz.  
Aceite refinado.  
Salvado preparado.  
Pasta de germen.  
Gluten de maíz.  
Agua de cocimiento.  
Ácido graso de maíz.  
Dextrosa.

**5.** Frituras de maíz (palomitas, fritos de maíz, golosinas, etc).

**6.** Hojuelas de maíz.

**7.** Industria de alimentos balanceados.

Las industrias involucradas en el proceso de fabricación de tortillas (las tres primeras) son las que consumen la mayor cantidad de maíz, según estimaciones de la Cámara Nacional de la Industria del Maíz (CNIM) consumen el 48% de la oferta nacional total (incluye importaciones y excluye al autoconsumo). La industria de alimentos balanceados le sigue en importancia con el 37% de la oferta total nacional del grano. Por su parte la industria que se dedica a la fabricación de derivados (almidones, féculas, etc.) participa con el 12% de la oferta nacional. El restante 3% es consumido por la industria de frituras y hojuelas de maíz, que lo obtiene en su mayor parte de importaciones (Cámara Nacional de la Industria del Maíz, 2010).

### III. JUSTIFICACIÓN

La metodología tradicional para conocer la capacidad aflatoxigénica de las cepas de *Aspergillus* es lenta; implica la identificación en las muestras, su aislamiento y cultivo en medios líquidos o sólidos durante 10 o más días, y la posterior extracción y análisis cromatográficas de las aflatoxinas utilizando detectores de fluorescencia (Vázquez *et al.*, 2004).

Analizar grandes cantidades de muestras de la manera antes descrita resulta largo, caro y tedioso. Por esta razón se consideró importante evaluar un método visual cualitativo rápido y económico para la identificación de cepas productoras de aflatoxinas en una materia prima como el maíz. Dicho método utiliza aditivos que ayudan a aumentar la débil fluorescencia natural de las cepas en estudio además de mostrar la presencia de un halo color beige definido alrededor de las colonias, permitiendo así la detección visual directa de cepas aflatoxigénicas bajo luz ultravioleta y luz natural.

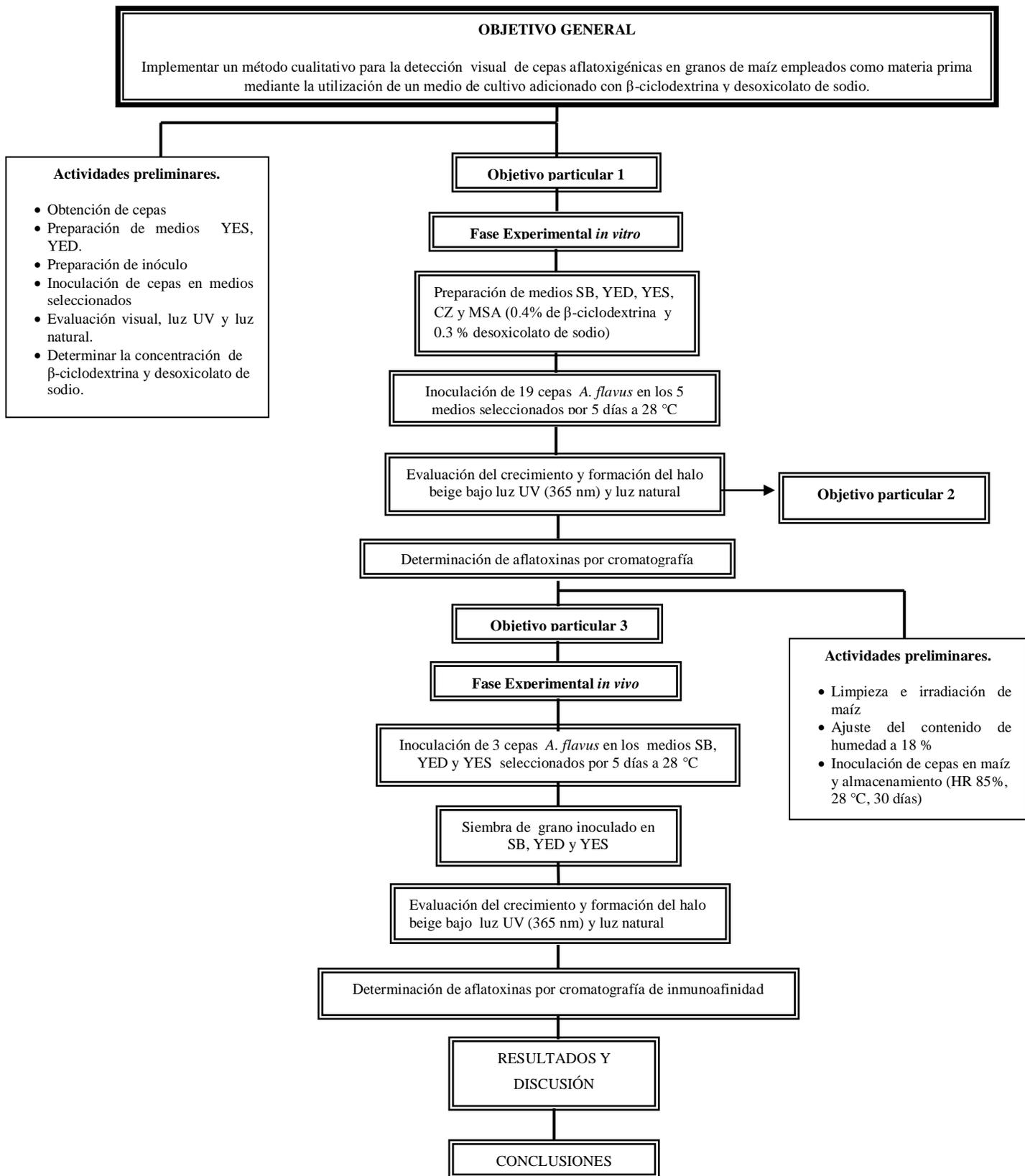
### IV. OBJETIVOS

#### **Objetivo General**

Implementar un método cualitativo para la detección visual de cepas aflatoxigénicas en granos de maíz empleados como materia prima mediante la utilización de un medio de cultivo adicionado con  $\beta$ -ciclodextrina y desoxicolato de sodio.

#### **Objetivos particulares**

- a) Evaluar la adición de  $\beta$ -ciclodextrina y desoxicolato de sodio en diferentes medios de cultivo para determinar la fluorescencia y presencia de un halo beige en cepas del género *Aspergillus* productoras y no productoras de aflatoxinas.
- b) Establecer el tiempo mínimo de incubación en cepas productoras de aflatoxinas mediante la observación y medición diaria de la fluorescencia y halo beige para evaluar de una manera rápida y visual la síntesis de aflatoxinas.
- c) Evaluar los mejores medios de cultivo en granos de maíz inoculado con cepas productoras y no productoras de aflatoxinas para la determinación visual de cepas aflatoxigénicas.



**Figura. 11.** Cuadro Metodológico

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Procedencia de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas

Las cepas fueron obtenidas de la micoteca de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS, FESC, UNAM) (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Hongos del género *Aspergillus* utilizados para la determinación visual de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas *in vitro*.

CLAVE MICOTECA UNIGRAS	ESPECIE	PROCEDENCIA
ASP-03	<i>Aspergillus candidus</i>	Grano de maíz
ASP-06	<i>Eurotium chevalieri</i>	Grano de maíz
ASP-08	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Grano de maíz
ASP-17	<i>Aspergillus flavus</i>	Suelo de cultivo de papa
ASP-19	<i>Aspergillus clavatus</i>	Germinado de alfalfa
ASP-24	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Cacahuete procesado
ASP-25	<i>Aspergillus flavus</i>	Cacahuete procesado
ASP-28	<i>Aspergillus flavus</i>	Coco procesado
ASP-67	<i>Aspergillus flavus</i>	Grano de cebada maltera
ASP-68	<i>Aspergillus flavus</i>	Semilla de amaranto
ASP-69	<i>Aspergillus flavus</i>	Nuez empacada
ASP-70	<i>Aspergillus flavus</i>	Cacahuete empacado
ASP-71	<i>Aspergillus flavus</i>	Grano de frijol
ASP-73	<i>Aspergillus flavus</i>	Nuez empacada
ASP-75	<i>Aspergillus flavus</i>	Grano de frijol
ASP-76	<i>Aspergillus flavus</i>	Nuez empacada
ASP-78	<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	Suelo de cultivo de sandía
ASP-79	<i>Aspergillus oryzae</i>	Grano de cacao
ASP-80	<i>Aspergillus oryzae</i>	Grano de cacao

## **1.1 Actividades preliminares**

Como se menciona anteriormente se obtuvieron las 19 cepas de la micoteca la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS, FESC, UNAM) de diferentes sustratos, se realizó la preparación del inóculo en medio CZ a 28 °C por un periodo de 7 días.

Posteriormente se realizó la preparación de los medios YED y YES variando la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina del 0.3 al 0.4% (SIGMA- ALDRICH) en agua destilada, esterilizándolo en autoclave durante 20 min a 120 °C. Una vez estéril el medio se dejó enfriar a temperatura de 40 °C, posteriormente se adicionó asépticamente desoxicolato de sodio variando su concentración del 0.3-0.8% (SIGMA- ALDRICH) hasta quedar totalmente disuelto vertiéndose en cajas de Petri estériles dejándolas en cuarentena.

Se inocularon las 19 cepas en los medios YED y YES con las diferentes concentraciones de  $\beta$ -ciclodextrina y desoxicolato de sodio para realizar la evaluación visual mediante luz natural, luz UV (365 nm) y medición del crecimiento y formación del halo alrededor de la colonia por 10 días y así obtener los mejores resultados para realizar la primer etapa experimental con los diferentes medios de cultivos seleccionados (SB, YED, YES, CZ y MSA).

## **2. Primera etapa experimental *in vitro***

### **2.1 Determinación visual de cepas aflatoxigénicas**

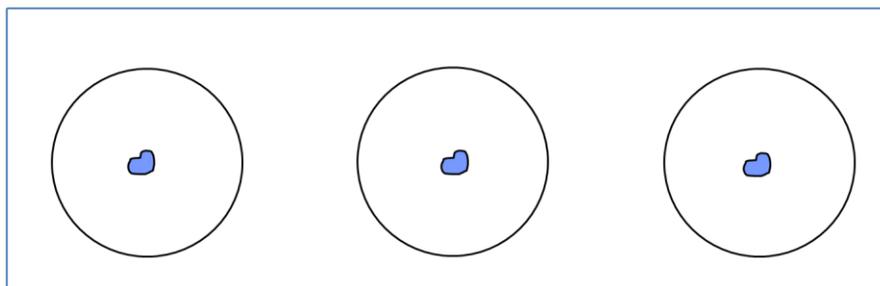
#### **2.1.1 Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon cinco diferentes medios de cultivo: Sabouraud extracto de carne agar (SB), Czapek Dox agar (CZ), malta sal agar (MSA, DIFCO), dextrosa extracto de levadura agar (YED) y extracto de levadura sacarosa agar (YES), todos ellos de la marca BIOXON adicionando a cada uno  $\beta$ -ciclodextrina al 0.4% (SIGMA- ALDRICH) y 1000 mL de agua destilada, ya disuelto se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 °C. Así una vez estériles los medios se dejaron enfriar a temperatura de 40 °C, posteriormente se adicionó asépticamente desoxicolato de sodio al 0.3% (SIGMA- ALDRICH) hasta quedar totalmente disuelto y se vertieron en cajas de Petri estériles dejándolos en cuarentena (Fente *et al.*, 2001). Los medios se conservaron en el refrigerador a una temperatura de 5 °C

hasta su uso posterior para el desarrollo de las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas (Anexo 1).

### 2.1.2 Preparación de inóculo

Se sembraron 19 cepas del género *Aspergillus* en cajas de Petri estériles con medio de cultivo Czapek, a una temperatura de 28 °C durante 7 días. Posteriormente se tomó una asada de cada una de las colonias para preparar una suspensión de esporas en un vial con 0.2% de agar bacteriológico y 0.05% de Tween 80 (Pitt y Hocking, 1997). En condiciones asépticas se tomó una alícuota de 2 µL de la suspensión de conidios, sembrándola por triplicado en el centro de las placas con los diferentes medios de cultivo (SB, CZ, MSA, YED y YES) previamente preparados (ver figura. 12). Posteriormente se incubaron a 28 °C por un periodo de 5 días.



**Figura. 12** Siembra de las especies de *Aspergillus* en diferentes placas de agar

### 2.1.3. Evaluación del crecimiento y formación del halo en cepas de *Aspergillus*

Se registró el crecimiento y formación de halo beige con la ayuda de un Vernier, midiendo el diámetro de la colonia y el grosor del halo de cada tratamiento, las mediciones se realizaron diariamente hasta el quinto día (ver figura. 13).

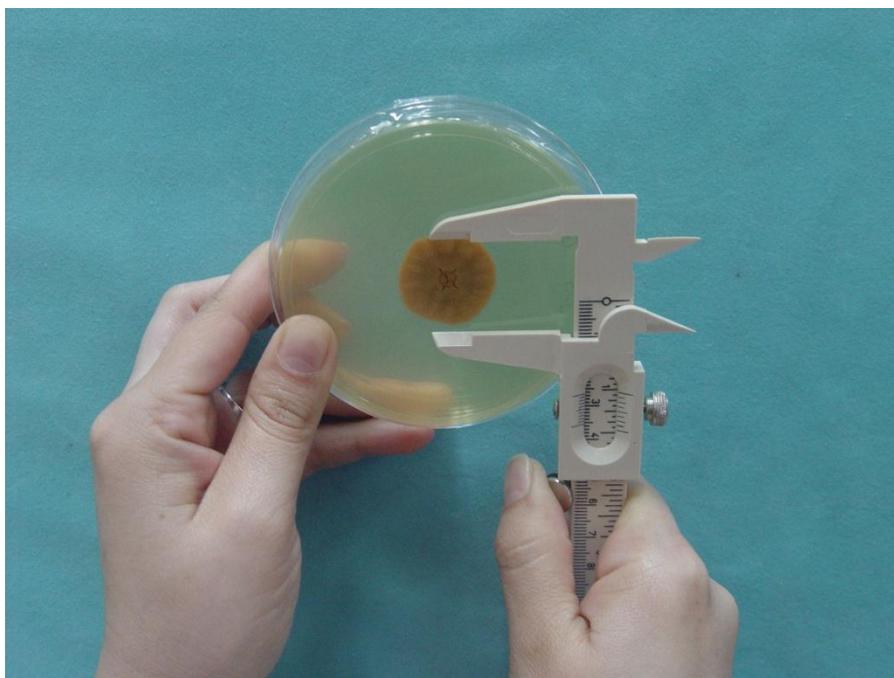


Fig. 13 Método de medición de cepas.

#### **2.1.4 Determinación visual de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas a través de luz UV (365 nm)**

Para la determinación visual de las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas a partir del segundo día de incubación, se observó bajo luz natural la presencia o ausencia de halo beige dándole valores de positivo (+) o negativo (-) y realizando la medición del grosor del halo con el Vernier, posteriormente en un cuarto oscuro con una lámpara de luz UV 365 nm se determinó la fluorescencia o no de las cepas probadas (ver figura 14), considerando en las positivas y en las negativas el color y la intensidad del brillo de las mismas basadas en el manual de colores de Methuen (Kornerup y Wanscher, 1981), pasándolo al formato de registro diario.

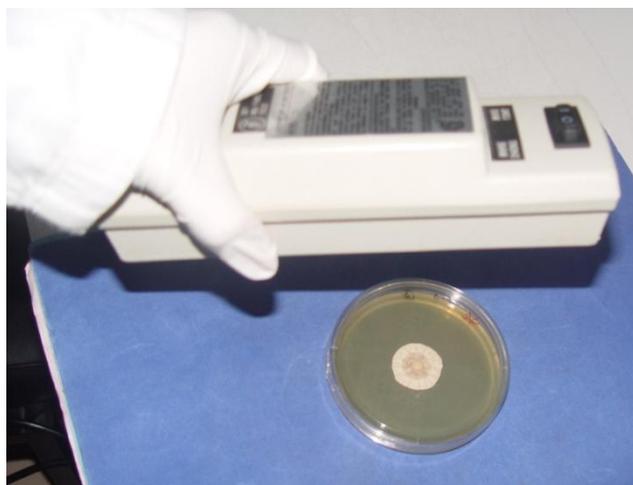
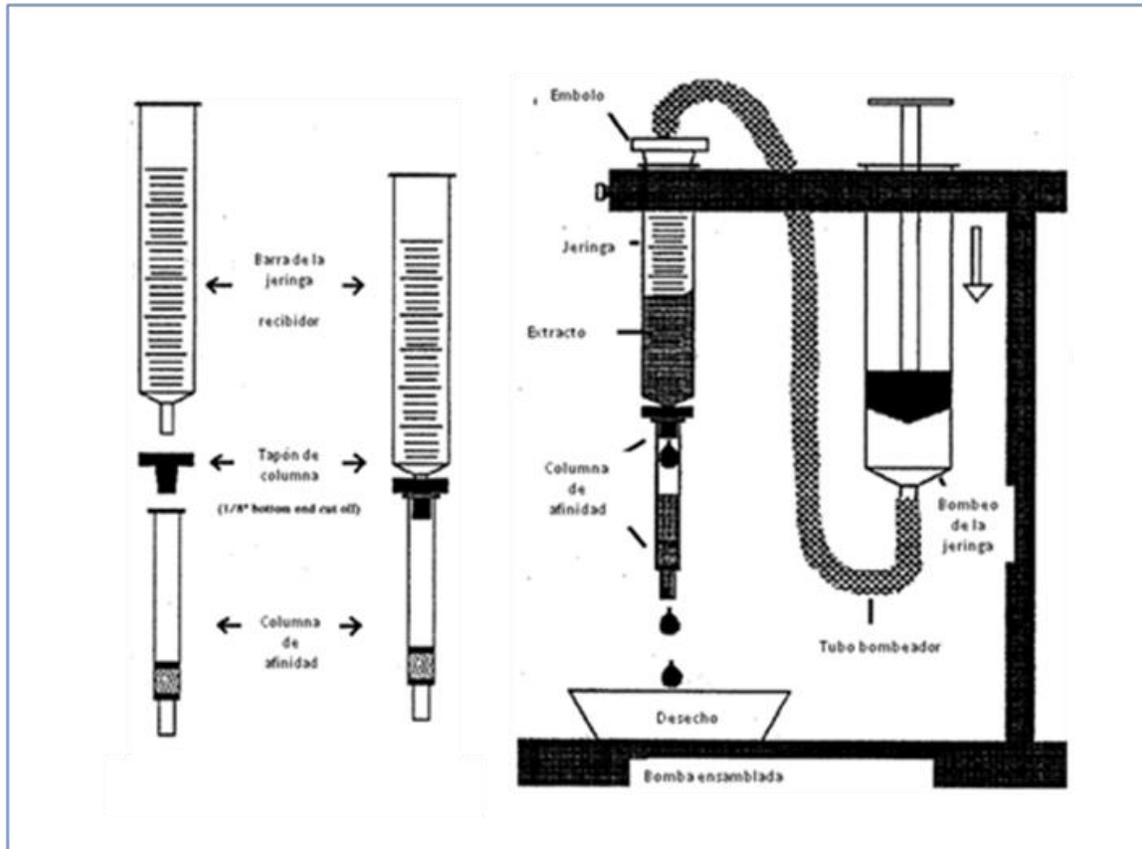


Fig. 14 Determinación visual de halo beige bajo luz UV 365 nm

Se elaboró un formato para el registro diario del crecimiento y formación de halo (ver anexo 2).

#### **2.1.5 Determinación de la presencia total de aflatoxinas por el método 991.31 de cromatografía de inmunoafinidad de la Association of Analytical Communities (AOAC) 1995**

Cada uno de los medios de cultivo se tomó y se colocó en una licuadora, adicionando NaCl y metanol al 80% (la cantidad de sal y metanol varió de acuerdo al peso de la placa de agar). La mezcla se licuó por 10 segundos y posteriormente se pasó a través de papel filtro aflautado 24 cm (VICAM). En un matraz se agregaron 40 mL de agua destilada y se adicionaron 10 mL de la muestra previamente filtrada. Posteriormente se utilizó una bomba con una columna de inmunoafinidad AflaTest, sobre la cual se colocó un embudo de vidrio con papel filtro de micro fibra de 1.5  $\mu\text{m}$ , de 11 cm de diámetro, adicionando 10 mL de la muestra diluida y se hizo pasar a través de la columna. Posteriormente se realizaron dos lavados con 10 mL de agua destilada cada uno, desechando el líquido. Se agregó 1 mL de metanol grado HPLC, recogiendo la muestra problema en un vial al cual se le adicionó 1 mL de solución reveladora (Bromo AflaTest), colocando el vial en el fluorómetro para determinar la presencia de aflatoxinas en cada una de las muestras analizadas (AOAC, 1995) (ver figura.15).



Fuente: VICAM. (1999)

**Figura. 15** Metodología para la determinación de aflatoxinas

### 3. Segunda Etapa Experimental *in vivo*

#### 3.1. Irradiación de maíz

El grano de maíz procedente del Bajío fue irradiado con rayos Gamma de  $\text{Co}^{60}$  en una dosis de 10 KG, en un irradiador Gamma bean 651 PT, en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM, con la finalidad de que solo estuviera presente la cepa inoculada.

#### 3.2 Determinación del contenido de humedad

Una vez irradiado el maíz se le determinó el contenido de humedad inicial a 15 muestras de maíz de 100 gr cada una por el método de secado en estufa; de acuerdo a las metodologías de la American Association of Cereal Chemists (AACC 1992) y de la ISTA

International Seed Testing Association (2005), expresándolo en porcentaje de humedad con base al peso mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CH} = [A/B] \times 100$$

En donde:

% CH = Porcentaje de contenido de humedad

A= Pérdida de peso en gramos

B= Peso original de la muestra

### 3.3 Ajuste del contenido de humedad

Se ajustó el contenido de humedad del maíz a 18% utilizando el siguiente cálculo (Pixton, 1967):

$$\text{CH} = \frac{100 - \text{CH}_i}{100 - \text{CH}_f} - 1 \times \text{kg de grano}$$

Donde:  $\text{CH}_i$  = contenido de humedad inicial

$\text{CH}_f$  = contenido de humedad final

### 3.4 Selección de cepas productoras de aflatoxinas

De los resultados obtenidos en la primera etapa experimental se seleccionaron cuatro cepas de *Aspergillus*, considerando la producción total de aflatoxinas: productoras *Aspergillus flavus* (ASP-68) y *Aspergillus parasiticus* (ASP-24); no productora *Aspergillus flavus* (ASP-17) y *Aspergillus candidus* (ASP-03) y un testigo.

### 3.5 Inoculación de cepas productoras en maíz

Las cepas previamente seleccionadas (ASP-68, ASP-24, ASP-17, ASP-03) y un testigo se sembraron en medio Czapek y se incubaron por 7 días a una temperatura de 28 °C, posteriormente se tomó un fragmento discoidal de 5mm con un sacabocados previamente esterilizado y se inocularon cada una de las cepas en 300g de grano de maíz irradiado,

ajustando el contenido de humedad previamente a 18%. De acuerdo con la siguiente ecuación según Pixton (1967):

$$CH = \frac{100-CH_i}{100-CH_f} - 1 \times \text{kg de grano}$$

### **3.6 Almacenamiento del maíz**

Una vez inoculadas las cepas en el maíz irradiado, se almacenó a una temperatura de 28 °C, 85% de humedad relativa, por un periodo de 30 días, hasta la invasión del grano y síntesis de aflatoxinas, inoculados con cepas productoras y no productoras y un testigo sin inóculo.

### **3.7 Detección visual de aflatoxinas en grano de maíz**

Se tomaron sesenta granos de cada muestra de maíz inoculado, los cuales fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto. Posteriormente fueron sembrados 3 granos en cajas de Petri con SB, YED y YES, que fueron los medios que mejor detección visual de aflatoxinas presentaron *in vitro*, adicionados con  $\beta$ -ciclodextrina al 0.4% y desoxicolato de sodio al 0.3% (SIGMA-ALDRICH), como se describió en la primera etapa experimental. Se realizaron tres repeticiones para cada medio y un testigo. Después de haber realizado la inoculación, las cepas se incubaron a 28 °C y se observaron los granos diariamente para determinar la formación del halo beige bajo luz natural y fluorescencia bajo luz UV a 365 nm. Al quinto día se determinó la macromorfología de las colonias. Se realizó el mismo procedimiento a sesenta granos de maíz sin desinfectar.

### **3.8 Determinación de aflatoxinas por cromatografía**

Al igual que en la primer etapa experimental se realizó la determinación de aflatoxinas totales por el método 991.31 de cromatografía de inmunoafinidad de la Association of Analytical Communities (AOAC) 1995. Ver la metodología realizada en el apartado 2.1.5.

#### **4. Caracterización macromorfológica de las especies de *Aspergillus***

##### **4.1. Macromorfología**

Se observaron bajo microscopio estereoscópico, las características macroscópicas de las colonias estudiadas, principalmente: a) el color, basados en el manual de colores de Methuen (Kornerup y Wanscher, 1981), debido a que es una característica importante para la clasificación de especies; b) el color del micelio y el aspecto de la colonia; c) la presencia o ausencia de exudados en la superficie del micelio; d) formación de pigmento, si difunde o no en el agar y e) la presencia o ausencia de esclerocios. El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tonos de verde intenso, verde olivo, amarillo grisáceo a amarillo olivo. El reverso de la colonia puede ser incoloro, café opaco o café anaranjado opaco. Cuando los esclerocios están presentes son de café oscuro a negro, variables en forma y tamaño, cuando presentan exudados son incoloros o de color café; el aspecto de la colonia varía de lanoso a flocoso (Klich, 2002).

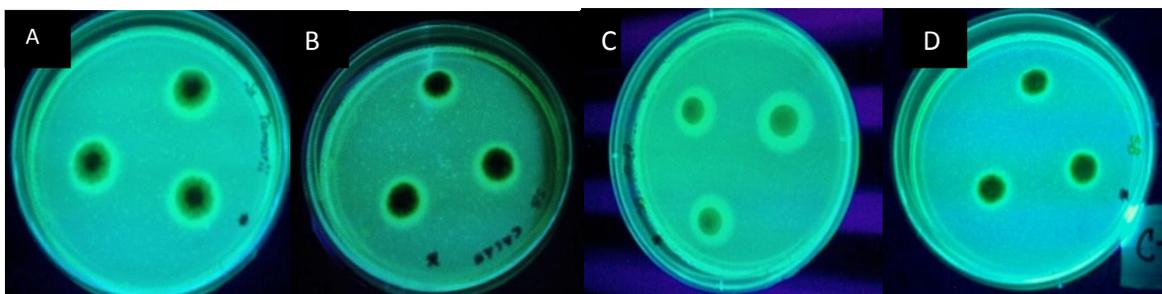
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. PRIMER ETAPA EXPERIMENTAL

Los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas en diferentes cepas del género *Aspergillus*, se encontró en el análisis de varianza (ANOVA) realizado diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre las 19 cepas probadas y la formación del halo beige a partir del tercer día de incubación en el medio SB (Cuadro 17). La cepa que mostró una mayor formación del halo beige fue la ASP-78, de la especie *A. pseudotamarii*, correspondiente al subgénero *Circundanti* sección *Flavi*, con 0.52 cm de grosor, al ser observada bajo luz UV (365 nm) presentó una fluorescencia color azul verde brillante (ver figura.16) y una cuantificación total de aflatoxinas de 1 ppb. Esto posiblemente se debió a la presencia de otros metabolitos secundarios, ya que Ito *et al* (2001) encontraron que esta especie además de producir aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> también producen fumigaclavina A, ácido kójico y ácido ciclopiazónico (ACP), por lo que al adicionar  $\beta$ -ciclodextrina más desoxicolato de sodio forma un halo color beige alrededor de la colonia junto con las aflatoxinas.

Las cepas (ASP-79 y ASP-80) correspondientes a la especie *A. oryzae* pertenecientes a la sección *Flavi* también formaron un halo beige de 0.41 y 0.4 cm, de grosor respectivamente, sin embargo, al ser observada bajo luz UV presentó una fluorescencia color verde amarillo brillante (Cuadro 17) y la cuantificación de aflatoxinas totales fue nula. En relación a los resultados obtenidos encontramos que en un estudio realizado por Wicklow *et al.* (1981) el ácido kójico fluoresce verde amarillo al ser observado bajo luz negra, lo cual suponemos que el medio puede determinar la presencia de otros metabolitos secundarios como es el ácido kójico. La cepa ASP-19, de la especie *A. clavatus*, formó un halo de 0.41 cm de grosor, una fluorescencia amarillo canario brillante (ver figura.16) y una cuantificación de aflatoxinas totales nula. En estudios realizados por cromatografía de capa fina (AOAC, 1995) la patulina fluoresce también como una mancha amarilla bajo luz UV (Carrillo, 2003), lo cual presumimos que el medio puede determinar otros metabolitos secundarios. En un estudio realizado por Lewis *et al.* (1994) encontraron que *A. oryzae* y *A. clavatus* producen otros metabolitos secundarios; en la especie *A. oryzae*: el ácido 3-

nitropropiónico, oryzacidina, maltoryzina y ácido ciclopiazónico, y para la especie *A. clavatus*: patulina, clavatul, citocalasina E, kotanina, tritiquivalinas y xantocilinas.



**Figura. 16** Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de *Aspergillus* bajo luz UV a 365 nm en medio SB. A) *Aspergillus pseudotamarii* (ASP-78). B) *Aspergillus oryzae* (ASP-79). C) *Aspergillus clavatus* (ASP-19). D) *Aspergillus parasiticus* (ASP-24).

De las 19 cepas en estudio se analizaron 11 cepas de la especie *A. flavus* aisladas de diferentes sustratos. La cepa ASP-17, previamente caracterizada como no productora, al ser probada en este medio no presentó formación de halo beige, fluorescencia y síntesis de aflatoxinas. Las otras diez cepas caracterizadas como productoras de aflatoxinas en el análisis de varianza (ANOVA) realizado presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tamaño del grosor del halo beige, en todas se observó una fluorescencia azul verde brillante y síntesis de aflatoxinas (ver figura.16). En este medio de cultivo SB las cepas que presentaron menor síntesis de aflatoxinas fueron: ASP-73 (1 ppb), la formación de halo fue de 0.37 cm de grosor; ASP-69 (1 ppb) la formación de halo fue de 0.29 cm de grosor; ASP-71 (5 ppb), la formación de halo fue menor de 0.04 cm de grosor; ASP-75 (15 ppb), la formación de halo fue de 0.08 cm de grosor. Por último las seis cepas restantes presentaron una alta producción de aflatoxinas: ASP-67 (260 ppb), la formación de halo beige fue de 0.27 cm de grosor; ASP-70 (320 ppb), la formación de halo fue de 0.26 cm de grosor; ASP-76 (360 ppb), la formación de halo fue de 0.27 cm de grosor; ASP-25 (360 ppb), la formación de halo fue menor de 0.06 cm de grosor; ASP-68 (450 ppb), la formación de halo fue de 0.14 cm de grosor y ASP-28 (460 ppb), formación de halo fue menor de 0.07 cm de grosor. La cepa ASP-24 de la especie *A. parasiticus* (sección *Flavi*) obtuvo 0.19 cm de grosor, una fluorescencia color azul cielo brillante y una cuantificación total de aflatoxinas de 320 ppb.

En estudios recientes se ha demostrado que la especie de *A. flavus* produce aflatoxinas B, ácido ciclopiazónico, ácido kójico y ácido 3-nitropropionico (Soriano, 2007; Klich, 2002). Barros *et al.* (2003) encontraron que el 88% de las cepas de *A. flavus* aisladas de granos de cacahuate, fueron productoras de ácido ciclopiazónico (ACP), y un 47% produjo niveles superiores a 100 mg/mL. Se ha demostrado que *A. parasiticus* produce aflatoxinas, ácido kójico y ácido aspergílico (Lewis *et al.*, 1994), dichos estudios sustentan los resultados obtenidos en este proyecto.

Las cepas de *A. ochraceus* (ASP-08), *A. candidus* (ASP-03) y *E. chevalieri* (ASP-06) no presentaron formación de halo, fluorescencia ni cuantificación de aflatoxinas ya que estas cepas producen otras toxinas: para *A. ochraceus* se han determinado la ocratoxina A, citrinina y ácido penicílico; para *A. candidus*: candidulina, terpenilina, xantoascina y citocalasina E; y en *E. chevalieri* la xantocilina, (Cuadro. 17), (Moreno, 1988; Lewis *et al.*, 1994).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lemke y Davis (1989) quienes utilizaron el medio de cultivo de agar extracto de coco y desoxicolato de sodio 0.8% encontrando que a partir del tercer día de incubación hasta el séptimo día se pudo determinar la presencia del halo beige al ser observadas las cepas bajo luz natural y la fluorescencia bajo luz UV. En este trabajo se obtuvieron resultados similares a partir del tercer día, sin embargo, solo hasta el quinto día se mantuvo el halo beige concentrado alrededor de la colonia y a partir de este periodo se difundió en todo el medio al ser observada la cepa bajo luz UV, Fente *et al.* (2001), al adicionar un derivado metilado de  $\beta$ -ciclodextrina en medio SB, también encontraron que las cepas aflatoxigénicas podían ser determinadas al ser observadas bajo luz UV presentando un color azul verde alrededor de la colonia después del tercer día de incubación a 28 °C. En otro estudio Fente *et al.* (2006) utilizaron el mismo medio de cultivo solo que glucosado, adicionado con  $\beta$ -metilciclodextrina al 0.2% y desoxicolato de sodio al 0.6% obteniendo resultados similares a partir del cuarto día hasta el décimo día de incubación. Sin embargo, Rojas (2004) encontró que la fosforescencia a temperatura ambiente permanece del 3° al 7° día; y gradualmente se desvanece en los días siguientes; debido probablemente a que el hongo llega a la fase estacionaria del crecimiento y el

desarrollo de esta fase se detiene, disminuyendo la concentración de oxígeno en las células fúngicas, causando una menor fluorescencia de las aflatoxinas presentes.

**Cuadro 17.** Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género *Aspergillus* en SB.

SB			
Número de Cepa	Halo beige (cm)	Fluorescencia	Aflatoxinas ppb
ASP-78	0.52 a <sup>z</sup>	+ azul verde brillante	1
ASP-79	0.41 b	+ verde amarillo brillante	0
ASP-19	0.41 b	+ amarillo canario brillante	0
ASP-80	0.4 c	+ verde amarillo brillante	0
ASP-73	0.37 d	+ azul verde brillante	1
ASP-69	0.29 e	+ azul verde brillante	1
ASP-67	0.27 f	+ azul verde brillante	260
ASP-76	0.27 f	+ azul verde brillante	360
ASP-70	0.26 g	+ azul verde brillante	320
ASP-24	0.19 h	+ azul cielo brillante	320
ASP-68	0.14 i	+ azul verde brillante	450
ASP-75	0.08 j	+ azul verde brillante	15
ASP-28	0.07 k	+ azul verde brillante	460
ASP-25	0.06 l	+ azul verde brillante	360
ASP-71	0.04 m	+ azul verde brillante	5
ASP-03	0 n	-	0
ASP-06	0 n	-	0
ASP-08	0 n	-	0
ASP-17	0 n	-	0

<sup>z</sup> Cada valor es el promedio de tres repeticiones en todos los medios de cultivo.

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Tukey (P < 0.01).

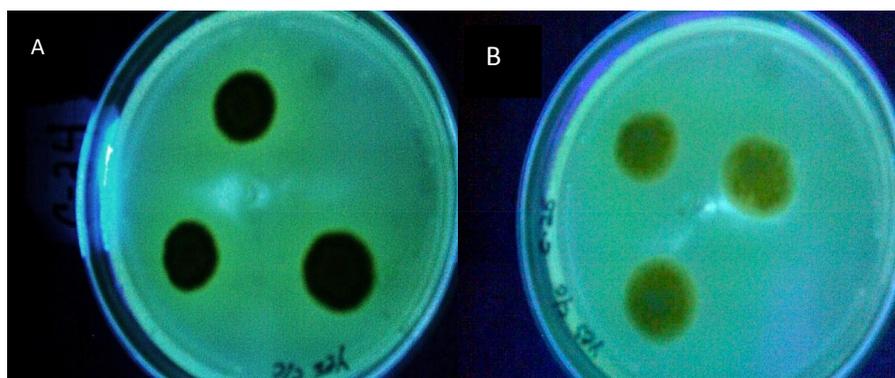
+ presencia, - ausencia

Hasta hace poco tiempo, solamente tres especies (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*) se habían reconocido principalmente como productoras de aflatoxinas. Estudios realizados demuestran que otras dos especies, *A. pseudotamarii* y *A. ochraceus*, producen aflatoxinas y este último produce esterigmatocistina Cabañales *et al.* (2007). Sin embargo, la especie de *A. ochraceus* utilizada en este estudio no fue productora de aflatoxinas (ASP-08). Goto *et al.*, (1996) encontraron que la especie *A. pseudotamarii* (Subgénero

Circumdati Sección *Flavi*) tiene la capacidad de biosintetizar ACP, aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y fumigaclavina A. Otros factores que influyen en la síntesis de aflatoxinas son los nutrientes o fuentes de carbono; Máteles y Adye (1965) realizaron estudios en medios de cultivo agregando glucosa, sacarosa y fructosa; las cuales son la fuente de carbono importante para la producción de aflatoxinas. El agar dextrosa Sabouraud es una modificación a la fórmula original del agar dextrosa desarrollado por Raymond Sabouraud. Este medio es utilizado para el cultivo de hongos patógenos. La alta concentración de dextrosa y la acidez del pH hacen a éste un medio selectivo para hongos. En este medio se pudo observar con mayor claridad la formación del anillo beige alrededor de las colonias, debido a la producción de intermediarios biosintéticos de antraquinona en la vía de producción de aflatoxinas, las cuales se difunden en el agar donde se forman turbias, debido a la presencia del desoxicolato de sodio y la  $\beta$ -ciclodextrina (Fente *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas en diferentes cepas del género *Aspergillus* en medio YES (extracto de levadura sacarosa agar) se encontró en el análisis de varianza (ANOVA) realizado diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre las 19 cepas probadas y la formación del halo beige (Cuadro.18). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fente *et al.*, 2002 utilizando el mismo medio de cultivo con la adición de ciclodextrina al 0.3% y desoxicolato de sodio al 0.6%, encontrándose que a partir del tercer día de incubación se formó el halo beige alrededor de las colonias, pudiéndose observar las cepas bajo luz natural y la fluorescencia bajo luz UV (ver figura. 17).

La cepa que presentó una mayor formación del halo beige fue la ASP-28, de la especie *A. flavus*, con 0.32 cm de grosor, al ser observada bajo luz UV (365 nm) la fluorescencia fue color azul verde brillante y una cuantificación total de aflatoxinas totales de 2 ppb. Las cepas correspondientes a la especie *A. oryzae* (ASP-79 y ASP-80) formaron un halo de 0.04 y 0.18 cm de grosor, respectivamente, una fluorescencia color verde amarillo brillante y la cuantificación de aflatoxinas fue nula.



**Figura. 17** Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de *Aspergillus* bajo luz UV a 365 nm en medio YES, A) *Aspergillus parasiticus* (ASP-24), B) *Aspergillus flavus* (ASP-25)

La cepa ASP-17, previamente caracterizada como no productora, al ser probada en este medio (YES) no presentó formación de halo beige, fluorescencia y síntesis de aflatoxinas. Las otras diez cepas de la especie *A. flavus* caracterizadas como productoras de aflatoxinas presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tamaño del grosor del halo beige, en todas se observó una fluorescencia azul verde brillante y síntesis de aflatoxinas.

Las cepas con menor síntesis de aflatoxinas fueron: ASP-78 (1 ppb), la formación de halo fue muy pequeño de 0.01 cm de grosor; ASP-67 (2 ppb) la formación de halo de 0.1 cm de grosor; ASP-25 (2ppb) la formación de halo de 0.06 cm de grosor; ASP-70 (2ppb) la formación de halo de 0.01 cm de grosor; ASP-71 (3 ppb) la formación de halo de 0.05 cm de grosor; ASP-73 (3 ppb) la formación de halo de 0.01 cm de grosor; ASP-76 (4 ppb) la formación de halo de 0.11 cm de grosor; ASP-75 (5 ppb) la formación de halo de 0.04 cm de grosor; ASP-69 (10 ppb) la formación de halo de 0.16 cm de grosor; ASP-68 (10 ppb) la formación de halo de 0.04 cm de grosor. Para la cepa ASP-24 no se tuvo formación de halo, solo al ser observada bajo luz UV la fluorescencia fue de color azul cielo brillante y una cuantificación de aflatoxinas totales de 3 ppb (Cuadro 18).

**Cuadro 18.** Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género *Aspergillus* en YES.

YES			
Especie	Halo (cm)	Fluorescencia	Aflatoxinas ppb
ASP-28	0.32 a <sup>z</sup>	+ azul verde brillante	2
ASP-80	0.18 b	+ verde amarillo brillante	0
ASP-69	0.16 c	+ azul verde brillante	10
ASP-76	0.11 d	+ azul verde brillante	4
ASP-67	0.1 e	+ azul verde brillante	2
ASP-25	0.06 f	+ azul verde brillante	2
ASP-71	0.05 g	+ azul verde brillante	3
ASP-79	0.04 h	+ verde amarillo brillante	0
ASP-68	0.04 h	+ azul verde brillante	10
ASP-75	0.04 h	+ azul verde brillante	5
ASP-24	0 i	+ azul cielo brillante	3
ASP-73	0 i	+ azul verde brillante	3
ASP-70	0 i	+ azul verde brillante	2
ASP-78	0 i	+ azul verde brillante	1
ASP-03	0 i	-	0
ASP-06	0 i	-	0
ASP-08	0 i	-	0
ASP-17	0 i	-	0
ASP-19	0 i	-	0

<sup>z</sup> Cada valor es el promedio de tres repeticiones en todos los medios de cultivo.

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Tukey ((P < 0.01).

+ presencia, - ausencia

Las cepas *A. candidus* (ASP-03), *E. chevalieri* (ASP-06), *A. ochraceus* (ASP-08) y *A. clavatus* (ASP-19) no presentaron formación de halo, fluorescencia ni cuantificación de aflatoxinas ya que son productoras de otras micotoxinas: para *A. ochraceus* ocratoxina A, citrinina y ácido penicílico; para *A. candidus*: candidulina, terpenilina, xantoascina y citocalasina E; *E. chevalieri* xantocilina, y *A. clavatus* citrinina, (Moreno, 1988; Lewis, *et al.* 1994).

En estudios realizados por Fente *et al.* (2001 y 2006), mencionan que no todas las cepas productoras de micotoxinas lo son en un mismo grado ni en todos los medios de cultivo,

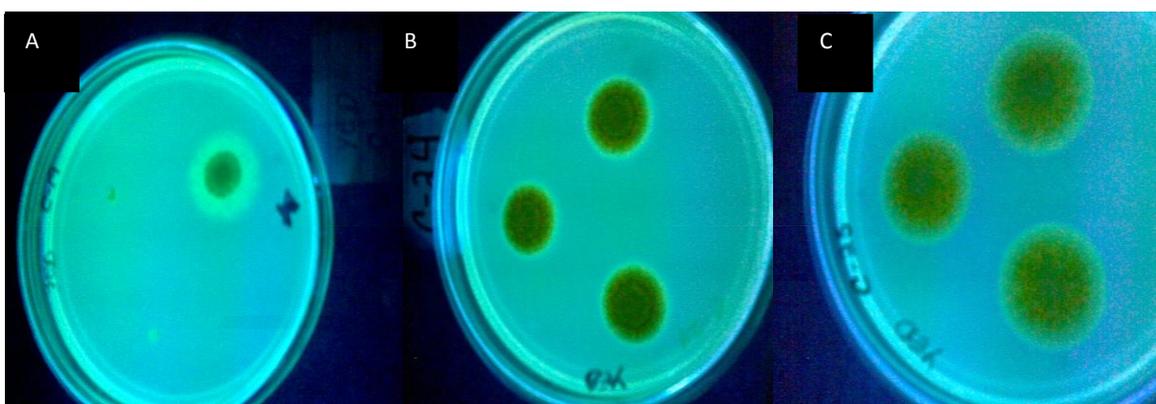
ellos encontraron que al utilizar el medio (YES), cuya composición favorece y promueve una mayor producción de aflatoxinas, después de tres días de incubación se observó la producción de aflatoxinas a través de la fluorescencia alrededor de la colonia bajo luz UV (365 nm). En este trabajo se encuentran resultados similares. Sin embargo, al comparar este medio de cultivo con el SB la formación del halo beige y la determinación de aflatoxinas fue menor e incluso en algunas cepas ASP-24, ASP-73, ASP-70 y ASP-78 no se observó la presencia de halo beige alrededor de las colonias bajo luz natural pero si la fluorescencia al ser observadas bajo luz UV y producción de aflatoxinas al ser confirmadas por el método de columnas monoclonales de Aflatest.

Máteles y Adye (1965) realizaron estudios en diferentes medios de cultivo adicionando diferentes fuentes de carbono: glucosa, sacarosa y fructosa, encontrando que estos tres carbohidratos son importantes para la producción de aflatoxinas. Uno de los factores que influyeron sobre la producción de aflatoxinas es la composición del sustrato, se ha demostrado un significativo efecto de la fuente de carbono en la producción de aflatoxinas, ya que en experimentos *in vitro* se ha obtenido una mayor producción de esta micotoxina cuando el azúcar añadido al medio de cultivo es glucosa o sacarosa que cuando se emplean otras fuentes de carbono como la fructosa, maltosa, manosa, galactosa, xilosa o arabinosa (Sanchis *et al.*, 2007). Estos resultados coinciden con lo encontrado en este trabajo ya que el medio utilizado YES contiene como fuente de carbono de sacarosa, importante para la síntesis de aflatoxinas.

A si mismo se presentan los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas en diferentes cepas del género *Aspergillus* (Cuadro 19), se encontró en el análisis de varianza (ANOVA) realizado diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre las 19 cepas probadas y la formación del halo beige en el medio YED (dextrosa extracto de levadura agar), la formación de halo beige en este medio se presentó a partir del cuarto día de incubación. La cepa que presentó una mayor formación del halo beige al igual que en el medio SB fue la cepa ASP-78 con 0.14 cm de grosor, al ser observada bajo luz UV (365 nm) la fluorescencia fue color azul verde brillante y la cuantificación total de aflatoxinas fue de 1 ppb. La cepa correspondiente a la especie *A. clavatus*, (ASP-19) formó

un halo de 0.11 cm de grosor, presentó una fluorescencia amarillo canario brillante y una cuantificación de aflatoxinas totales nula (ver figura.18).

La cepa ASP-24 de la especie *A. parasiticus* obtuvo 0.04 cm de grosor, una fluorescencia azul cielo brillante y una cuantificación total de aflatoxinas de 460 ppb. Para la especie *A. flavus* las siguientes cepas presentaron una fluorescencia color azul verde brillante y tuvieron un grosor de 0.01 cm fueron las siguientes: ASP-68 (440 ppb); ASP-75 (280 ppb); ASP-25 (46 ppb); ASP-69 (30 ppb); ASP-71 (24 ppb); ASP-28 (20 ppb); ASP-67 (10 ppb); ASP-76 (1 ppb), por último para la cepa ASP-73 (1 ppb), la formación de halo fue de 0.04 cm de grosor.



**Figura 18** Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de *Aspergillus* bajo luz UV a 365 nm en medio YED. A) *Aspergillus clavatus* (ASP-19), B) *Aspergillus parasiticus* (ASP-24), C) *Aspergillus flavus* (ASP-25)

Las cepas de *A. candidus* (ASP-03), *E. chevalieri* (ASP-06), *A. ochraceus* (ASP-08), *A. flavus* (ASP-17 y ASP-70) y *A. oryzae* (ASP-79 y ASP-80), no presentaron formación de halo, fluorescencia ni cuantificación de aflatoxinas.

Para el caso del medio YED la fuente de carbono que ayudó a la síntesis de aflatoxinas fue la glucosa adicionada al medio.

**Cuadro 19.** Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género *Aspergillus* en YED.

YED			
Especie	Halo (cm)	Fluorescencia	Aflatoxinas ppb
ASP-78	0.14 a <sup>z</sup>	+ azul verde brillante	1
ASP-19	0.11 b	+amarillo canario brillante	0
ASP-24	0.04 c	+azul cielo brillante	460
ASP-73	0.04 c	+ azul verde brillante	1
ASP-03	0 d	-	0
ASP-06	0 d	-	0
ASP-08	0 d	-	0
ASP-17	0 d	-	0
ASP-25	0 d	+ azul verde brillante	46
ASP-28	0 d	+ azul verde brillante	20
ASP-67	0 d	+ azul verde brillante	10
ASP-68	0 d	+ azul verde brillante	440
ASP-69	0 d	+ azul verde brillante	30
ASP-70	0 d	-	0
ASP-71	0 d	+ azul verde brillante	24
ASP-75	0 d	+ azul verde brillante	280
ASP-76	0 d	+ azul verde brillante	1
ASP-79	0 d	-	0
ASP-80	0 d	-	0

<sup>z</sup>Cada valor es el promedio de tres repeticiones en todos los medios de cultivo.

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Tukey (P < 0.01).

+ presencia, - ausencia

En el Cuadro 20 se presentan los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas en diferentes cepas del género *Aspergillus*, donde no se obtuvo formación del halo beige de las 19 cepas probadas en el medio CZ (Czapek). El motivo por el cual no se observó la formación del halo beige se debió a que al adicionar el desoxicolato de sodio con el medio de cultivo ya estéril éste presentó algún tipo de reacción con alguno(s) de sus componentes tomando una apariencia turbia, lo cual no permitió visualizar directamente bajo luz natural la formación del halo. No fue un buen medio para la producción de aflatoxinas y bajo luz UV se observó la fluorescencia solo en algunas cepas, que al ser cuantificadas por el método de columnas monoclonales de aflatest (VICAM, 2010), se confirmó su presencia.

**Cuadro 20.** Presencia de halo beige y determinación de fluorescencia de 19 cepas del género *Aspergillus* en CZ.

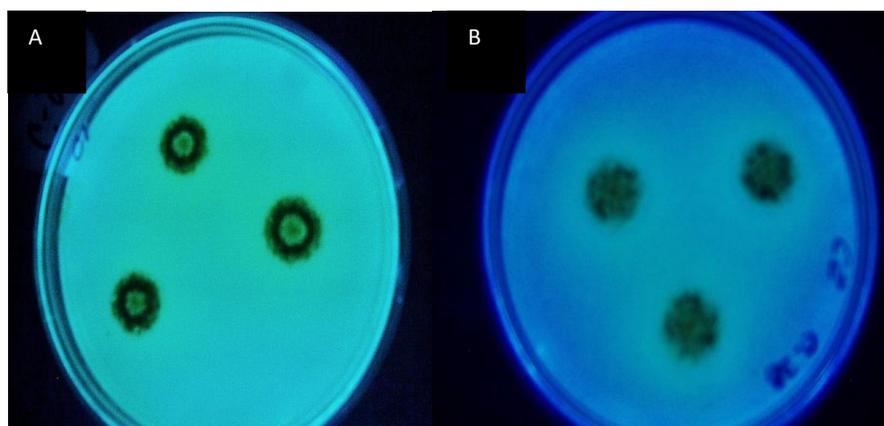
CZ			
Especie	Halo (cm)	Fluorescencia	Aflatoxinas ppb
ASP-78	0a <sup>z</sup>	+ azul verde brillante	1
ASP-19	0a	-	0
ASP-24	0a	+azul cielo brillante	16
ASP-73	0a	-	0
ASP-03	0a	-	0
ASP-06	0a	-	0
ASP-08	0a	-	0
ASP-17	0a	-	0
ASP-25	0a	+ azul verde brillante	340
ASP-28	0a	-	0
ASP-67	0a	-	0
ASP-68	0a	-	0
ASP-69	0a	+ azul verde brillante	1
ASP-70	0a	-	0
ASP-71	0a	-	0
ASP-75	0a	-	0
ASP-76	0a	-	0
ASP-79	0a	-	0
ASP-80	0a	-	0

<sup>z</sup>Cada valor es el promedio de tres repeticiones en todos los medios de cultivo.

Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes Tukey (P < 0.01).

+ presencia, - ausencia

La cepa con mayor síntesis de aflatoxinas fue la especie *A. flavus* ASP-25 (340 ppb), presentando una fluorescencia azul verde brillante; otras especies con menor producción fueron *A. parasiticus* ASP-24 (16 ppb) una fluorescencia azul cielo brillante; *A. flavus* ASP-69 (1 ppb) una fluorescencia azul verde brillante; *A. pseudotamarii*, ASP-78 (1 ppb) una fluorescencia azul verde brillante (ver figura 19).



**Figura 19** Observación de la fluorescencia del anillo beige alrededor de las colonias de *Aspergillus* bajo luz UV a 365 nm en medio CZ, A) *Aspergillus parasiticus* (ASP-24), B) *Aspergillus flavus* (ASP-25).

Las cepas *A. flavus* (ASP-17, ASP-28, ASP-67, ASP-68, ASP-70, ASP-71, ASP-73, ASP-75 y ASP-76), *A. candidus* (ASP-03), *E. chevalieri* (ASP-06), *A. ochraceus* (ASP-08), *A. clavatus* (ASP-19) y *A. oryzae* (ASP-79 y ASP-80) no presentaron formación de halo, fluorescencia ni cuantificación de aflatoxinas.

Este es un medio sintético comúnmente usado para cultivar hongos de suelo y el medio primario sobre el que están basados los manuales para la identificación de *Aspergillus* y *Penicillium*. En general, la alta concentración osmótica de este medio reduce la cantidad de micelio obtenido con la mayor parte de los hongos (Moreno, 1988; Hanlin y Ulloa 1988).

Además, al ser adicionado con desoxicolato de sodio disminuye el crecimiento de las colonias en especies probadas de *A. flavus* no favoreciendo la formación de halo beige ni la síntesis de aflatoxinas.

En el medio MSA (malta sal agar) no se obtuvieron resultados de formación de halo beige, fluorescencia, ni cuantificación de aflatoxinas en las 19 cepas en estudio, debido a que en el medio no se observó el crecimiento micelial de las colonias durante el periodo de incubación (5 días), posiblemente esto se debió a que este es un medio sintético con alta presión osmótica, por su alto contenido de sal (6 a 15% de NaCl) inhibe el crecimiento

micelial y limita el desarrollo de ciertos hongos (Moreno, 1988; Hanlin y Ulloa 1988). Entonces al adicionar desoxicolato de sodio en la concentración utilizada [0.6%] inhibió o retardo drásticamente el desarrollo de los hongos.

## 2. SEGÚNDA ETAPA EXPERIMENTAL *IN VIVO*

De los resultados obtenidos en la primera etapa experimental se seleccionaron cuatro cepas de *Aspergillus*, dos productoras y dos no productoras de aflatoxinas: a) cepas productoras *Aspergillus flavus* (ASP-68), *Aspergillus parasiticus* (ASP-24) y b) cepas no productoras *Aspergillus flavus* (ASP-17), *Aspergillus candidus* (ASP-03)

En el Cuadro 21 se presentan los resultados obtenidos sobre la determinación visual, formación del halo beige y determinación de aflatoxinas en la microbiota presente en maíz inoculado con cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en condiciones favorables para su síntesis (contenido de humedad del grano de maíz de 18%, humedad relativa de 85% y temperatura de 28 °C) y un testigo sin inóculo, a partir del tercer día de incubación en tres medios de cultivo previamente seleccionados como los mejores *in vitro* (SB, YED y YES) para la detección visual de cepas productoras de aflatoxinas.

**Cuadro 21.** Determinación visual de aflatoxinas en medio SB, YES y YED.

Cepa	Halo beige (+/-)			Fluorescencia			Aflatoxinas (ppb)		
	SB	YES	YED	SB	YES	YED	SB	YES	YED
ASP-68	+	+	+	AVB	AVB	AVB	473	15	465
ASP-24	+	+	+	ACB	ACB	ACB	370	4	452
ASP-03	-	-	-	-	-	-	0	0	0
ASP-17	-	-	-	-	-	-	0	0	0
TESTIGO	-	-	-	-	-	-	0	0	0

Fluorescencia = ACB (Azul cielo brillante); AVB (Azul verde brillante).

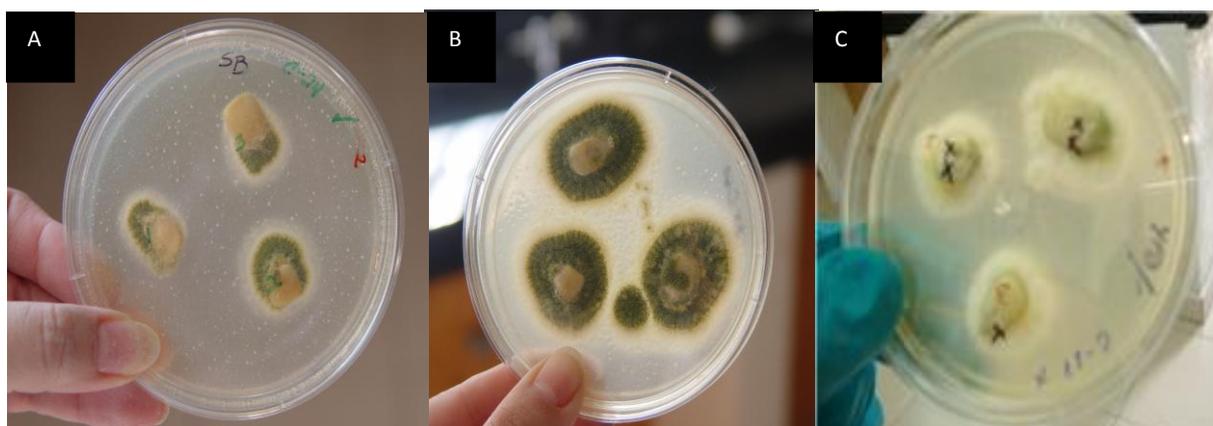
Cada valor es el promedio de tres repeticiones en todos los medios de cultivo.

+ presencia,

- ausencia

## Medio SB

Los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas, formación del halo beige y determinación de aflatoxinas totales en el medio SB alrededor del grano de maíz fueron a partir del tercer día de incubación. La cepa que presentó una mayor formación del halo beige fue la ASP-68, de la especie *A. flavus* sección *Flavi*, al ser observada bajo luz UV (365 nm) la fluorescencia fue color azul verde brillante y la cuantificación total de aflatoxinas fue de 473 ppb, la cepa ASP-24 de la especie *A. parasiticus* (sección *Flavi*) obtuvo una fluorescencia color azul cielo brillante y una cuantificación total de aflatoxinas de 370 ppb. Las cepas ASP-03, de la especie *A. candidus* sección *Candidi* y *A. flavus* ASP-17 y el testigo sin inóculo no presentaron la formación de halo beige alrededor del grano al ser observados bajo luz natural ni fluorescencia bajo luz UV y la cuantificación de aflatoxinas por el método de columnas monoclonales de aflatest (VICAM, 2010) fue nula. Haciendo un comparativo con los resultados obtenidos en esta prueba y los resultados *in vitro* se encontró que la formación del halo beige alrededor del grano se presentó hasta el tercer día de incubación a 28 °C en las dos pruebas, la cuantificación de aflatoxinas es similar en las dos etapas experimentales. Se recomienda determinar la formación del halo beige y fluorescencia al tercer y cuarto día de incubación ya que a partir del quinto día las esporas se diseminan por todo el medio formando pequeñas colonias las cuales impiden la observación del halo beige (ver figura. 20).



**Figura. 20** Formación de halo beige en grano de maíz inoculado y observado bajo luz natural A) *Aspergillus parasiticus* (ASP-24), B y C) *Aspergillus flavus* (ASP-68).

### **Medio YES**

Los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas, formación del halo beige y determinación de aflatoxinas totales en el medio YES alrededor del grano de maíz fueron a partir del cuarto día de incubación, a comparación de la etapa *in vitro* la formación del halo beige se presentó a partir del tercer día de incubación, las cepas que tuvieron fluorescencia al ser observada bajo luz UV (365 nm) son ASP-24 con una fluorescencia color azul cielo brillante y una cuantificación total de aflatoxinas de 4 ppb, para ASP-68 la fluorescencia fue color azul verde brillante y una cuantificación total de aflatoxinas de 15 ppb, haciendo un comparativo con la fase *in vitro* no se presentan diferencias importantes en la cuantificación de aflatoxinas en las dos etapas experimentales. Las cepas ASP-03, de la especie *A. candidus* y *A. flavus* ASP-17 y el testigo sin inóculo no presentaron la formación de halo beige alrededor del grano al ser observados bajo luz natural ni fluorescencia bajo luz UV y la cuantificación de aflatoxinas por el método de columnas monoclonales de aflatest (VICAM, 2010) fue nula.

### **Medio YED**

Los resultados obtenidos sobre la determinación visual de aflatoxinas, formación del halo beige y determinación de aflatoxinas totales en el medio YED alrededor del grano de maíz fueron a partir del tercer día de incubación, la cepa que tuvo mayor fluorescencia al ser observada bajo luz UV (365 nm) es ASP-68 tuvo una fluorescencia color azul verde brillante, una cuantificación total de aflatoxinas de (465) ppb. La cepa ASP-24 presentó una fluorescencia color azul cielo brillante y la formación de halo de obtuvo hasta el cuarto día de incubación y una cuantificación total de aflatoxinas de 452 ppb. Las cepas ASP-03, de la especie *A. candidus* y *A. flavus* ASP-17 y el Testigo sin inóculo no presentaron la formación de halo beige alrededor del grano al ser observados bajo luz natural ni fluorescencia bajo luz UV y la cuantificación de aflatoxinas por el método de columnas monoclonales de aflatest (VICAM, 2010) fue nula.

Haciendo un comparativo con los resultados obtenidos en la etapa *in vitro* para el medio YED, la formación del halo beige alrededor de la colonia tardó un día más, observándose al cuarto día de incubación y para la cuantificación de aflatoxinas no hubo diferencias importantes en cuanto a la concentración de éstas en las dos etapas experimentales.

Dado que la mayoría de los estudios de investigación realizados hasta el día de hoy han sido efectuadas *in vitro* no se cuenta con suficiente información bibliográfica y experimental *in vivo* para realizar así un comparativo de los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, consideramos que la metodología utilizada puede ser implementada para la detección visual de cepas aflatoxigénicas en granos y sus derivados como una técnica presuntiva y cualitativa, en sustratos presuntamente contaminados con aflatoxinas.

### **3. CARACTERÍSTICAS DE LA MACROMORFOLOGÍA DE LAS CEPAS NO PRODUCTORAS Y PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS INOCULADAS EN GRANOS DE MAÍZ**

En el Cuadro 22 se presentan los resultados obtenidos sobre la macromorfología de las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas.

#### **3.1 Cepas no productoras de aflatoxinas**

La cepa **ASP-03**, de la especie *A. candidus* sección *Candidi* no presentó diferencias en el crecimiento de las colonias en los tres medios utilizados (YES, YED, SB), el crecimiento de la cepa fue de aspecto flocoso, color blanco (1-A-1), con cabezuelas abundantes y micelio aéreo.

En la cepa **ASP-17**, de la especie *A. flavus*, si se presentaron diferencias en cuanto a las características de la macromorfología de las colonias en los diferentes medios utilizados observando lo siguiente: En el medio **SB**, el aspecto de la colonia fue flocoso, color verde olivo (2-E-5), sulcada, cabezuelas amarillas dispersas en el centro, exudados hialinos y con borde blanco.

En el medio **YED** el aspecto de la colonia fue flocoso, en la parte central color amarillo olivo (2-D-8) y en la parte media de color amarillo (3-A-6), presencia de exudados hialinos y con bordes de color blanco.

En el medio **YES** con aspecto flocoso, en la parte central color verde olivo (1-E-7), en la parte media se observó una coloración amarillo grisáceo (3-B-6), exudados hialinos y el borde de la colonia presentó un color blanco.

### 3.2 Cepas Productoras de Aflatoxinas

La cepa **ASP-24**, de la especie *A. parasiticus*

En el medio **SB**, el aspecto de la colonia presentó un crecimiento flocoso, color verde olivo (2-E-8) ó (1-E-8), sulcada, con cabezuelas abundantes, y el borde de la colonia de color blanco. En los medios **YES** y **YED** el aspecto del crecimiento flocoso, color amarillo grisáceo (3-B-7) sulcada, cabezuelas abundantes, y el borde de la colonia de color blanco. Sobre el grano la formación de la colonia fue de color verde olivo (2-E-6).

La cepa **ASP-68**, de la especie *A. flavus* en el medio **SB** el aspecto de la colonia fue flocoso, color verde olivo (2-E-8), sulcada, en el borde de color blanco y en el grano ligeramente algodonosa. En los medios **YED** y **YES** el aspecto de la colonia fue flocoso, color verde olivo (2-E-4) antes del borde con cabezuelas amarillas claras (2-A-5), y el borde de la colonia color blanca. De acuerdo con los resultados *in vivo*, las cepas de la Sección *Flavi* [*A. flavus* (ASP-17, ASP-68) y *A. parasiticus* (ASP-24)], no presentaron diferencias en cuanto al aspecto de las colonias aflatoxigénicas y no aflatoxigénicas, ya que en los tres medios de cultivo el aspecto fue flocoso. El color de las colonias presentó una variación en las cepas ASP-17 y ASP-24 presentando tonalidades desde amarillo al verde. La cepa ASP-68 presentó el mismo tono en los tres medio probados. En el medio SB todas las colonias fueron sulcadas y en la cepa ASP-24 también en los medios YES y YED. La producción de exudados solamente se observaron en la ASP-17 en los tres medios de cultivo. El color del borde de la colonia fue blanco para todas las cepas y medios de cultivo. En todas las colonias de las cepas correspondientes a la Sección *Flavi* el reverso de las colonias presentaron un color café anaranjado (7-C-6) y no se observó el desarrollo de esclerocios al quinto día de incubación (Cuadro 22).

No se encontraron diferencias en cuanto a las características de la macromorfología de las colonias en los tres medios utilizados, por lo que no se pudieron diferenciar las cepas productoras de las no productoras de aflatoxinas. Estos resultados son diferentes a los encontrados por Bothast y Fennell (1974) los cuales desarrollaron un medio diferencial para *Aspergillus* (ADM), con 1% de extracto de levadura, 1.5% de triptone y 0.5% de cloruro ferrico, incubado durante 3 días a 28 °C; así como en el medio ADM modificado por Hamsa y Ayres (1977) que además de los ingredientes ya mencionados, adicionaron

estreptomicina y dicloran. Ambos medios permitieron diferenciar las cepas de *Aspergillus flavus* por la formación de un pigmento amarillo-naranja, al reverso de la colonia. El medio agar *A. flavus* y *A. parasiticus* (AFPA) desarrollado por Pitt en 1983, también permite reconocer las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, después de 40 a 48 horas de incubación a 30°C al formar también el pigmento amarillo-naranja por el reverso de la colonia (Corry *et al.*, 2003). En el caso de los medios empleados en este trabajo no se observaron diferencias macroscópicas importantes, ni formación de pigmentos-amarillo naranjas que nos ayudaran a distinguir cepas productoras de la no productoras de aflatoxinas (Corry *et al.*, 2003).

**Cuadro 22.** Determinación de la macromorfología *in vivo* de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en grano de maíz.

Cepa	Macromorfología	Medios de cultivo		
		SB	YED	YES
ASP-03	Aspecto	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Color central	Blanco	Blanco	Blanco
	Sulcada	+	+	+
	Exudados hialinos	-	-	-
	Borde	Blanco	Blanco	Blanco
ASP-17	Aspecto	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Color central	Verde olivo	Amarillo oliváceo	Verde olivo
	Sulcada	+	-	-
	Exudados hialinos	+	+	+
	Borde	Blanco	Blanco	Blanco
ASP-24	Aspecto	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Color central	Verde olivo	Amarillo grisáceo	Amarillo grisáceo
	Sulcada	+	+	+
	Exudados hialinos	-	-	-
	Borde	Blanco	Blanco	Blanco
ASP-68	Aspecto	Flocoso	Flocoso	Flocoso
	Color central	Verde olivo	Verde olivo	Verde olivo
	Sulcada	+	-	-
	Exudados hialinos	-	-	-
	Borde	Blanco	Blanco	Blanco

## VII. CONCLUSIONES

- De los cinco medios adicionados con  $\beta$ - ciclodextrina (0.3%) y desoxicolato de sodio (0.4%), el Sabouraud (SB) resultó ser el mejor, permitiendo detectar visualmente la producción de aflatoxinas a las 48 h de incubación.
- En el medio SB la formación del halo beige permaneció concentrado por más tiempo en comparación con los otros medios utilizados; permitiendo así la detección visual de aflatoxinas por un periodo de tiempo más largo, y la producción de aflatoxinas fue mayor.
- Este método visual cualitativo nos permitió, sólo en el medio SB, establecer una relación entre la formación del halo beige y la fluorescencia de aflatoxinas.
- En los medios SB, YES y YED se observó la formación de un halo beige bajo luz natural y una fluorescencia amarillo canario bajo luz UV (365 nm) en la cepa de *A. clavatus*, por lo que consideramos que pueden ser medios adecuados para la detección de otros metabolitos secundarios.
- En las especies *A. oryzae* y *A. pseudotamarii* (Sección *Flavi*) el halo beige fue el más grande y evidente, lo cual se puede atribuir a la síntesis de otros metabolitos.
- No existe relación entre el tamaño del halo beige con la producción de aflatoxinas, ya que en los resultados obtenidos en algunas cepas formaron un halo beige muy grande y la producción de aflatoxinas fue mínima en comparación con algunas cepas donde el halo se observó muy pequeño y la determinación de aflatoxinas fue elevada.
- Los medios SB, YES y YED nos permitieron determinar visualmente la presencia de cepas aflatoxigénicas en granos de maíz inoculado, por lo cual dicha metodología nos permite implementarla en otros granos con riesgo de presencia de aflatoxinas utilizados en la elaboración de alimentos.
- En los medios de SB y YED en grano de maíz inoculado con *A. flavus*, se detectó visualmente la formación del halo a las 72 h. de incubación.
- De los medios empleados, el medio SB presentó los mejores resultados para la determinación visual de aflatoxinas bajo luz UV y luz natural *in vitro* e *in vivo*.

- En la etapa *in vivo* no se observaron diferencias en la macromorfología de las colonias que nos permitan diferenciar entre las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas.
- La importancia del estudio de los hongos y determinación de micotoxinas, está justificada por la presencia en algunos alimentos, lo cual es un indicador de malas prácticas agrícolas, almacenamiento o en el proceso de producción, como ocurre con los granos, semillas y productos procesados.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Es importante realizar otros estudios para determinar la presencia de otras micotoxinas como el ácido ciclopiazónico y ácido kójico y su posible detección visual a través de luz natural y/o ultravioleta.

Se recomienda realizar pruebas con otros granos y materias primas utilizadas en la industria de alimentos susceptibles a ser invadidas por cepas aflatoxigénicas principalmente oleaginosas, cereales y sus derivados.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Aghamohammadi, M. and Alizadeh, N. 2007. Fluorescence enhancement of the aflatoxin B1 by forming inclusion complexes with some cyclodextrins and molecular modeling study. *Journal of Luminescence* 127:575-582.
- ✓ Atanda, O.O., Akpan, I., Rati, E.R., Ozoje, M. 2005. Palm Kernel a potential substrate for rapid detection of aflatoxigenic fungi. *Food Science and Technology International* 11:67-74.
- ✓ AACC. 1992. American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the AACC. ed 10. The American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, EE.UU.
- ✓ AOAC. 1995. Official Method 991.31. Aflatoxin in corn, raw peanuts, and peanut butter. Immunoaffinity column (aflatest) method. First action 1991. AOAC-IUPAC method. pp. 20-21- In: AOAC International (ed.). Official Method of Analysis Natural Toxins, chapter 49. Arlington, VA, USA. 325 p., pp. 1-21.
- ✓ *Aspergillus flavus*. 2010. <http://aspergillusflavus.org/aflavus/>
- ✓ Barros, G., Torres, A., Palacio, G., Chulze, S. 2003. *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at plating and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 1303-1307 p.
- ✓ Bennett, J.W., Fernholz, F.A. and Lee, L.S. 1978. Effect of light on aflatoxins, Anthraquinones and Sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *Mycol.* 70:104.

- ✓ Bennett, J.W., Bhatnagar, D. and Chang, P.K. 1994. Biosynthesis of *Aspergillus* toxin-non-aflatoxins. In: Powell, K.A., Renwick, A., and Peberdy, J.F. The genus *Aspergillus*, USA. 380 p.
  
- ✓ Bucio, V.C., Martínez, J.O. and Morales, G. R. 2003. Contaminación con Hongos en Maíz Recién Cosechado en el Estado de Guanajuato durante el año 2003. Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato. Unidad de Estudios Superiores de Salvatierra de la Universidad de Guanajuato.
  
- ✓ Burge, R.M. and Duensing, W.J. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World* 34: 535-538.
  
- ✓ Cabañales, F.J., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. 2007. Especies productoras de micotoxinas. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), pp. 29-61. *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos. España.
  
- ✓ Cámara Nacional de la Industria del Maíz. 2010.  
[http://www.cnmaiz.org.mx/socios/in\\_ingreso.php](http://www.cnmaiz.org.mx/socios/in_ingreso.php)
  
- ✓ Carrillo, L. 2003. Mohos y micotoxinas. Los hongos de los alimentos y forrajes. Argentina. 125 p.
  
- ✓ Catalá, P. and Soriano, J.M. 2007. Otras micotoxinas. pp. 357-391. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos. España.
  
- ✓ Corry, E. L. J., Curtis, G. D.W. y Rosamund M.B. 2003. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. Elsevier. Amsterdam. 397-399 p.
  
- ✓ Christensen, C.M., and Kaufmann, H.H. 1969. Grain Storage. The role of fungi in quality loss. Univ. Minn. Press, Mineapolis. p. 149

- ✓ Christensen, C.M., and Sauer, D.B. 1982. Storage of cereal grains and their products. Amer. Assoc. Cereal Chem.
  
- ✓ Davis, N.D., Iyer, S.K. and Diener, U.L. 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *American Society for Microbiology* 53:1593-1595.
  
- ✓ Dibico. 2010. [www.dibico.com/fichast/3009.pdf](http://www.dibico.com/fichast/3009.pdf)
  
- ✓ Drew, S.A. and Demian, A.L. 1987. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:343-356.
  
- ✓ Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Khanizadeh, S., Oldham, J.H. 1993. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) condition. *Food Microbiology.* 10: 9-21.
  
- ✓ FAO. 1993. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El maíz en la nutrición humana <http://www.fao.org>. Abril 6, 2010.
  
- ✓ Fente, C.A., Ordaz, J.J., Vázquez, B.I., Franco, C.M. and Cepeda, A. 2001. New additive for culture media for rapid Identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4858-4862.
  
- ✓ Fente, S.C., Vázquez, B.I., Ordaz, J.J., Rojas, T.R., Franco, C.M and Cepeda, A. 2002. Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas. Oficina española de patentes y marcas. 2195771
  
- ✓ Fente, C.A., Rojas, T.R., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Sanz., A. and Cepeda, A. 2006. Study of room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of

aflatoxigenic strains in culture media. *International Journal of Food Microbiology* 115:149-158.

✓ Figueroa J.D.C Acero, G.M.G., Flores, A.L.M., Lozano, S.A., González, H.J., Arámbula, V.G., Moreno, M.E. 1999. La Tortilla Vitaminada. *Avance y Perspectiva* (18):149-158.

✓ Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I and Samson, R.A. 1985. I Infrageneric taxa of *Aspergillus*. pp 55-62 In: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (eds. R.A. Samson and J.I.Pitt), New York: Plenum Press.

✓ García. G.A., Martínez, R, F and Melgarejo, H.J. 2001. Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el estado de Sonora, 1998: Informe técnico. *Anales del Instituto de Biología, UNAM. Serie Botánica* 72(2): 187-193.

✓ Gómez, E.D, 2008. Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.

✓ Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., Gettinby. 1996. The production of cyclopiazonic acid by *Penicillium commune* and cyclopiazonic acid and aflatoxins by *Aspergillus flavus* as affected by water activity and temperature on maize grains. *Mycopathologia* 136:103-108.

✓ Goto, T., Wicklow, D.T., and Ito, Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. *American Society for Microbiology* 62:4036-4038.

✓ Hanlin, R.T., and Ulloa, M.1988. Atlas of introductory mycology, 2a ed. Hunter Texbooks, Winston-Salem.196 p.

- ✓ Hara, S., Fenell, D.I. and Hesseltine, C.W. 1974. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. *American Society for Microbiology* 27:1118-1123.
  
- ✓ INFOAGRO. 2010. El cultivo de maíz (1ª parte).  
<http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/maiz.htm>
  
- ✓ ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suiza. <http://www.seedtest.org>. 2010.
  
- ✓ Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T., and Goto, T. (2001), *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Cambridge University Press Mycological Research*, 105:2:233-239.
  
- ✓ Jeglay Y., y Cruz, H. 2006. Relación suelo-planta-hombre en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). Universidad Central de Venezuela.
  
- ✓ Joffe, A.Z. and Lisker, N. 1969. Effect of light, temperature and pH value on aflatoxin production in vitro, *Appl. Microbiol* 18:517.
  
- ✓ Juan C., Soriano, J.M., Burdaspal, P. 2007. Aflatoxinas del grupo B y G. pp. 167-184. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos. España.
  
- ✓ Kinoshita R., Ishiko T., Sugiyama S. 1968. Mycotoxins in fermented food. *Cancer Res* 28: 2296-2311.
  
- ✓ Klich, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centralbureau voor Schimmelcultures. The Netherlands. 116 p.

- ✓ Kornerup, A. y Wanscher, J. H. 1981. Methuen Handbook of Colour. 3d. Edition. Eyre Methuen. London.
  
- ✓ Kozakiewick, Z and Smith, D. 1994. Physiology of *Aspergillus*. pp. 23-38 In. Atkinson, T. and Sherwood, R.F. (ed.), *Aspergillus*. Plenum Press. N. and London.
  
- ✓ Kurtzman, C.P., Horn, B.W., and Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53:147-158.
  
- ✓ Kubicek, C.P., Witteveen, C.F., and Visser, J. 1994. Regulation of organic acid production by Aspergilli. In: Powell, K.A., Renwick, A., and Peberdy, J.F. The genus *Aspergillus*, USA. 135 p.
  
- ✓ Landers, K.E., Davis, N.D. and Diener, U.L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts, *Phytopathol* 57:1086-1967.
  
- ✓ Lemke, P.A., Davis, N.D., and Creech. G.W. 1989. Direct visual detection of aflatoxin synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species. *American Society for Microbiology* 55:1808-1810.
  
- ✓ Lewis, C.W., Anderson, J.G. and Smith, J.E. 1994. Health-related aspects of the genus *Aspergillus*. pp. 219-256. In. Atkinson, T. and Sherwood, R.F. (ed.), *Aspergillus*. Plenum Press. N.Y. and London.
  
- ✓ Magan, N. and Olsen, M. 2004. Mycotoxins in food. Detection and Control. CRC Press. Florida, USA.
  
- ✓ Mateles, R.I. and Adye, J.C. 1965. Production of aflatoxin in Submerged Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 13:208-210.

- ✓ Mejora Vegetal. 2010. Producción de semillas.  
<http://www.mejoravegetal.criba.edu.ar/semilla/Germinac/germina.htm>
  
- ✓ Moreno, M.E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Programa Universitario de Alimentos. UNAM. México. 42.
  
- ✓ NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
  
- ✓ NORMA Oficial Mexicana NOM-018-FITO-1995, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas del maíz.
  
- ✓ Ordaz, J.J., Fente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C.M., and Cepeda, A. 2002. Development of a method for direct visual determination of aflatoxin production by colonies of the *Aspergillus flavus* group. *International Journal of Food Microbiology* 83:219-225.
  
- ✓ Pacin, A. and Resnik, S. 2007. Ácido ciclopiazónico. pp 335-355. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), *Micotoxinas en alimentos*. Díaz de Santos. España.
  
- ✓ Park, D.L 1993. Controlling Aflatoxin In Food And Feed. *Food Technol.*, Vol. 10, p.92-96.
  
- ✓ Parrish, F. W., Wiley B. J., and Simmons, E. G. 1956. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Appl Microbial*, 14:139.
  
- ✓ Payne, G.A., and Brown, M.P. 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:329-362.

- ✓ Pitt, J. I. and Hocking, A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2<sup>nd</sup> ed. London, U.K.: Blacjie academic and professional.
- ✓ Pitt, J. I. 2000. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Food Science Australia, North Ryde, Australia. 197 p.
- ✓ Pixton, S.W., 1967. Moisture content-its significance and measurement in stored products. *J. of Stored Prod. Res.*, 3:35-47.
- ✓ Raper, K. B., and D. I. Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. p. 525
- ✓ Rojas. D. T. 2004. Contribución al desarrollo de métodos de diagnóstico de cepas aflatoxigénicas en alimentos y piensos. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. [http:// www.cibernetia.com](http://www.cibernetia.com).
- ✓ Rojas-Molina, I., Gutiérrez Cortéz, E., Palacios-Fonseca, A., Baños, L., Pons-Hernández, J.L., Guzmán-Maldonado, S.H., Pineda-Gómez, P., Rodríguez, M.E., 2007. Study of structural changes in endosperm of quality protein maize during traditional nixtamalization process. *Cereal Chemistry* 84, 304–312.
- ✓ Roser, R.C. and Mestres, L.J. 2004. Productos Lácteos y Tecnología. pp. 52. UPC, Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona.
- ✓ Ruiz, M.J. and Font, G. 2007. Toxicidad y evaluación de riesgos. pp15-27. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos. España.
- ✓ SAGARPA. 2008. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx>.

- ✓ Sandoval, B. 1999. Tratamiento del melasma con ácido kójico. *Dermatol.* 10:53-6.
- ✓ Sanchis, V., Marín, S. y Ramos, A.J. 2007. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. pp. 63-89. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), *Micotoxinas en alimentos*. Díaz de Santos. España.
- ✓ Shantha, T., Murthy, V.S., Rar, E.R. and Prema, V. 1986. Detoxification of groundnut seeds by urea and sunlight. *Food Safety* 7:299-304.
- ✓ Soriano, J.M. , Moltó, J.C., Mañes, J. 2007. Introducción. pp3-27. In: J.M. Soriano del Castillo (ed.), *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos. España.
- ✓ Tabak, H.H. and Cooke, W.B. 1968. The effect of gaseous environment on the growth and metabolism of fungi, *Bot. Rev.* 34:124.
- ✓ Ulloa, M. and Herrera, T. 1990. *El Reino de los hongos*. 1a Ed. UNAM- Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 552p.
- ✓ VICAM. 2010. <http://www.vicam.com/>
- ✓ Vázquez-Belda B.I., Fente-Sampayo, C.A., Jaimes-Ordaz, J., Rojas-Durán, T.R., Franco Abuín, C.M. y Cepeda-Saéz, A. 2004. Medio de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas. Oficina Española de Patentes y Marcas. ES 2 195 771 B2. España.
- ✓ Wicklow, T.D., Shotwell, L.O., y Adams, L.G. 1981. Use of aflatoxin-producing Ability medium to distinguish aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* 41:697-699.
- ✓ [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com). 2010.

- ✓ Wolf, M.J., Khoo, V. and Seckinger, H.L. 1969. Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high-lysine maize. *Cereal Chem.*, 46: 253-263.
  
- ✓ Yabukama T. 1916. Research of new organic acid (kojic acid) which is produced by koji (malt). *Tokyo Chemistry Journal* 37: 1185.

## X. ANEXO

### 1. Preparación de medios de cultivo

Para preparar los diferentes medios de cultivo (YED, MSA, YES, CZAPEK y SABOURAUD), se siguieron las formulaciones señaladas a continuación, mas 4.0 g de  $\beta$ -ciclodextrina y 1000 ml de agua destilada en matraces Erlenmeyer. Ya homogenizados, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave, a 120°C, 15 lbs de presión por 20 min. Una vez estériles los medios se dejaron enfriar a temperatura ambiente aproximadamente a 40°C, posteriormente se adicionaron 3 g de desoxicolato de sodio (SIGMA- ALDRICH) hasta quedar totalmente disuelto y así vaciarlos en cajas Petri estériles dejándolos en cuarentena. Posteriormente se conservaron a una temperatura de 5°C hasta su uso.

#### Formulaciones de los medios de cultivo:

##### YED (dextrosa extracto de levadura agar)

Dextrosa	35.0 g
Extracto de levadura	10.0 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
$\beta$ -Ciclodextrina	4.0 g

##### MSA (Malta sal agar)

Malta	20.0 g
Agar bacteriológico	20.0 g
NaCl	60.0 g
Agua destilada	1000 ml
$\beta$ -Ciclodextrina	4.0 g

##### YES (extracto de levadura sacarosa agar)

Extracto de levadura	20.0 g
Sacarosa	125.0 g

Agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml
$\beta$ -Ciclodextrina	4.0 g

**CZAPEK (Dox agar)**

Sacarosa	30.0 g
Nitrato de sodio	3.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Sulfato de magnesio	.50 g
Cloruro de potasio	.50 g
Sulfato ferroso	.01 g
Agar bacteriológico	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
$\beta$ -Ciclodextrina	4.0 g

**SABOURAUD (extracto carne agar)**

Agar bacteriológico	15.0 g
Dextrosa	40.0g
Extracto de carne	5.0 g
Peptona de caseína	5.0g
Agua destilada	1000 ml
$\beta$ -Ciclodextrina	4.0 g

## ANEXO 2

Formato de registro diario

		SB				YES				YED				CZ				MSA							
		1 DIA																							
		FECHA			COLOR (H)			FECHA			COLOR (H)			FECHA			COLOR (H)			FECHA			COLOR (H)		
CEPA	# CAJA	DIAMETRO	H	x	DIAMETRO	H	x	DIAMETRO	H	x	DIAMETRO	H	x	DIAMETRO	H	x	DIAMETRO	H	x	DIAMETRO	H	x			
	1																								
	2																								
	3																								