

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



**ESTUDIO DE LA CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS
EN MAÍZ (*Zea mays*) DE TRES VARIEDADES COSECHADAS EN EL
ESTADO DE JALISCO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS

PRESENTA:

MVZ ALEJANDRO SIERRA RIZO

DIRECTORA:

Dra. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ

ASESORES:

**Dra. ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ
Dr. AGUSTÍN RAMÍREZ ALVAREZ**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, Noviembre del 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



COORDINACIÓN DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló el pasante de Maestría en el Posgrado en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, M.V.Z. Alejandro Sierra Rizo, cuyo título es:

"ESTUDIO DE LA CONTAMINACION POR MICOTOXINAS EN MAIZ (Zea Mays) DE TRES VARIETADES COSECHADAS EN EL ESTADO DE JALISCO".

Trabajo dirigido por: **Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez.**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 21 de Octubre del 2004

DR. TEODULO QUEZADA TRISTAN

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ

DR. ARTURO VALDIVIA FLORES

DRA. ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ

DRA. DELIA GUILLERMINA GONZALEZ AGUILAR

CONTENIDO

	Página
Agradecimientos	i
Lista de Tablas	ii
Lista de Figuras	iv
Resumen	v
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
II.1 Hongos toxicogénicos y Micotoxinas	3
II.2 Género <i>Aspergillus</i>	4
II.2.1. Aflatoxinas	5
II.2.1.1. Efectos biológicos y toxicidad de las aflatoxinas	8
II.3. Género <i>Penicillium</i>	10
II.3.1 Ocratoxina	12
II.3.1.1. Efectos biológicos y toxicidad de las ocratoxinas	12
II.4. Género <i>Fusarium</i>	15
II.4.1 Fumonisinias	16
II.4.1.1. Efectos biológicos y toxicidad de las fumonisinias	18
II.5. Tricotecenos.	20
II.5.1. Efectos biológicos y toxicidad del deoxinivalenol	23
II.5.2. Zearalenona.	24
II.5.2.1. Efectos biológicos y toxicidad de la zearalenona	25
II.6. Incidencia de micotoxinas en maíz y alimentos destinados a consumo animal	26

	Página
II.7. Impacto económico y social de las micotoxinas	28
II.8. Prevención y control de micotoxinas.	29
II.8.1 Métodos de eliminación de micotoxinas en productos Agrícolas ...	31
II.9. Metodología analítica para detección de micotoxinas	33
II.10. El Maíz (<i>Zea mays</i>) en México.	34
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	38
IV. JUSTIFICACIÓN.	39
V. HIPÓTESIS	40
VI. OBJETIVOS	41
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	42
VII.1. Muestreo	42
VII.2. Descripción de las técnicas analíticas	43
VIII. RESULTADOS	47
VIII.1. Contaminación por micotoxinas	47
VIII.2. Condiciones ambientales	51
IX. DISCUSIÓN	55
X. CONCLUSIONES	62
XI. BIBLIOGRAFÍA	63
XII. ANEXOS	74

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Guadalajara** por mi formación de posgrado que cuyos conocimientos adquiridos propicia el surgimiento de nuevas relaciones profesionales en el ámbito de la investigación.

Especialmente a la **Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez** por su apoyo incondicional en la Dirección científica de este trabajo.

A las personas que contribuyeron en la proyección de mi tesis cuya plena convivencia hicieron posible concretar esta meta planteada

Dra. Esther Albarrán Rodríguez
Dr. Agustín Ramírez Álvarez
Dr. Teódulo Quezada Tristán
Dr. Arturo Valdivia Flores
Dra. Delia Guillermina González Aguilar

A mi familia, amigos, profesores, compañeros e instituciones que hicieron que todo fuera posible...

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Micotoxinas representativas de las principales categorías biosintéticas	5
Tabla 2. Potencial toxicogénico de las principales especies de <i>Aspergillus</i> y teleomorfos que contaminan productos agrícolas	6
Tabla 3. Especies toxicogénicas del género <i>Penicillium</i> aisladas de granos de cereales	11
Tabla 4. Especies de <i>Fusarium</i> aisladas de cereales en todo el mundo y sus micotoxinas	16
Tabla 5. Principales tricotecenos del grupo A y B	22
Tabla 6. Niveles máximos de micotoxinas toleradas en los cereales y en los alimentos a base de maíz para consumo animal	30
Tabla 7. Producción Agrícola y Pecuaria en Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona, Jalisco	37
Tabla 8. Niveles promedio de aflatoxinas (ppb) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoenzayo Enzimático	47
Tabla 9. Niveles promedio de fumonisinas (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunoafinidad	48
Tabla 10. Niveles promedio de fumonisinas (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoenzayo Enzimático	48
Tabla 11. Niveles promedio de ocratoxinas (ppb) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunoafinidad.	49
Tabla 12. Niveles promedio de ocratoxinas (ppb) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoenzayo Enzimático	49

	Página
Tabla 13. Niveles promedio de deoxinivalenol (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunofinidad	50
Tabla 14. Niveles promedio de zearalenona (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoenzayo Enzimático	51
Tabla 15. Temperaturas (°C) registradas en Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona durante el ciclo primavera-verano 1997	52
Tabla 16. Precipitación pluvial acumulada (mm) durante el ciclo primavera Verano 1997.....	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras químicas de las aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	7
Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A	12
Figura 3. Estructura química de las fumonisinas de la serie A, B y C purificadas de maíz contaminado con <i>F. verticillioides</i>	17
Figura 4. Estructura química de los tricotecenos	21
Figura 5. Estructura química de la zearalenona	25
Figura 6. Temperaturas promedio registradas durante el ciclo primavera verano 1997	52
Figura 7. Precipitación pluvial durante el ciclo primavera-verano 1997	54

RESUMEN

La contaminación por aflatoxinas, deoxinivalenol (DON), fumonisinas, ocratoxinas y zearalenona, se presenta con frecuencia en cultivos especialmente de maíz. Existen pocos estudios en México respecto al grado de contaminación, el cual varía dependiendo de las condiciones geográficas y ambientales. El propósito del presente estudio fue valorar el grado de contaminación en maíz blanco de tres variedades cosechadas en 4 localidades del estado de Jalisco. Bajo un diseño completamente al azar se obtuvieron 108 mazorcas de las variedades UDG 600, 601 y 602 en Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona al término de la cosecha primavera-verano 1997, se almacenaron a menos de 11% de humedad y se analizaron mediante inmunoensayo enzimático: I.E. (r-biopharm) y cromatografía de inmunoafinidad: C:I: (Vicam), los resultados fueron comparados por ANOVA a un nivel de confianza de 95 y 99%. Los resultados mostraron contaminación por todas las micotoxinas estudiadas, aflatoxinas se detectó solo por I.E., con niveles (rango: 0-3.8 ppb) de no riesgo a la salud. DON, fumonisinas y ocratoxinas presentaron altos niveles de contaminación en todas las localidades y variedades cuando se analizaron por C.I. La mayor contaminación por localidad se observó en Acatic por DON (11.22 ppm); en Villa Corona con fumonisinas (12.74 ppm) y en Ixtlahuacán de los Membrillos por ocratoxinas (29.42 ppb), estos niveles sobrepasan los tolerables para humanos y de algunas especies animales. Zearalenona se presentó en niveles bajos en todas las localidades (rango de 0.004 a 0.870 ppm). La comparación de las técnicas mostró valores contrastantes, C.I. no detectó aflatoxinas, I.E. permitió detectar niveles bajos de ocratoxinas (rango de 0.2 a 3.6 ppb) , mientras que C.I. detectó fumonisinas en el 100% de las muestras con niveles que fluctuaron de 1.7 a 24 ppm en tanto I.E. solo el 70% fueron positiva con niveles de 0.1 a 8.5 ppm. Las condiciones ambientales no mostraron influencia sobre los niveles de contaminación de las micotoxinas. Se concluye que existe contaminación por todas las micotoxinas en las tres variedades de maíz y en las localidades estudiadas. Los niveles de DON, fumonisinas y ocratoxinas detectados por C.I. pueden representar un riesgo a la salud de humanos y animales. Deben validarse ambas técnicas contra HPLC para determinar la confiabilidad de los resultados.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por micotoxinas en los productos agrícolas destinados a alimentos es estimada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación en un 25%, lo que ocasiona menor rendimiento y aumento de los costos para los productores de granos; para ganaderos: menor rendimiento de los animales, problemas en la reproducción, aumento en la incidencia de enfermedades y consecuentemente importantes pérdidas económicas (Peraica y col., 1999).

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos presentes en los alimentos y representan una amenaza potencial para la salud de humanos y animales. La posible toxicidad crónica de algunas micotoxinas como las aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxinas y zearalenona en dosis bajas suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda, dado que algunas de estas micotoxinas son carcinógenos poderosos y la exposición es muy amplia (Hussein y Brasel, 2001).

En las explotaciones pecuarias se encuentran por lo general una o más de ellas, lo cual potencializa el efecto tóxico en los animales, representando grandes pérdidas económicas al afectar los parámetros productivos y aumentar la incidencia de enfermedades a causa del efecto de inmunosupresión por dichas toxinas (Boutrif y Canet, 1998).

El nivel de contaminación por las micotoxinas en los alimentos puede fluctuar considerablemente de un año a otro, influyendo las condiciones geográficas y climáticas, por lo que es necesario se realicen programas de vigilancia que permitan la prevención y control de la contaminación de hongos micotoxigénicos en campo y almacén. Las estrategias de precosecha y poscosecha se enfocan a reducir al mínimo los niveles de micotoxinas presentes en los alimentos de humanos y animales (Ominski y col. 1994).

La detección y cuantificación de micotoxinas en la actualidad presenta diversas alternativas, entre las que se encuentra la técnica de cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), considerado un método de gran exactitud y sensibilidad, sin embargo, requiere de alta

inversión en equipo, de personal calificado y de tiempo en las determinaciones, aunado un alto costo de operación. Con el desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales en aplicaciones analíticas, se desarrollaron técnicas rápidas y confiables para las determinaciones de micotoxinas a menor costo. Estas técnicas incluyen a los sistemas de inmunoensayos enzimáticos y la cromatografía de inmunoafinidad con detección fluorométrica, de gran aplicación en pruebas de tamizaje a nivel de campo y laboratorio (Betina, 1989).

En México son pocos los estudios que se realizan para determinar los niveles de contaminación en campo, por lo que el presente estudio pretende valorar el grado de contaminación por aflatoxinas, deoxinivalenol (DON), fumonisinas, ocratoxinas y zearalenona en maíz de tres variedades cultivadas en cuatro localidades del estado de Jalisco.

II. ANTECEDENTES

II.1. Hongos Toxicogénicos y Micotoxinas

Los hongos filamentosos han evolucionando para utilizar en forma más eficiente los sustratos sólidos, creciendo sobre su superficie y penetrando en las matrices sólidas. Estos organismos son capaces de secretar enzimas que desdoblan macromoléculas complejas en compuestos menores para luego utilizarlos en su crecimiento y metabolismo.

Los hongos pueden absorber nutrientes de bajo peso molecular, así como producirlos y secretarlos, aunque no siempre asociados al proceso de crecimiento y metabolismo primario. Este se ha definido como la suma de reacciones químicas que proveen al organismo energía, productos intermedios y macromoléculas claves, tales como, proteínas y DNA, siendo estas reacciones metabólicas, básicamente las mismas en todos los organismos vivos. Mientras que, el metabolismo secundario involucra procesos biosintéticos cuyos productos finales, denominados metabolitos secundarios, no son esenciales para el organismo productor, y están restringidos a especies particulares. En condiciones de laboratorio, en cultivos continuos, estos compuestos son producidos durante la fase estacionaria de crecimiento, y su formación está asociada a formas de diferenciación morfológica (Moss,1996).

Existe un continuo debate entre los investigadores, sobre la naturaleza del metabolismo secundario y el rol que estos compuestos tienen en la biología de los organismo que los producen, pero muchos de ellos tienen actividad biológica y pueden ser tóxicos para microorganismos (antibióticos), planta (fitotoxinas) o animales (micotoxinas) (Vining,1992).

Las micotoxinas son compuestos orgánicos, biológicamente activos, que pueden causar problemas de intoxicaciones agudas, subagudas y crónicas con efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos, entre otros. Los metabolitos secundarios de origen fúngico poseen diversas estructuras químicas. Además, son sintetizados por diferentes vías a partir de uno o más metabolitos provenientes del metabolismo primario. En la naturaleza hay una

variación enorme en el metabolismo secundario; que puede ser intergenérica, intraespecífica y aún entre cepas de una misma especie (Campbell, 1984).

La producción de micotoxinas no está restringida a un solo grupo de especies fúngicas, sino que los hongos productores pueden pertenecer a varias clases y ordenes dentro del reino. Así encontramos hongos toxicogénicos dentro de las clases *Oomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes*, *Ascomycetes* y *Basidiomycetes* (Alexopoulos y col., 1996). Sin embargo, las principales micotoxinas han sido reconocidas como productos metabólicos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. La mayoría de las especies productoras de micotoxinas son saprófitas; unas pocas son patógenas facultativas de vegetales (Kale y Bennet, 1992; Pitt, 2000).

Se han realizado varios intentos para la clasificación de los metabolitos secundarios producidos por los hongos, se ha propuesto una clasificación química (Betina, 1989), en otros casos han sido categorizados en base a su origen biosintético, es decir el metabolito primario a partir del cual se inicia la vía biosintética (Turner y Aldrige, 1983; Steyn, 1998). En base a este criterio podemos clasificar a las micotoxinas en cinco grupos; a) policétidos, b) Ácido tetrámico, c) diacetopiperazinas, d) péptidos, y e) terpenos (Tabla 1).

II.2. Género *Aspergillus*

Las especies del género *Aspergillus* son saprofitas y pueden crecer sobre un amplio rango de sustratos naturales (maderas, textiles, cemento, medicamentos, granos de cereales y subproductos de oleaginosas) y condiciones climáticas. Ellas poseen gran versatilidad metabólica y habilidad para dispersar sus esporas en el ambiente. Si bien muchas especies son consideradas patógenas, alergénicas, toxicogénicas y descomponedoras; otras son utilizadas en la producción de alimentos fermentados (Tabla 2). Las especies patógenas representan un riesgo real para la salud, dado que pueden producir numerosas enfermedades tales como: aspergilosis aviar y aborto micótico bovino. Las esporas pueden causar hipersensibilidad en personas sensibilizadas, con fibrosis y neumonitis. Algunas especies son productoras de

micotoxinas y causantes de importantes micotoxicosis en humanos y animales, entre las que destacan las aflatoxinas (Pitt y Hocking, 1997).

Tabla 1. Micotoxinas representativas de las principales categorías biosintéticas

Categoría biosintética	Micotoxinas representativas
POLICETIDOS	
DI-	Moniliformina
Tetra-	Patulina, Acido penicilico
Penta-	Citrinina, Ocratoxina
Hexa-	Maltorizina
Hepta-	Rugulosina, viomelleina, xantomegnina
Octa-	Ergocrosmos, luteoskirina
Nona-	Citrioviridina, Fumonisinias, zearalenona
Deca-	Aflatoxinas, ácido norsolorínico
ÁCIDO TETRAMICO	Ácido ciclopiazónico, ácido tenuazónico
DICETOPIPERAZINAS	
Simples	Ácido aspergílico, equinulinas
Modificadas	Fumitremórgenos, roquefortina, verruculotoxina
PEPTIDOS	Ergotamina, fomopsinas
TERPENOS	
Mono-	Viridicatumtoxina
Sesqui-	Tricotecenos
Di -	Penitrems, Alfatrem, janthitrems

Steyn, 1998

II.2.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas (AFs) son un grupo de toxinas estructuralmente relacionadas a otros metabolitos secundarios producidos por hongos. Estas toxinas fueron descubiertas en el año de 1960 después de una intoxicación aguda en Inglaterra, conocida como enfermedad x de los pavos. En esta micotoxicosis murieron miles del pavos y patos pequeños después de consumir harina de cacahuate, proveniente de Brasil, contaminada con AFs (Blount, 1961).

El análisis químico realizado a la harina de maíz mostró la presencia de una serie de compuestos tóxicos que presentaban fluorescencia bajo la luz UV, estos compuestos fueron denominados aflatoxinas, ya que se atribuyó su síntesis a la especie contaminante *A. flavus*.

Tabla 2. Potencial toxicogénico de las principales especies de *Aspergillus* y teleomorfos que contaminan productos agrícolas^a

ESPECIES ^b	MICOTOXINAS
<i>A. aculeatus</i>	Acido secalonico B, D y F
<i>A. candidus</i>	Acido kojico, candidulina, terfenilina, xantoacina
<i>A. clavatus</i>	citochalasinina E, patulina, ascladiol, clavato, triptoquivalinas
<i>A. carbonarius</i>	Rubrofusarin B
<i>A. carneus</i>	Citrinina
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ y B ₂ , aflatrem, acido aspergilico, acido ciclopiazonico, acido kojico, aflavininas, acido 3-nitropropionico, paspalininas
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorginas A y C, gliotoxinas, fumigaclavinas, fumitoxinas, fumigatinas, fumigilinas, espinulosinas, triptoquivalinas, verruculogen
<i>A. niger</i>	Ocratoxinas, malforminas, naptoquinonas
<i>A. nomius</i>	Aflatoxinas B y G, acido aspergilico, acido kojico
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, acido penicilico, acido kojico, acido secalonico A, xantomegnina, viomeleina
<i>A. oryzae</i>	Acido ciclopiazonico, acido kojico, acido 3-nitropropionico
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B y G, acido aspergilico, acido kojico, aflavininas
<i>A. tamarii</i>	Acido ciclopiazonico, acido kojico
<i>A. terreus</i>	Citrinina, patulina, citreoviridina, mevinolina, territrem, acido terreico, terramide A
<i>A. ustus</i>	Austamida, austidiol, austinas, austocistina
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocistina, versicolorinas, nidulotoxinas
<i>A. wentii</i>	Metilxantonas, acido 3-nitropropionico, acido kojico
<i>E. amstelodami</i>	Equinulinas, auroglaucinas
<i>E. chevalieri</i>	Equinulinas, auroglaucinas, xantocilina X
<i>E. herbariorum</i>	Auroglaucinas, flavoglaucinas
<i>E. repens</i>	Equinulinas, auroglaucinas, asperflavininas
<i>E. rubrum</i>	Equinulina, auroglaucinas, rubroglaucinas, gliotoxina

^a Por Frisvad y Samson, (1991); Pitt y Hocking, (1997). ^b Donde A es *Aspergillus*, E es *Eurotium*

Se conocen cuatro AFs principales B₁, B₂, G₁ y G₂. Las del grupo B son bifurano cumarinas unidas a un anillo de ciclopentatona y las del grupo G son bifuranos cumarinas unidas a un anillo lactona. Un doble enlace entre el C-8 y C-9 en forma de un vinil eter, se encuentran en el anillo furano terminal en la AFB₁ y AFG₁ pero no en la AFB₂ y AFG₂ (Figura 1). Esta pequeña diferencia estructural se asocia con grandes cambios en su actividad, dado que AFB₁

y AFG₁ son carcinogénicas y considerablemente más tóxicas que AFB₂ y AFG₂. Las AFs del grupo B fluorescen cuando se exponen a la luz UV de color azul y las del grupo G de color verde. Los superíndices 1 y 2 designan el patrón de movilidad cromatográfica (valor Rf) de estos compuestos en cromatografía de capa fina (TLC).

Las AFs son compuestos muy estables en los alimentos, altamente reactivas a valores amplios de pH (pH < 3 y > 10) y cuando se exponen a la luz UV en presencia de oxígeno. Las reacciones que pueden sufrir estas toxinas derivan de la insaturación en el anillo furano y de la estructura lactona. Son muy sensibles a los agentes oxidantes, en particular a los alcalinos.

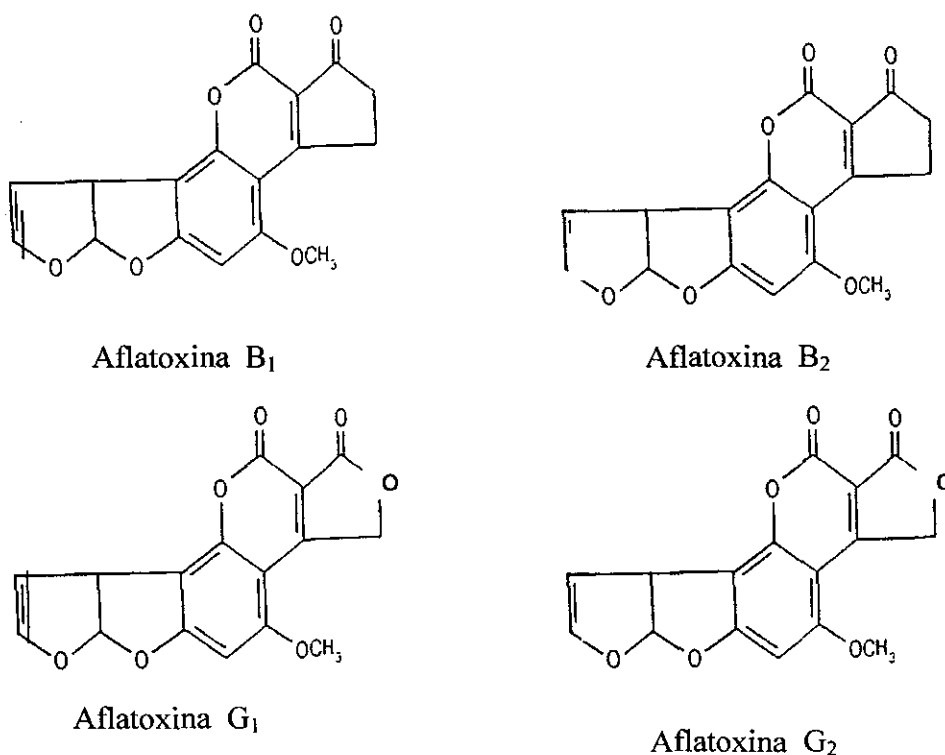


Figura 1. Estructuras químicas de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂

En varias especies animales que consumen alimentos contaminados con AFs, estas sufren una biotransformación en aflatoxina M₁ y M₂ (AFM₁ y AFM₂) presentes en la leche (Galtier, 1998).

Si bien la producción de las AFs es consecuencia de la combinación de especies fúngicas, sustrato y ambiente, los factores que afectan la producción son temperatura, contenido de humedad del sustrato y del ambiente, pH, luz, aereación y niveles de gases atmosféricos. La temperatura óptima para la producción depende del tipo de sustrato considerado, en general sobre sustratos naturales es entre 25 y 28 °C, no detectándose toxinas por debajo de 8 °C y encima de 42 °C. El periodo de incubación para obtener la máxima cantidad de toxina depende de la combinación cepa-sustrato; se han informado niveles máximos a los 15 días a 20 °C, a los 11 días a 30 °C y entre 4 y 7 días a 24 °C.

El contenido de humedad del sustrato y la humedad relativa del ambiente son parámetros críticos en la producción, se reportó máxima producción sobre granos de maíz con 25 % de humedad a 25 °C. La humedad relativa para la producción varía entre 83 y 99 %.

Los granos de cereales y oleaginosas son mejores sustratos que los medios de cultivo sintéticos o complejos para la producción de AFs. Estos son ricos en fuentes carbonadas contienen glucosa, fructosa o sacarosa, y en aminoácidos glicina y ácido glutámico. Los minerales zinc y manganeso, son esenciales para la producción de AFs, la mezcla de hierro y cadmio estimulan la producción, mientras que el hierro inhibe el crecimiento fúngico y la producción de toxinas (Gourama y Bullerman, 1995).

II. 2.1.1. Efectos biológicos y toxicidad de las aflatoxinas

La susceptibilidad de los animales a las AFs varía de acuerdo a la especie, raza, edad y estado nutricional del animal considerado. Los más susceptibles son los pollos, patos, y cerdos mientras que, las cabras, ratas, ratones y vacunos son relativamente resistentes. La susceptibilidad a la aflatoxicosis aguda se determina a través de la DL_{50} (mg/kg de peso corporal). Para una cierta cantidad de animales se ha determinado la DL_{50} : patos y conejos 0.3 a 0.5; perros 1.0; cerdos 0.62; monos 2.2; pollos 6 a 16; ratas 7; ratones 9. En estudios realizados con animales la AFB_1 es la más tóxica, seguida por AFM_1 , AFG_1 , AFB_2 y AFG_2 . Numerosas investigaciones sugieren que los metabolitos de AFs no son los responsables directos de los efectos tóxicos. Durante su transformación metabólica la AFB_1 se puede

conjugar con aminoácidos ácido glucurónico y sales biliares, en su proceso de eliminación. Durante la destoxicación hepática, esta toxina es activada irreversiblemente vía el citocromo P₄₅₀, que media la oxidación a un exo-8,9-epóxido de AFB₁ (Neal, 1998).

La sensibilidad de una especie animal a los efectos tóxicos de esta micotoxina podría estar determinada por la capacidad de formación de este metabolito y/o por la velocidad de destoxicación del epóxido de AFB₁ formado. La respuesta biológica a AFB₁ en términos de genotoxicidad y citotoxicidad parecen dependientes de la formación metabólica del compuesto exo-8,9-epóxido de AFB₁, que le permite a la toxina unirse covalentemente al DNA, RNA, proteínas y otras moléculas. La unión de DNA produce la sobreexpresión de cierto grupo de oncogenes, proceso presumiblemente involucrado en la inducción de tumores malignos en los tejidos blancos. Además, las AFs principalmente conocidas como hepatotóxicas y hepatocarcinógenas, poseen numerosos efectos inmunosupresivos observados en las intoxicaciones crónicas y derivados de su capacidad de acción sobre el DNA y la síntesis de proteínas. Estas toxinas inhiben la respuesta inmune mediada por células, lo cual se manifiesta en la reducción del peso del timo, de la bolsa de Fabricio y del número de linfocitos T periféricos, con inhibición de la proliferación y diferenciación de células del sistema linfoide (Oswald y Comera, 1998; Bondy y Pestka, 2000).

Existen suficientes evidencias para involucrar a las AFs en la generación de cáncer hepático (Linsell y Peers, 1977; Peers y col., 1976). En 1986, la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC, 1986), declaró a la AFB₁ como un carcinógeno de clase 1 sobre la base de ensayos en los animales. Los estudios sobre los posibles casos de aflatoxicosis en humanos han sido informados en muchos países en el sudeste de Asia y África (Linsell y Peers, 1977; Peers y col., 1976; Van Rensburg y col., 1985).

Las AFs han sido ampliamente informadas como causa de carcinoma hepatocelular, hepatitis aguda, síndrome de Reye, cirrosis en niños en mal estado nutricional y la enfermedad de Kwashiorkor. Algunos informes científicos cuestionan el rol de las AFs en el cáncer hepático, debido a la estrecha relación con la hepatitis B crónica de origen viral en poblaciones de África y Asia. Otros asumen que el padecer de hepatitis B conlleva a una mayor

predisposición a la iniciación de cáncer por las AFs. Aunque el hígado es el principal órgano afectado por las AFs, en los casos de aflatoxicosis, se han observado en todos los animales expuestos, lesiones cancerosas en riñón, colon, pulmones y glándulas lagrimales (Ramos y Hernández, 1997).

Los primeros signos clínicos de intoxicación crónica en aves y mamíferos son malestar general acompañado de pérdida del apetito y del peso corporal; aunque estos signos clínicos no conducen a un diagnóstico específico. En observaciones patológicas de bajos niveles de intoxicación, revelan ictericia generalizada y cirrosis hepática con proliferación celular en los conductos biliares y fibrosis periportal. En los casos de intoxicación aguda, se manifiesta ictericia de las membranas mucosas, hemorragias diseminadas, acumulación de ácidos grasos en hígado. La patología hepática es la principal característica en la mayoría de las especies ensayadas, asociado con un aumento en los niveles de fosfatasa alcalina sérica, lo cual constituye un buen indicador del mal funcionamiento hepático asociado con aflatoxicosis (Ramos y Hernández, 1997).

II.3. Género *Penicillium*

Este género es el más diverso en términos de número de especies y rango de habitat. Se han caracterizado aproximadamente 200 especies con gran variabilidad entre los genotipos de las cepas que responden a una misma especie.

De las especies documentadas solo 70 son de gran interés y significancia, y de ellas 30 son de amplia incidencia. La mayoría de las especies son ubicuas y saprófitas crecen en una amplia variedad de ambientes con diversas fuentes de carbono y condiciones fisicoquímicas. Si bien son hongos típicos de suelo, también contaminan la vegetación en descomposición y crecen en habitat secos, tales como semillas, madera, cuero, textiles, etc. Además están asociados con alimento de consumo humano, quesos, embutidos y fermentados, ciertas especies de *Penicillium* le dan al producto el aroma, el sabor y la apariencia (Pitt, 1988).

Los granos de cereales son típicamente colonizados por especies del subgénero *Penicillium*, otras especies son más especializadas, por ejemplo *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, son patógenos de frutas y productos derivados. Unas pocas especies desarrollan a niveles de actividad de agua o acuosa (a_w) inferiores a 0,80 (*P. brevicompactum*, *P. implicatum*), muchas especies son psicotrofas y capaces de desarrollar a temperaturas de refrigeración. Numerosos metabolitos tóxicos son producidos por este género (tabla 3) y solo algunos están asociados a los alimentos; los que poseen mayores efectos en la salud de humanos y animales son: ocratoxina A (OA), ácido coclopiazónico (CPA), citreoviridina, citrinina (C), patulina (P) y ácido penicílico (AP) (Boutrif y Canet, 1998; Beretta y col., 2000).

Tabla 3. Especies toxicogénicas del género *Penicillium* aisladas de granos de cereales

ESPECIES	MICOTOXINAS
<i>P. aurantiogriseum</i>	Acido penicílico, verrucosidina, viomeleína, xanthomegnina
<i>P. bilaii</i>	Gliotoxina
<i>P. brevicompactum</i>	Acido micofenólico
<i>P. camembertii</i>	Acido ciclopiazónico
<i>P. canescens</i>	Penitrem A, griseofulvina
<i>P. chrysogenum</i>	Roquefortina C, ácido ciclopiazónico
<i>P. citreonigrum</i>	Citreoviridina
<i>P. citrinum</i>	Citrinina
<i>P. commune</i>	Acido ciclopiazónico, ácido ciclopáldico
<i>P. crateriforme</i>	Rubratoxina, rugulovasinas
<i>P. crustosum</i>	Penitrem A, roquefortina C, ácido ciclopiazónico, ácido terréstrico
<i>P. expansum</i>	Patulina, citrinina, roquefortina C, chaetoglobosina C
<i>P. funiculosum</i>	Acido secalónico D (trazas)
<i>P. glandicola</i>	Penitrem A, roquefortina C, patulina
<i>P. glabrum</i>	Acido astérico, citromicetina
<i>P. griseofulvum</i>	Acido cilopiazónico, patulina, griseofulvina
<i>P. hirsutum</i>	Acido ciclopiazónico
<i>P. hordei</i>	Roquefortina C, ácido terréstrico
<i>P. islandicum</i>	Ciclochlorotina, islanditoxina, luteoskyrina
<i>P. oxalicum</i>	Acido secalónico D
<i>P. piceum</i>	Rugolosina
<i>P. purpurogenum</i>	Rubratoxina
<i>P. raistrickii</i>	Griseofulvina
<i>P. roqueforti</i>	Patulina, ácido penicílico, roquefortina C, toxina PR
<i>P. simplicissimum</i>	Fumitremorgina B, ácido penicílico, viridicatumtoxina, verruculogeno
<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A y B, citrinina
<i>P. vulpinum</i>	Patulina, oxalina, roquefortina C

Patterson y Kozakjewicz, (1997); Pitt y Hocking. (1997).

II.3.1. Ocratoxina

El segundo grupo de micotoxinas en importancia después de las aflatoxinas son las ocratoxinas. Si bien se han aislado un amplio rango de metabolitos derivados de ocratoxina, solo la ocratoxina A (OA) ha sido detectada en productos agrícolas. Esta toxina es producida principalmente por *P. verrucosum* en regiones de clima cálido y templado; y por algunas especies de *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotium*, *A. mellus*) en regiones de clima tropicales (Frisvad y Samson, 1991; Varga y col.,1996).

Las ocratoxinas son una familia de 7 sustancias afines formadas por una molécula de fenilalanina unida por un enlace amídico a una 3,4 dihidroisocumarina, entre las cuales la ocratoxina A es la más común por su significancia toxicológica (Figura 2). En muchos casos se ha detectado a OA en co-ocurrencia con citrinina, donde esta ocurre en niveles superiores. Las especies productoras de esta toxina son *P. citrinum*, *P. verrucosum* y *P. viridicatum*.

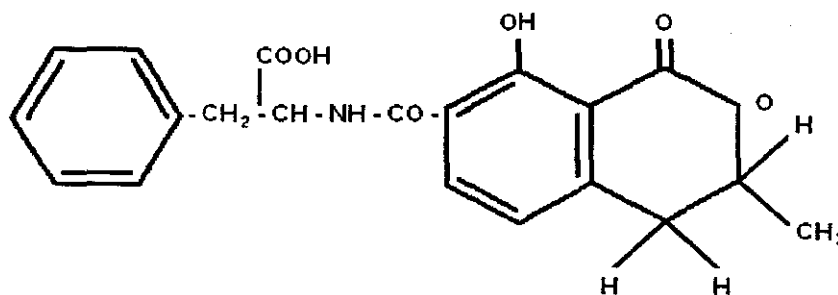


Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A

II.3.1.1. Efectos biológicos y toxicidad de las ocratoxinas.

Los órganos principalmente afectados por las ocratoxinas son hígado y riñón. En el hígado, ataca al retículo endoplásmico de los hepatocitos produciendo degeneración hialina y necrosis focal junto una infiltración grasa. En riñón se produce necrosis epitelial en los túbulos proximales, acompañada por cambios degenerativos del núcleo y engrosamiento de la membrana basal. Los riñones aumentan de tamaño, el color es pálido, aparecen quistes y focos

fibrosos. Este síndrome se presenta en cerdos, gallinas ponedoras y pollos de engorda y su presentación puede ser por intoxicación aguda, los animales aparecen deprimidos, con anorexia, paresia, edema perineal en verracos, ascitis, hidrotórax, edemas subcutáneos y mesentéricos. En la intoxicación crónica por OA se disminuye el apetito y el crecimiento de los animales, aumenta el consumo de agua y aparece poliuria. Se encuentran residuos de OA en hígado, riñón, grasa y carne (Pont y col., 1989). En pollos los síntomas varían dependiendo de la dosis, presentándose diarreas, disminución del peso y de la velocidad de crecimiento y rechazo del alimento. En las aves ponedoras, la ocratoxicosis retrasa la madurez sexual, disminuye la producción de huevos estos son pequeños y de cascarón delgado, con aspecto de caucho y frágiles, rompiéndose con frecuencia (Jaramillo, 1999).

La OA tiene efecto sinérgico con la actividad inmunosupresora de las aflatoxinas. Ambas micotoxinas combinadas pueden producir anemia, hipoproteinemia, linfocitopenia, heterofilia, disminución del peso de la bolsa de fabricio y disminución de la actividad del complemento. Disminuye el número de células productoras de inmunoglobulinas en los órganos linfoides y de los niveles circulantes (Leeson y col., 2000).

En la alimentación de reproductoras y pollos de engorda es de considerable importancia la prevención del crecimiento de hongos y sus micotoxinas. Los efectos clínicos de las micotoxicosis reducen seriamente el rendimiento de las aves. La ocratoxina y las aflatoxinas pueden reducir la resistencia a fracturas de hueso y provoca hemorragias en músculos lo que ocasiona canales de menor calidad. La ocratoxina puede reducir la resistencia o elasticidad del intestino grueso, ocasionando contaminación fecal de la canal del pollo de engorda durante su procesamiento. Otros efectos de la ocratoxicosis son: alteración de los procesos de coagulación sanguínea con aparición de coagulopatías sin anemia aplástica. Disminución de los carotenoides séricos con lo que el potencial de pigmentación del pienso no se expresa totalmente y disminución de la fuerza de tensión del intestino grueso. La causa radica en una reducción del contenido de colágeno de la pared intestinal. Al manipular la canal en el matadero, el intestino se rompe, contaminando la cavidad abdominal con el contenido fecal, lo que es causa de decomiso (Trevor y col., 1995).

Se han encontrado residuos de OA en sangre, riñones, hígado y músculos de cerdos, al igual que en los músculos de gallinas y pollos. Sin embargo por lo general no se han hallado residuos de OA en los rumiantes. Estudios realizados con cerdos y gallinas han demostrado que las concentraciones más altas de OA se encuentran en los riñones (Trevor y col., 1995).

La OA produce efectos nefrotóxicos en todas las especies monogástricas, incluso a dosis de 200 ppb en alimentos. Se observaron efectos teratogénicos en ratones expuestos a dosis de 3 mg/kg de peso corporal administrados vía oral, estos se acentuaron con una ración baja en proteínas, en ratas que recibieron por vía oral dosis de 0.75 mg/kg de peso corporal se observó reabsorción fetal. La OA es inhibidora de la síntesis de proteínas y de la sintetasa del ARNt en microorganismos. También puede inhibir la migración de los macrófagos. En ratones a dosis de 0.005 µg/kg de peso corporal suprimió la respuesta inmunitaria a eritrocitos de ovejas. La OA es cancerígena para el epitelio de los túbulos renales en ratones machos y en ratas de ambos sexos (CAST, 1989).

El consumo de alimentos contaminados con OA ha sido asociado con la nefropatía endémica de los Balcanes, estudios más recientes proveen evidencias de que esta toxina puede estar involucrada en patologías renales en humanos en muchos países (Krogh, 1992; Gremmels y col., 1995). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, 1993 a), clasificó a esta toxina como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) solo en base a suficientes evidencias en la producción de carcinogenicidad en animales de laboratorio.

Las interacciones micotoxinas-nutrientes constituyen un área compleja de estudio cuyo aporte al avance del conocimiento de los efectos de las micotoxinas tiene especial significancia. Se tienen evidencias claras que estas interacciones interfieren en los procesos de la digestión, metabolismo y transporte de los nutrientes; afectándose la disponibilidad y utilización de los mismos. En el caso de la OA se ha observado un cuadro de hipocatorendemia como evidencia de síndrome de mala absorción sin manifestaciones de interacción ocratoxina-lípidos en la digestión.

La interacción micotoxinas-carbohidratos ha sido poco estudiada. En pollos, las evidencias señalan que la ocratoxina causa un incremento de glucógeno hepático, con evidencias de alteración de las enzimas que regulan el catabolismo del mismo y el proceso de neogenesis interfiriéndose la utilización del almidón (Jaramillo, 1999).

II.4. Género *Fusarium*

Fusarium es un género de Hyphomycetes, ahora considerado un género anamorfo afiliado con el orden Hypocreales (Ascomycetes). Los miembros de este género se caracterizan por formar sus esporas a partir de fragmentos de micelio conocidos como fialides. Producen típicamente dos tipos de conidios, que reciben el nombre de macroconidios y microconidios (Nelson y col., 1983).

Este género incluye especies que son frecuentemente fitopatógenas, causando podredumbre en raíz y frutos, muerte en brotes y tejidos de plantas salvajes y de cultivos, esto conduce a severas pérdidas en la cantidad y calidad de los granos, además de la producción de una amplia variedad de metabolitos secundarios (Langseth y col., 1993) que se acumulan en la planta y en los granos en el estadio de campo. Estas especies son muy ubicuas, son comunes en regiones de climas tropical y templado, aunque también es posible aislarlo en zonas áridas, alpinas y árticas donde prevalecen condiciones climáticas inhóspitas (Tabla 4).

La amplia distribución del género *Fusarium* puede atribuirse a dos factores: su capacidad para colonizar un rango muy amplio de sustratos y un eficiente mecanismo para dispersarse en el tiempo y/o espacio. Estos dos factores le permiten adaptarse rápidamente a nuevos nichos ecológicos, así se encuentran como saprófitos en el suelo y sobre restos vegetales en descomposición. Algunas de las especies son conocidas por ocasionar enfermedades en diversos cultivos con gran interés económico como el maíz, sorgo, trigo, espárragos, entre otros (Jardine y Leslie, 1992; Sun y Snider, 1981; Elmer y Fernandino, 1992; Leslie y col., 1990). El maíz, entre otros cereales, sufre invasión de especies del género *Fusarium* provocando en ellas reducción severa en la producción de granos (Wakulinski y col., 1991).

Dentro del género *Fusarium* las especies pertenecientes a la sección *Liseola* se aíslan a partir de maíz y productos derivados de consumo humano y animal en todo el mundo. Estas especies son de relevancia por ser potenciales productoras de micotoxinas tales como: fumonisinas, moniliformina, fusaproliferina, entre otras. (Scudamore y col., 1998).

Tabla 4. Especies de *Fusarium* aisladas de cereales en todo el mundo y sus micotoxinas

ESPECIES	INCIDENCIA EN CEREALES	AGRESIVIDAD A LA ESPIGA DE MAÍZ	MICOTOXINAS PRODUCIDAS
<i>F. subglutinans</i>	Muy frecuente	Moderada	MON, BEA, FUS
<i>F. verticillioides</i>	Frecuente	Moderada	FBs*, FU-C
<i>F. graminearum</i>	Frecuente	Alta	DON*, 3AcDON, 15AcDON NIV, ZEA*, 4,7DeDON
<i>F. culmorum</i>	Muy frecuente	Alta	DON*, 3AcDON, NIV, ZEA*
<i>F. crookwellense</i>	Poco frecuente	Alta	NIV, ZEA*, FUS
<i>F. avenaceum</i>	Muy frecuente	Moderada	Moniliformina
<i>F. poae</i>	Medianamente frecuente	Moderada	NIV, FUS
<i>F. sporotrichioides</i>	Poco frecuente	Moderada	T-2, HT-2, NEO
<i>F. tricinctum</i>	Poco frecuente	Baja	MON
<i>F. clamidosporum</i>	Muy raro	Baja	MON
<i>F. semitectum</i>	Muy raro	Saprófito	BEA
<i>F. equiseti</i>	Poco frecuente	Saprófito	DUCH, ZEA*
<i>F. acuminatum</i>	Muy raro	Baja	T-2, MON
<i>F. proliferatum</i>	Poco frecuente	Baja	FBs*, MON, BEA, FUS
<i>F. anthophilum</i>	Muy raro	Saprófito	MON
<i>F. solani</i>	Poco frecuente	Saprófito	MON
<i>F. oxysporum</i>	Poco frecuente	Saprófito	MON
<i>F. nivale</i>	Muy frecuente	Moderada	Ninguna

DON: deoxinivalenol, AcDON: acetil deoxinivalenol, NIV: nivalenol, ZEA: zearalenona, DeDON: dideoxinivalenol, MON: moniliformina, FUS: fusarenona, NEO: neosolaniol, BEA: beauvericina, FUCH: fusarocromanona, FBs: fumonisinas, FU-C: fusarina C, FUP: fusaproliferina.

*micotoxinas más importantes.

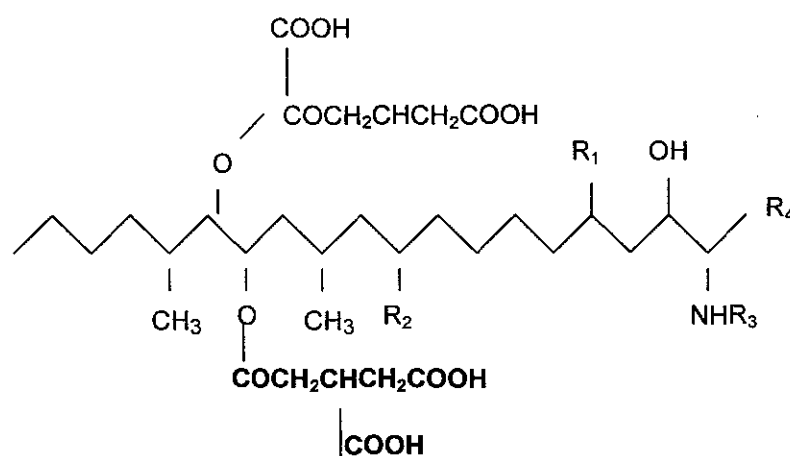
Nelson y col. (1983)

II.4.1. Fumonisinas

Las fumonisinas (FBs) constituyen una familia de micotoxinas producidas principalmente por dos especies de la sección *Liseola*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Estas especies son las de mayor importancia e infectan con gran frecuencia los cultivos de maíz en todo el mundo (Ross y col., 1990; Nelson y col., 1992). Otras especies relacionadas: *F. nygamai*, *F.*

napiforme, *F. anthophilum* y *F. diamini* son consideradas productoras de estas toxinas (Nelson y col., 1992).

Las FBs se aislaron por primera vez a partir de cultivos de la cepa *F. verticillioides* MRC 826 (antes *F. moniliforme*) por Gelderblom y col. (1988). Su aislamiento se realizó a partir de la muerte de caballos principalmente en Nueva Caledonia, que padecían leucoencefalomalacia y un elevado índice de cáncer esofágico en el sur de África. Estos dos grupos de trabajo en Sudáfrica y en Nueva Caledonia en forma independiente aislaron la fumonisina más abundante (FB₁) (Figura 3).



Fumonisin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
FA ₁	OH	OH	Oac	CH ₃
FA ₂	OH	H	Oac	CH ₃
FB ₁	OH	OH	H	CH ₃
FB ₂	OH	H	H	CH ₃
FB ₃	H	OH	H	CH ₃
FB ₄	H	H	H	CH ₃
FC ₁	OH	OH	H	H ₂
FC ₄	H	H	H	H ₂

Figura. 3. Estructura química de las fumonisinas de la serie A, B y C purificadas de maíz contaminado con *F. verticillioides*

Hasta el momento se han aislado y purificado diez tipos de fumonisinas, denominadas fumonisinas A₁ (FA₁), A₂ (FA₂), B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), B₃ (FB₃), B₄ (FB₄), C₁ (FC₁), C₂ (FC₂), C₃ (FC₃), C₄ (FC₄). Las FBs correspondientes a la serie B y C son contaminantes naturales en

alimentos a base de maíz para consumo humano y animal (Pittet, 1998). Mientras que las de la serie A, son formadas únicamente durante el proceso de purificación (Plattner y col., 1992; Seo y Lee, 1999). Estructuralmente las FBs están formadas por una cadena lineal hidrocarbonada de 20 átomos de carbono sustituidos en el C-2 por una amina, los C-3 y C-5 por hidroxilos, C-12 y C-16 por grupos metilo, C-14 y C-15 por radicales hidroxilos y en el C-10 el radical que sustituye varía según el tipo de fumonisina.

La FB₁ presenta grupos hidroxilos libres o esterificados en los átomos de carbono C-3, C-5, C-10, C-14, C-15. Esta es la fumonisina más importante y la encontrada en mayor concentración en productos contaminados. La FB₂, homóloga carece del grupo hidroxilo en el C-10, es producida en menor concentración que la FB₁ y constituye el 20-30% de la cantidad total de FBs detectadas, la FB₃, isómero estructural de FB₂, carece del grupo hidroxilo en el C-5 (Seo y Lee, 1999).

II.4.1.1. Efectos biológicos y toxicidad de las fumonisinas

Las FBs son claramente la causa de varias enfermedades en animales, tanto naturales como inducidas experimentalmente (Ross y col., 1990). Estas toxinas están asociadas con la leucoencefalomalacia equina (ELEM) y el síndrome de edema pulmonar porcino (PPE) (Colvin y Harrison, 1992), actividad inmunosupresora en aves de corral (Oswald y Comera, 1998), cáncer de hígado en ratas (Gerderblom y col., 1991) y recientemente se relacionó con un aumento en el riesgo de cáncer de esófago en humanos (EC), que consumen maíz contaminado (Rheeder y col., 1992; Sydenham y col., 1990). También FB₂ y FB₃ son promotoras de cáncer con una actividad similar en hígado de ratas (Gelderblom y col., 1992). La Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC); evaluó a las toxinas derivadas de *F. verticillioides* como grupo 2B o posibles carcinógenos en humanos (IARC, 1993 b).

La Leucoencefalomalacia equina (ELEM), es una enfermedad neurotóxica equina, caracterizada por una necrosis multifocal de la materia blanca de uno de los hemisferios bajos del cerebro. El síndrome se asocia al consumo de alimentos contaminados con FB₁ y FB₂, producidas especialmente por *F. verticillioides*. El examen histopatológico de los animales

intoxicados revela frecuentemente la presencia de lesiones hepáticas y renales así también focos hemorrágicos en los hemisferios cerebrales y en otras partes del sistema nervioso central como bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal (Marasas y col., 1988). Ante la falta de recomendaciones, miembros del Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana, a través del laboratorio de Diagnóstico recomiendan no destinar a equinos, alimentos con un contenido de FB₁ superior a 5 ppm (Riley y col., 1993; Norred y Voss, 1994).

El síndrome de edema pulmonar porcino (PPE), se caracteriza por dificultad respiratoria, postración y eventual muerte del animal. Las necropsias de los animales afectados se caracterizan por presentar un severo edema de pulmón e hidrotórax (Harrison y col., 1990; Norred y Voss, 1994). El PPE está asociado al consumo de maíz y especialmente a los desperdicios de maíz constituidos por granos rotos, restos de tallos, paja y otros residuos, contaminados con *F. verticillioides* y FBs. Según Ross (1994), la morbilidad de la enfermedad varía entre 5 y 50% con una mortalidad mayor al 50%, y el curso clínico agudo varía entre 1 y 2 días (Osweiler y col., 1992; Ross, 1994). Los órganos susceptibles a la acción de las FBs en cerdos son hígado y páncreas (Osweiler y col., 1992). Si bien todavía no hay una regulación oficial para FBs, el Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana recomienda no destinar a cerdos alimentos con un contenido de FB₁ superior a 10 ppm (Riley y col., 1993; Miller y col., 1996).

El consumo de dietas contaminadas con *F. verticillioides* en pollos de engorda, se asocia a la producción de cambios funcionales en las aves como: necrosis hepática multifocal, hiperplasia biliar, reducción en el peso corporal, de hígado y bazo, anormalidades esqueléticas (arqueo de patas), alteración en los parámetros bioquímicos y elevada mortalidad (Espada y col., 1994). En pavos se han observado alteraciones en el miocardio. El Comité de Micotoxinas de la Asociación Americana recomienda no destinar para el consumo de aves de corral alimentos con un contenido de FB₁ superior a 50 ppm (Riley y col., 1993).

Debido al elevado índice de cáncer de esófago en la población de Transkei, Sudáfrica, se estudió la relación entre consumo de maíz y la presencia de *F. verticillioides*. Además este cereal constituye el alimento básico (90%) de la población de esa zona. Varios estudios

mostraron que FB₁ podría ser responsable del cáncer esofágico, junto a otros factores predisponentes como el hábito de fumar, el consumo de alcohol, la dieta rica en maíz y las deficiencias nutricionales (Franceschi y col., 1990).

El rango de concentración de FB₁ reportado por presentación natural en maíz asociado con cáncer esofágico es de 0.0 a 10500 ng/g (ppb) en maíz considerado como "sano" y entre 600 y 63200 ng/g en maíz obviamente "mohoso" (Hopmans y Murphy, 1993; Sydenham y col., 1991). Los niveles de fumonisinas en alimentos de animales asociados con brotes de leucoencefalomalacia equina se encuentran entre 1300 y 150000 ng/g de FB₁, 100 y 23 000 ng/g de FB₂, mientras que los niveles asociados con el edema pulmonar porcino son 105000 a 155000 ng/g de FB₁ (Colvin y col., 1993; Haschek y col., 1992).

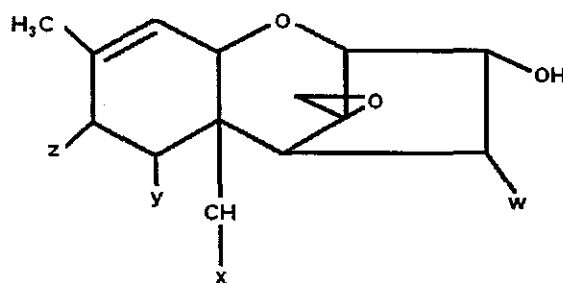
II.5. Tricotecenos

Los tricotecenos son una familia de epoxisesquiterpenos, producidos por numerosas especies del género *Fusarium* y otros géneros fúngicos relacionados (*Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* y *Verrucaria*), estos se pueden encontrar como contaminantes naturales en distintos productos de origen agrícola, fundamentalmente trigo y maíz. Su nombre deriva de *Trichothecium roseum*, a partir del cual se aisló en el año de 1984, el primer miembro del grupo, el tricotecin. Estas toxinas son potentes inhibidores de la síntesis proteica en organismos eucariotas incluyendo animales, hongos y plantas. El interés reside en su toxicidad y en el hecho de que la contaminación de las cosechas, alimentos e insumos para animales es un problema permanente y de alcance mundial (Desjardins y col., 1993).

El género fúngico más importante, por su patogenicidad en una amplia variedad de huéspedes y por la producción de tricotecenos en cereales, es sin duda *Fusarium*. Según el sistema taxonómico de Nelson y col. (1983), seis especies de este género han sido documentadas como productoras de tricotecenos en todo el mundo: *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. sambucinum* (sección *Discolor*), *F. sporotrichioides*, *F. poae* (sección *Sporotrichiella*). El perfil de producción de tricotecenos de las especies de *Fusarium* difiere marcadamente respecto del tipo como de la cantidad producida y una amplia variedad de otros

tricotecenos pueden ser producidos por cepas individuales bajo determinadas condiciones de crecimiento (Desjardins y col., 1993; Nelson y col., 1993).

Todos los tricotecenos comparten un núcleo de tres ciclos llamado tricoteceno y contienen generalmente un anillo de seis centros con un oxígeno en la posición 1, una doble ligadura en la posición C-9 y C-10 y un epóxido en el C-12 y C-13, epóxido que resulta esencial para la toxicidad. El total de tricotecenos que se presentan en la naturaleza excede de 60 compuestos. Sus estructuras químicas varían tanto en la posición, el número como en la complejidad de sus esterificaciones. Los tricotecenos de *Fusarium* son alcoholes relativamente simples y ésteres de cadena corta; y se ha propuesto una clasificación en cuatro grupos: A, B, C y D (Figura 4). Por su incidencia natural y asociación con micotoxicosis en seres humanos y animales, los grupos A y B son los de mayor significancia (Tabla 5).



Tricoteceno	w	x	y	z
Toxina T-2	CH ₃ COO-	CH ₃ COO-	-H	(CH ₃) ₂ CHCOO-
Diacetoxiscirpenol	CH ₃ COO-	CH ₃ COO-	-H	-H
Deoxinivalenol	-H ₂	-OH	-OH	=O
Nivaleno	-OH	-OH	-OH	=O

Valle Vega, 1991

Figura 4. Estructura química de los tricotecenos

Tabla 5. Principales tricotecenos del grupo A y B

TRICOTECENOS	R1	R2	R3	R4	R5
GRUPO A					
Toxina T-2 (T-2)	OH	Oac	Ooc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Toxina HT-2 (HT-2)	OH	OH	Oac	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxiscirpenol (DAS)	OH	Oac	Oac	H	H
Neosolaniol (NEO)	OH	Oac	Oac	H	OH
GRUPO B					
Deoxinivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	-
3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON)	Oac	H	OH	OH	-
15-acetildeoxinivalenol(15-AcDON)	OH	H	Oac	OH	-
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	-
Fusarenon X (FX)	OH	OH	OH	OH	-

ApSimon, 1994

Todas las especies animales que han sido expuestas parecen ser susceptibles a los tricotecenos, micotoxinas capaces de producir una amplia variedad de efectos tóxicos (Rotter y col., 1996). Los síntomas de enfermedad varían ampliamente según la especie animal y el tricoteceno particular de que se trate, los niveles y las vías de exposición. Experimentos llevados a cabo con tricotecenos químicamente puros a bajas dosis, han reproducido varios de los aspectos observados en las toxicosis asociadas con la ingesta de granos enmohecidos incluyendo: anemia e inmunosupresión, hemorragias, emesis y rechazo de alimento en ganado porcino, vacuno y aves de corral. Los cerdos y otros animales monogástricos (incluyendo los humanos) son los más sensibles a estas toxinas, los pollos y los patos, son los más tolerantes, seguidos por los rumiantes (Scott, 1994).

La experimentación con animales ha demostrado que estas toxinas son teratogénicas, inhibidoras de la síntesis proteica y potentes inmunosupresores, predisponiendo a los animales a otras enfermedades (Overnes y col., 1997). En general, en todas las especies que sufren síntomas de intoxicación por tricotecenos, se produce una recuperación cuando el alimento contaminado es retirado de la ración (Rotter y col., 1996).

En pollos y pavos se necesitan niveles altos de tricotecenos para lograr una respuesta tóxica. El consumo de T-2 y DAS en forma crónica, inducen reducción en el consumo de alimento y en la ganancia de peso, lesiones orales, necrosis de ciertos tejidos (linfoide, hematopoyético, mucosa gástrica), posibles desordenes neurológicos y plumaje anormal (Ademoyero y Hamilton, 1989).

Datos históricos y epidemiológicos en seres humanos indican una asociación entre ciertas epidemias y el consumo de granos infectados con especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos. Brotes de leucopenia tóxica alimentaria (ATA) que ocurrieron en la Unión Soviética en los años cuarenta, han sido asociados con el consumo de granos infectados con *F. sporotrichinoides* (especie productora de T-2). En Japón, brotes de una enfermedad similar (akakaby-byo) fueron asociados con el consumo de granos infectados con *F. graminearum* (especie productora de DON). Sin embargo, no existen evidencias directas de que T-2 o DON hayan sido los metabolitos responsables de esas epidemias en seres humanos.

En 1993, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) en función de la limitada información disponible en seres humanos y animales, determinó que los tricotecenos DON, NIV, FX y T-2 no pueden ser clasificados como carcinógenos para seres humanos, por lo tanto fueron asignados dentro del grupo 3 por la IARC (Castegnaro y McGregor, 1998).

II.5.1. Efectos biológicos y toxicidad del deoxinivalenol (DON)

Deoxivalenol, también conocida como vomitoxina, en condiciones naturales se presenta junto con otros derivados de su familia, en trigo y cebada se han aislado 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON), 15- acetil-deoxinivalenol (15-ADON), 3,4-diacetil-nivalenol (3,4-DANIV) y 3,5-diacetil-deoxinivalenol (3,5-DADON) (Mirocha, 1979).

Los efectos tóxicos ocasionados en animales por DON son reducción de la ganancia de peso, rechazo del alimento, anemia e inmunosupresión. Los cerdos son extremadamente sensibles a esta micotoxina. En pollos se ha observado irritación del tracto gastrointestinal superior, hemorragias, desordenes nerviosos, disfunción renal y respuesta inflamatoria indefinida. Si

bien los niveles de contaminación natural con DON en los alimentos avícolas son bajos para producir micotoxicosis, se debe considerar la incidencia de más de una toxina que pueden interactuar potenciando el efecto (Kubena y col., 1997).

En general, bajo condiciones *in vivo* con varios animales domésticos el DON suprime la respuesta inmune normal e induce efectos autoinmunes, con superproducción de citocinas, activación de macrófagos y células T (Rotter y col., 1996).

La cocción y otros procesos no eliminan los niveles de DON en los productos alimenticios ya que esta micotoxina permanece después de procesos como la fermentación, encontrándose niveles preocupantes en la cerveza. Niveles de DON de 0.5 ppm pueden causar problemas de palatabilidad resultando en pérdidas económicas por el bajo consumo de alimento. Los niveles de riesgo varían según la especie animal y es influenciado por la edad y el estado general de salud. Los niveles preventivos para DON recomendados por la FDA son de 1 ppm en los productos de trigo para consumo humano; 10 ppm para cereales y subproductos destinados para la alimentación del ganado vacuno y aves de corral, que no exceda del 50% del total de la composición del mismo; 5 ppm para cerdos y otras especies como perros y gatos, que no exceda del 20% de la dieta (Scott, 1994).

II.5.2. Zearalenona

Las micotoxinas estrogénicas constituyen una clase importante de estrógenos ambientales. El nombre zearalenona (ZEA) deriva de *Gibberella zeae*, que fue el primer organismo descubierto como productor. Esta toxina es producida principalmente por la especie *F. graminearum*, contaminante común de los cereales e insumos animales: seguida por *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. gibbosum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* y *F. lateridium*.

La ZEA causa problemas en la agricultura, particularmente en la producción porcina debido a su contribución a la contaminación ambiental con estrógenos (Shier, 1998).

La estructura química de la ZEA corresponde a una lactona del ácido resorcílico, el cual es un anillo lactona macrocíclico unido a un resorcinol (Figura 5). Hasta el momento, se han aislado al menos siete compuestos del tipo de la ZEA en la naturaleza. Estos metabolitos difieren de la estructura principal en el grado de oxidación e hidroxilación entre el C-3 y C-8 en el anillo lactona, con excepción de los compuestos 5-formilzearalenona y los derivados 4-metileter (Shier, 1998).

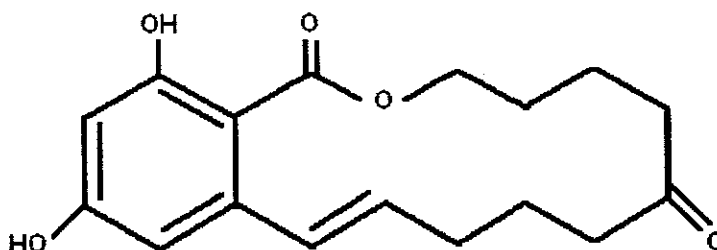


Figura 5. Estructura química de la zearalenona

La estructura de la ZEA sugiere que las mismas son sintetizadas por la vía del acetato polimalonato, de la cual resulta una cabeza de condensación de unidades acetato dentro de un esqueleto policétido, el cual requiere pocas conversiones posteriores para llegar a ZEA. En cuanto a su mecanismo de acción ZEA actúa como un estrógeno, adoptando una conformación muy similar al 17- β -estradiol y otros estrógenos naturales que le permite unirse a receptores estrogenicos de los tejidos (Shier, 1998).

II.5.2.1. Efectos biológicos y toxicidad de la zearalenona

Los cerdos son los animales más sensibles a los efectos tóxicos de la ZEA, aunque también se han observado síntomas en vacas lecheras, pavos y patos. El hiperestrogenismo es la enfermedad causada principalmente por esta toxina. Los síntomas observados en cerdas son vulvovaginitis, pudiendo progresar a un prolapso vaginal en los casos más severos. También se ha observado atrofia de los ovarios, con aumento de tamaño y edema en útero y glándulas mamarias. En machos jóvenes, esta toxina produce síntomas de feminización: engrosamiento de prepucio, atrofia testicular y desarrollo de las glándulas mamarias. En machos maduros no

se ve afectado el potencial reproductivo. Estos efectos adversos han sido observados con concentraciones de ZEA de 10 a 20 ppm: niveles más elevados (25 a 100 ppm) producen estros continuos, estados de pseudopreñez e infertilidad. Debido a la alta sensibilidad de estos animales a la ZEA aun a niveles tan bajos como 1 ppm se comienzan a observar efectos adversos (Prelusky y col., 1994).

Pocas alteraciones en los parámetros bioquímicos se han observado con la ingestión crónica de ZEA, estos incluyen: aumento en los niveles de la progesterona sérica y disminución de las hormonas luteinizante y prolactina. Signos de teratogenicidad han sido demostrados en cerdas y en ratas hembras alimentadas con insumos conteniendo altas concentraciones de ZEA (Scott, 1994). Los casos a campo de problemas inducidos por la ingestión de ZEA en vacunos han sido bien documentados, consumiendo alimentos o raciones contaminadas con niveles de 10 a 15 ppm. Las manifestaciones clínicas se asocian típicamente con el síndrome hiperestrogénico, diarrea, estados de estro continuo, infertilidad, vaginitis, disminución en la producción de leche y abortos. En vacunos, no se observaron cambios en los parámetros bioquímicos aun con niveles elevados de ZEA (Coppock y col., 1990; Weaver y col., 1989).

A elevadas concentraciones de ZEA en el alimento, los pavos pequeños son más sensibles que las ponedoras y los pollos en la misma edad. Estos últimos, son las aves de corral más resistentes a los efectos de esta toxina. Con los niveles bajos comúnmente registrados en los insumos, no se observan cambios en el consumo de alimento, ganancia de peso, producción de huevos, en los parámetros bioquímicos y hematológicos, en la apariencia histológica de los tejidos. En pollos alimentados con dosis de 800 ppm de ZEA durante 7 días se observaron síntomas leves, disminución en la ganancia de peso y algunos cambios en los pesos relativos de los órganos (Allen y col., 1981). Existen limitadas evidencias para considerar a la ZEA como posible agente carcinógeno en seres humanos (Castegnaro y McGregor, 1998).

II. 6. Incidencia de micotoxinas en maíz y alimentos destinados a consumo animal

Realizando una estimación del consumo en las dietas y conociendo los efectos toxicológicos de las toxinas, se puede comenzar el dificultoso proceso de estimación del riesgo debido a la presencia de micotoxinas en los alimentos. De esta manera podrán fijarse niveles regulatorios,

con el propósito de limitar la exposición del animal. La determinación de la incidencia, niveles de contaminación del maíz y productos derivados, con toxinas, no es un proceso simple y depende de muchos factores como pueden ser las condiciones ambientales. Además los datos dependen del desarrollo de los diseños estadísticos de muestreo, métodos analíticos empleados y procesos de control de calidad desarrollados. La contaminación de alimentos destinados al consumo animal usualmente refleja la incidencia de la infección fúngica en los cultivos originales durante una estación particular, la cual estaría influenciada por varios factores tales como: origen, sequía y daño por insectos.

La incidencia y los niveles de aflatoxinas varían de un área geográfica a la otra y aún dentro de las regiones. En general el problema de contaminación con AFs parece circunscribirse a las áreas tropicales y subtropicales, debido a las preferencias de temperatura de los hongos productores. La mayor contaminación del maíz con AFs, probablemente ocurre previo a la cosecha. Los insectos y el estrés hídrico son factores predisponentes, así como las prácticas de almacenamiento. El hongo tiende a invadir y concentrar su infección alrededor del germen del grano de maíz. En el proceso de la molienda, para la preparación de alimentos de consumo humano y animal, se descarta el germen y el endosperma con lo cual se efectúa una importante reducción en el contenido de AFs presentes en el grano original. Datos sobre la incidencia de AFs en el maíz que se destina al consumo animal y productos derivados han sido informados en todo el mundo (Price y col., 1993, Phillips y col., 1996, Céspedes y Días, 1997, Scudamore y Patel, 200, Dutta y Das, 2001, Escoar y Regueiro, 2002).

La contaminación por ocratoxina en maíz y otros alimentos esta documentada en diversos trabajos realizados en Sudamérica (Magnoli y col., 2003; Da Rocha, 2003). En Francia se han encontrado niveles elevados de OA en frutas y vinos (Pfohl-Leszkowicz y Molinié, 2003).

En los últimos años desde su descubrimiento (1988) ha existido gran interés en demostrar el efecto de la exposición humana y animal a las fumonisinas. Es de gran importancia documentar la incidencia de estas micotoxinas en productos agrícolas, ya que el conocimiento de los niveles de contaminación de las mismas y el patrón de consumo, permitirá establecer los niveles a los que está expuesta la población animal.

Visconti (2000) publica una revisión de los niveles de FBs detectados en granos post-cosecha, en el almacenamiento, y en los alimentos comerciales, reportando una incidencia en maíz para consumo humano y productos derivados de 47% a 82% entre los diferentes continentes

Los tricotecenos no macrocíclicos de los grupos A y B han sido encontrados como contaminantes naturales en todo el mundo. Las principales fuentes de tricotecenos en alimentos para humanos y animales son granos de cereales contaminados, fundamentalmente los que provienen de trigo, maíz, cebada, centeno, avena y arroz. En diversos países existen datos sobre la presencia de DON en el maíz, sin embargo, se consideran escasos (Chulze y col., 1989, Torres y col., 1990 y Rafai y col., 2000). Estudios de capacidad toxicogénica revelaron que el 74% de las cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo y maíz eran productoras de DON, entre otros tricotecenos (Molto y col., 1997).

De los cereales destinados a la elaboración de insumos, los granos de maíz son los más contaminados con ZEA, seguidos por trigo, cebada, avena, heno y ensilados de maíz. En general ZEA se encuentra en co-ocurrencia con DON, en la mayoría de los alimentos ensayados debido a que las principales especies productoras, *F. graminearum* y *F. culmorum*, son potencialmente productoras de ambas micotoxinas. Existen numerosos datos sobre la incidencia de ZEA en maíz y alimentos a base del mismo destinados a la producción animal (Price y col., 1993, Lauren y col., 1996, Scout, 1997, Li y col., 1999, Rafai y col., 2000).

II.7. Impacto económico y social de las micotoxinas

El impacto de las micotoxinas en la salud humana y animal es actualmente reconocido y se estima que las mismas causan graves pérdidas económicas estimadas en millones de dólares en todo el mundo (Peraica y col., 1999). Ello se traduce en un aumento de los costos para los productores de granos en menor rendimiento, valor nutritivo e incremento en los costos de transporte; para los ganaderos: menor rendimiento de los animales, problemas en la reproducción, aumento en la incidencia de enfermedades, gasto en personal veterinario, aumento en los costos de descontaminación y pérdida en los mercados; para los distribuidores: incremento en los costos de procesos tales como secado, destoxificación y capacidad de

almacenamiento; y para los industriales: pérdida de producto, costos de supervisión y análisis de micotoxinas en los productos (Osweiler, 2000; Hussein y Brasel, 2001).

Sólo en algunos casos particulares, es posible realizar un análisis directo de las pérdidas económicas producidas por la presencia de las micotoxinas en los productos agropecuarios. Un ejemplo de esto fue la contaminación de maíz con aflatoxinas en Estados Unidos en el año 1977, la cual representó una pérdida de alrededor de 111 millones de dólares. Pero los costos son imposibles de estimar cuando las micotoxicosis implican muertes humanas (Smith y Moss, 1985).

II.8. Prevención y control de micotoxinas

La estrategia más efectiva de controlar la contaminación con micotoxinas es la prevención tanto de la infección fúngica como en la producción de sus toxinas, a campo y durante el almacenamiento. Cuando la contaminación ha tenido lugar, existe la posibilidad de reducir los niveles de toxinas iniciales por debajo de los valores de tolerancia recomendados a través de la dilución de los granos contaminados o la implementación de estrategias de descontaminación (Charmley y col., 1995; Galvano y col., 2001).

Desde hace varios años, se han establecido límites regulatorios para las toxinas más peligrosas, AFs en cereales, oleaginosas y productos derivados destinados principalmente al consumo humano. En la actualidad se cuenta con numerosos datos que informan la co-ocurrencia de varias micotoxinas en los alimentos: AFB₁ y FB₁; OA y AFB₁; citrinina, DON, ácido penicílico y toxina T-2; Afs y ácido ciclopiazónico; AFB₁ y DON; AFB₁ y toxina T-2 (Moss, 1996).

Actualmente, 90 países poseen regulación o propuestas sobre límites de micotoxinas en sus alimentos, 77 países tienen algunas regulaciones, mientras 13 no poseen ninguna reglamentación vigente (FAO, 1997). La mayoría de las normas vigentes están referidas a las aflatoxinas en diversos alimentos, principalmente aquellos destinados al consumo humano (Boutrif y Canet, 1998).

Son pocos los países donde se establecen límites de micotoxinas en maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo animal (Tabla 6). Menos frecuentes son las regulaciones para: patulina, ocratoxina A (OA), fumonisina B₁(FB₁), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA) y toxina T-2. Obviamente, la necesidad de una legislación que imponga límites para las toxinas fúngicas en alimentos es ampliamente reconocida por los países industrializados.

Tabla 6. Niveles máximos de micotoxinas toleradas en los cereales y en alimentos a base de maíz para consumo animal

PAÍS	PRODUCTOS	MICOTOXINAS
Argentina	Maíz y subproductos	AFB 1: 5 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 20
Bosnia	Maíz, trigo, arroz y cereales	AFB1, AFG1 : 1
Brasil	Maíz	AFB1, AFG1: 30 ZEA: 200
Bulgaria	Cereales y subproductos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 2.5
China	Maíz y aceite de maíz	AFB1: 20
Costa Rica	Maíz	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 35
Cuba	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 5
Chipre	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 10
Dinamarca	Cereales y subproductos	Ocratoxina A
República Dominicana	Maíz y subproductos maíz importado	AFB1, AFG1 : 0 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 20
Egipto	Cereales y subproductos Maíz	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 10 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2: 20
Finlandia	Todos los alimentos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 :5
Francia	Todos los alimentos Cereales	AFB1: 10 ZEA: 200 Ocratoxina A: 5
Alemania	Todos los alimentos	AFB1: 5
Grecia	Maíz	AFB1: 5
Guatemala	Maíz	Afs totales : 10
Honduras	Todos los alimentos Maíz	AFB1, AFG1, AFG2 :1 AFB1 : 1
Israel	Maíz y subproductos	AFB1: 5 AFB1, AFB2, AFG1 AFG2 : 15
Italia	Todos los alimentos	AFB1 :5 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 10
Jamaica	Cereales	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 10
Jordania	Cereales y maíz	AFB1: 15 Afs Totales: 30
Macedonia	Maíz, trigo, arroz, cereales	AFB1, AFG1: 1
Nigeria	Todos los alimentos	AFB1 : 20
Países Bajos	Cereales y subproductos	Todas las micotoxinas: 0
Rusia	Cereales	AFB1 : 5 Zea : 1000 Toxina t-2 : 100, DON: 1000
Estados Unidos	Todos los alimentos	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 : 20

La presencia de múltiples toxinas en los alimentos debe ser considerada cuando se aplican estrategias de descontaminación y/o destoxificación. Un proceso se considera efectivo cuando cumple los siguientes requisitos: ser aceptado por las agencias regulatorias, ser económico, aplicable a gran escala y capaz de reducir el riesgo de exposición a un alimento contaminado con más de una toxina fúngica.

Debido a que los conocimientos sobre la importancia sanitaria y económica de la contaminación de micotoxinas en los alimentos, son relativamente recientes y que los estudios de toxicología crónica son muy prolongados, no existen métodos industriales de gran difusión tendientes a prevenir las micotoxicosis.

II.8.1. Métodos de eliminación de micotoxinas en productos agrícolas

Los métodos de disminuir la cantidad de micotoxinas en productos agrícolas se pueden dividir en tres categorías: químicos, biológicos y físicos (Charmley y Prelusky, 1994; Galvano y col., 2001).

Numerosos métodos químicos han sido propuestos para la destrucción o inactivación de las micotoxinas en insumos agrícolas contaminados naturalmente. Se han ensayado numerosos productos químicos para lograr la disminución de estos en los insumos. Sin embargo, la mayoría de estos métodos no satisfacen los criterios de aceptabilidad, debido a que si bien destruyen a las aflatoxinas, también disminuyen el valor nutricional del producto o producen metabolitos residuales tóxicos (Basappa y Shantha, 1996).

Entre los métodos biológicos, la acción microbiana es una alternativa para la reducción de los niveles de micotoxinas, en especial las AFs. Su efectividad se fundamenta en la presencia de un microorganismo controlador o la acción de compuestos químicos específicos producidos por éste, que inhiben el crecimiento del hongo productor o directamente la producción de sus toxinas (Hao y col., 1989).

Los métodos físicos de destoxificación desarrollados son: la limpieza, la separación mecánica, el lavado, la segregación por densidad, la inactivación térmica, la irradiación, el ultrasonido, la extracción con solventes y la adsorción. La mayoría de éstos métodos se usan para remover a las aflatoxinas de los productos agrícolas, tales como cacahuete y alimentos para animales (López-García y Park, 1998; Jackson y Bullerman, 1999).

Los procesos utilizados en la elaboración de alimentos para animales generalmente no producen disminución en los niveles de las micotoxinas. El peleteado del alimento disminuye los niveles de AFs, pero no los de DON. El proceso de ensilado del maíz no destruye las AFs, ZEA, DON y OA (Scott, 1991).

Uno de los métodos más recientes propuestos para la prevención de las micotoxicosis, consiste en el uso de sustancias adsorbentes o ligantes de micotoxinas, que se adicionan a los alimentos para animales durante el proceso de elaboración. Estas sustancias actúan posteriormente secuestrando las toxinas en el tracto gastrointestinal y reduciendo la biodisponibilidad de las mismas.

Una gran variedad de materiales adsorbentes, tales como, carbón activado, bentonitas, zeolitas, aluminosilicatos de sodio y calcio hidratado (HSCAS); otras variedades de arcillas, resinas sintéticas de intercambio iónico, como colestiramina y sustancias poliméricas como, polivinil-polipirrolidona han sido evaluados exitosamente en la adsorción de numerosas micotoxinas; (Piva y col., 1995; Ramos y Hernández, 1997; Scott, 1998; Galvano y col., 1997, 1998; Huwig y col., 2001). Ciertos aluminosilicatos han mostrado capacidad para unir AFs en aceite de cacahuete y alimentos para animales (Machen y col., 1988). Sin embargo los efectos a largo plazo y la seguridad de los aluminosilicatos no han sido determinados. Es importante destacar, que no existe en la literatura suficiente evidencia de que éstas sustancias adsorbentes disminuyan significativamente el valor nutricional de las raciones, mediante el secuestro de vitaminas, aminoácidos y minerales esenciales (Ledeux y col., 1999).

II.9. Metodología analítica para detección de micotoxinas

La determinación de micotoxinas se fundamenta en cuatro etapas: el muestreo, la extracción y limpieza, cuantificación y finalmente la confirmación. Para la determinación es necesario establecer un programa de muestreo eficiente para obtener resultados precisos, así como la preparación de las muestras. Una deficiente toma de muestra dará resultados erróneos y no se conocerá el nivel correcto de contaminación por la distribución irregular de las mismas.

La metodología para la cuantificación de la mayoría de las micotoxinas, en la actualidad es avanzada, variando los procedimientos según el alimento, la toxina y el equipo que se tenga en el laboratorio.

La técnica de cromatografía de capa fina (TLC) ha sido utilizada para separar identificar y cuantificar las micotoxinas, requiere de limpieza de los extractos de una columna cromatográfica para purificarlos. Los extractos son concentrados y las micotoxinas son detectadas con luz ultravioleta después de correr las muestras y estándares en una fase estacionaria por lo general de sílica gel y como fase móvil diversos solventes (Garza, 1994). Esta técnica por sus características se considera semicuantitativa y ha mostrado la desventaja de presentar gran variabilidad analítica (Montemayor, 1994).

La cromatografía de líquidos de alta precisión, ha demostrado ser la técnica de elección para la cuantificación de micotoxinas, llegando a detectar niveles en ppb (10 ng), al igual que el método de TLC requiere de la purificación de los extractos y la separación en la columna cromatográfica a través de una fase móvil formada por diferentes solventes y al final la detección por luz ultravioleta o por fluorescencia. Sin embargo, requiere de alta inversión en equipo, de personal calificado y tiempo en las determinaciones, aunados a un alto costo de operación (Quattrocchi y col., 1992).

Con el desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales en aplicaciones analíticas, particularmente en el terreno de las micotoxinas, es posible realizar análisis rápidos y confiables de micotoxinas a bajos costos. Las técnicas desarrolladas incluyen a los sistemas

de inmunoensayos como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) y cromatografía mediante columnas de inmunoafinidad con detección fluorométrica (Pestka y col, 1995). Estas pruebas se basan en la reacción antígeno-anticuerpo.

Las pruebas de inmunoensayo enzimático (ELISA) pueden ser de manera directa, indirecta o por inmunoensayo enzimático competitivo, en esta última, la micotoxina libre y el conjugado de micotoxina-enzima compiten por los sitios del anticuerpo, posteriormente se agrega un sustrato cromógeno y se incuba, la reacción se detiene y se realiza una medición fotométrica a 450 nm de longitud de onda en el Lector de ELISA.

El principio de las columnas de inmunoafinidad para el análisis de micotoxinas está dado por la presencia de anticuerpos en la columna, los cuales son específicos a cierta micotoxina. El extracto de una muestra se pasa a través de la columna y el anticuerpo retiene a la micotoxina, la cual posteriormente se recupera mediante el paso de un eluyente que desactiva el anticuerpo y deja libre a la micotoxina, que se cuantifica por fluorimetría (RDT, 1998; Bommeli, 1999). Puesto que la adquisición del equipo de HPLC requiere de gran inversión es necesario realizar estudios que comparen esta técnica con la de cromatografía de líquidos.

II.10. El maíz (*Zea mays*) en México

La producción mundial promedio de maíz en el año de 1999 fue de 605 millones de toneladas, siendo los principales países productores de maíz: Estados Unidos, que aporta el 40% y China el 21 %; en menor medida participan, Brasil y México, con una contribución del 6 y 3 % (Centro de Estadística Agropecuaria SAGAR, 2000a; Grains: World Markets and Trade; Foreign Agricultural Service, USDA; 1999).

Las prácticas productivas y comerciales en el mundo, ubican al maíz como el principal grano destinado al consumo de la ganadería, siguiendo en orden de importancia la cebada, el sorgo y la avena. En el periodo 1995-1999, la producción promedio de estos granos ascendió a más de 800 millones de toneladas, de las cuales el 71% correspondieron a maíz, el 18% a cebada, el 8% a sorgo y el resto a avena (Centro de Estadística Agropecuaria SAGAR, 2000b).

La producción de maíz en México se desarrolla predominantemente en el ciclo primavera-verano, bajo la modalidad de temporal con una participación de 81.7%, mientras que ciclo Otoño-Invierno representa el 18.3%. La importancia del maíz en el subsector agrícola se aprecia a través de su alta participación en la alimentación nacional, en la superficie sembrada y su peso relativo en el valor de la producción.

La oferta total de maíz grano en México esta determinada principalmente por la producción nacional y en menor medida por las importaciones, de tal manera que el grano nacional contribuye en promedio con el 86% de la oferta total. El maíz grano se produce prácticamente en todos los estados de la república, bajo un mosaico de formas y procedimientos productivos con diferentes grados de tecnificación y utilización de una amplia variedad de semillas, que se reflejan en las características del producto (Centro de Estadística Agropecuaria, SAGAR 2000c, SECOFI, CONAPO, CANAMAIZ).

En el periodo 1990-1998, la superficie sembrada de maíz representó en promedio el 52.8% de la superficie nacional de los cultivos cíclicos en el año agrícola, cubriendo una superficie de 8.5 millones de hectáreas. Siendo los mejores productores los estados de Jalisco, Chiapas, Michoacán, Guerrero, Guanajuato y Veracruz, que en conjunto aportan el 50.1% de la producción total del ciclo primavera-verano, con una producción promedio de 14.0 millones de toneladas a nivel nacional y de 3.1 millones de toneladas para el ciclo Otoño-Invierno (Centro de Estadística Agropecuaria, SAGAR, 2000a).

La producción de maíz se destina predominantemente al consumo humano y en menor medida, pero con volúmenes crecientes para el consumo pecuario e industrial. El consumo de la población depende de su industrialización y comercialización, lo que permite la generación de productos que van desde la tortilla hasta los cereales de mesa, aceites comestibles, frituras, almidones y fructosa; Como alimento para animales: en forma directa o es canalizado a la industria de alimentos balanceados, principalmente para aves y cerdos (Agro, 2000).

El consumo de maíz por la población mexicana representa el 72% del total producido, correspondiendo el 59.5% a consumo en tortillas, y en menor proporción a otros alimentos a

base del mismo. El consumo per cápita se calcula de 300 g por día que aportan el 56% de las calorías y el 47% de las proteínas en la alimentación del mexicano, en las áreas rurales estos porcentajes son del 76% y 56% respectivamente (González, 1995).

El estado de Jalisco ocupó el primer lugar nacional en producción de maíz durante el ciclo primavera-verano del 2002, registrando una producción de 3 millones 29 mil 144 toneladas (Centro de Estadística Agropecuaria, SAGAR, 2003). Entre los principales municipios productores de maíz se encuentran: Acatic, Ameca, Ayotlán, Ocotlán, Degollado, Ciudad Guzmán, Ixtlahuacán de los Membrillos, La Barca, Tlajomulco, Tototlán, Villa Corona y Zapopan.

Acatic presenta una extensión territorial de 362.39 km² y su orografía se considera plana (42%) y semiplana (47%), y en una proporción menor (11%) zonas accidentadas. Sus recursos hidrológicos son proporcionados por los ríos y arroyos que conforman las subcuencas río Verde, Grande Belén y Santiago. El clima es semiseco, con otoño e invierno secos, y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 18.5 °C, con máxima de 30.5 °C y mínima de 7.6 °C.

Ameca, de extensión territorial de 685.73 km², presenta una orografía conformada por zonas planas (45%), semiplanas (40%) y accidentadas (15%). Sus recursos hidrológicos son proporcionados principalmente por el río Ameca y el río Muerto. El clima es semiseco, con invierno y primavera secos, y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 21.3 °C, con máxima de 30.7 °C y mínima de 11.9 °C.

Ixtlahuacán de los Membrillos presenta una extensión territorial de 184.25 km² y su orografía se constituye por zonas planas (62%), semiplanas (20%) y accidentadas (18%). Sus recursos hidrológicos son proporcionados por el río Santiago; Los arroyos: Los Sabinos, Los Lobos, Agua Escondida. El clima es semiseco, con otoño e invierno secos y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 19.8 °C, con máxima de 25.2 °C y mínima de 14.6 °C.

Villa Corona presenta una extensión territorial de 197.37 km² y su orografía se considera plana (42%) en su mayor parte, con altitudes entre los 900 y los 1,500 metros sobre el nivel del mar correspondientes al extremo de la sierra de Tapalpa y zonas semiplanas (42%). Sus recursos hidrológicos son proporcionados por los arroyos: Zarco, Colorado, La Compuerta y El Corral Falso; Por la Laguna de Atotonilco; los manantiales de aguas termales de Chimulco, Agua Caliente, El Tular, Las Delicias. El clima es semiseco y semicálido, sin cambio térmico invernal bien definido. Los meses más calurosos son mayo y junio. La temperatura media anual es de 20.5 °C, con máxima de 29 °C y mínima de 12.1 °C. La tabla 7 muestra la producción agrícola y pecuaria anual reportadas en los municipios por el sector agropecuario del 2001.

Tabla 7. Producción Agrícola y Pecuaria en Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona, Jalisco

Localidad	Superficie sembrada Has.	Producción * Toneladas	Bovinos leche **	Bovinos carne **	Cerdos **	Ovinos y caprinos **	Aves **
Acatic	11,760	44,579	7,471	7,635	63,599	1,435	2,624
Ameca	20,459	72,996	10,639	51,115	8,332	9,995	301,412
Ixtlahuacán de los membrillos	10,313	29,547	9,233	10,795	8,428	2,347	265,655
Villa Corona	6,435	12,251	6,699	7,519	23,267	20,746	213,966

* ciclo primavera-verano ** número de cabezas

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El impacto de las micotoxinas en la salud humana y animal es actualmente reconocido y se estima que causan graves pérdidas económicas, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estima que cada año el 25% de la producción agrícola destinada a los alimentos es afectada por las micotoxinas (Van-Egmond, 1995; Peraica y col., 1999).

Los principales efectos de la contaminación de alimentos por micotoxinas son el aumento de los costos para los productores de granos, ocasionados por un menor rendimiento, valor nutritivo e incremento en los costos de transporte. Para los ganaderos son: menor rendimiento de los animales, problemas en la reproducción, aumento en la incidencia de enfermedades, gastos en personal veterinario, aumento en los costos de descontaminación y pérdidas en los mercados. Para los distribuidores: incremento en los costos de procesos tales como secado, destoxicación y capacidad de almacenamiento; y para los industriales: pérdida de producto, costos de supervisión y análisis de micotoxinas en los productos (Postupolski y col., 1999; Osweiler, 2000; Hussein y Brasel, 2001).

Actualmente se pretende resolver el problema de contaminación de micotoxinas mediante la utilización de genotipos de maíz de mayor resistencia al desarrollo de hongos micotoxigénicos, además de mejorar el manejo agrícola durante el cultivo y la cosecha.

En algunos países se tienen reportes sobre los niveles de contaminación por micotoxinas, lo que ha permitido se establezcan niveles tolerables en los alimentos de humanos y animales, sin embargo, en México son pocos los estudios que se han realizado respecto a la contaminación por micotoxinas, siendo principalmente dirigidos a las aflatoxinas, las cuales son las únicas micotoxinas que la FDA ha reglamentado con niveles permisibles para la alimentación. Por lo que resulta necesario realizar estudios que determinen los niveles de contaminación por micotoxinas en el maíz que se cosecha en el estado de Jalisco.

IV. JUSTIFICACIÓN

Es importante valorar los niveles de contaminación por las principales micotoxinas que tienen impacto a la salud de humanos y animales (aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina y zearalenona), relacionando la incidencia de los niveles presentes de las micotoxinas con los diferentes genotipos de tres variedades de maíz, desarrolladas por el Centro de Investigaciones en Producción de Semillas, del Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, de la Universidad de Guadalajara.

Puesto que actualmente se han desarrollado técnicas a partir de anticuerpos monoclonales y policlonales, para la determinación de micotoxinas como alternativa del uso de la cromatografía de líquidos de alta precisión, técnica de alta sensibilidad y exactitud, sin embargo, poco accesible por su costo y manejo, es necesario que las técnicas desarrolladas para el análisis en menor tiempo y costo sean valoradas en forma comparativa.

Por otra parte, debido a que la contaminación de hongos productores de micotoxinas en campo es influenciada por los factores climatológicos que prevalecen durante el cultivo, se pretende analizar las condiciones de temperatura y precipitación pluvial en cada localidad a fin de determinar si se presentaron condiciones favorables para la producción de micotoxinas en las zonas estudiadas.

V. HIPÓTESIS

Las condiciones climatológicas particulares de Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona favorecen la presencia de hongos y la producción de micotoxinas en diferentes variedades de maíz.

La determinación de micotoxinas como aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxinas son comparables cuando se determinan mediante cromatografía de inmunoafinidad o inmunoensayo competitivo.

VI. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar los niveles de contaminación de aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina y zearalenona en maíz de tres variedades cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco.

PARTICULARES:

- I. Cuantificar los niveles de aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina y zearalenona en maíz de las variedades UDG; 600, 601 y 602 cosechadas en Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona Jalisco en el ciclo primavera-verano de 1997.
- II. Valorar las condiciones climatológicas de temperatura; máxima, mínima y promedio y precipitación pluvial registradas durante el ciclo del cultivo primavera-verano de 1997 en las cuatro localidades de estudio.
- III. Comparar las técnicas de cromatografía de inmunoafinidad e Inmunoensayo competitivo para la detección de aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxinas.

VII. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de micotoxinas del departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

VII. 1. Muestreo

Bajo un diseño completamente al azar se obtuvieron muestras de maíz al término de la cosecha en las localidades de Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona, Jalisco (ciclo primavera-verano de 1997), se recolectaron mazorcas de maíz de las variedades UDG-600, UDG-601 y UDG-602, nueve mazorcas por variedad y localidad (n=108). Las cuales se secaron y mantuvieron almacenadas a temperatura ambiente en frascos de polipropileno con un contenido de humedad menor a 10%.

La determinación de las micotoxinas (aflatoxina, deoxinivalenol, fumonisina, ocratoxina y zearalenona) se realizó a partir de muestras compuestas de tres mazorcas previamente desgranadas con 3 repeticiones por determinación.

La detección y cuantificación de todas las micotoxinas se realizó mediante cromatografía por inmunoafinidad y detección fluorométrica (® Vicam), descrita por Ware y col. (1994), y con la técnica de inmunoensayo competitivo (Agraquant ® Romer Labs) se detectaron aflatoxina, fumonisina y ocratoxina.

La valoración de las condiciones climatológicas de temperatura; máxima, mínima y promedio y precipitación pluvial se realizó obteniendo los datos registrados en las estaciones meteorológicas cercanas a las cuatro localidades de estudio que fueron proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CNA).

VII. 2. Descripción de las técnicas analíticas

Técnica de Cromatografía por Inmunofinidad y detección Fluorométrica para Aflatoxinas:

1. Se colocan 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregan 100 mL de metanol al 80% y licua a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasa a través de un filtro de papel aflautado y se colecta en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyen con 40 mL de agua destilada.
3. Se filtra el extracto diluido a través de papel microfibra de vidrio y 10 mL del extracto filtrado se agregan a la columna de inmunofinidad.
4. Se lava dos veces la columna con 10 mL de agua destilada.
5. Se realiza la elución de la micotoxina con 1 mL de metanol grado HPLC y colecta en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro. Se añade 1 mL del revelador Aflatest y se lee la concentración en el fluorómetro.

Técnica de Cromatografía por Inmunofinidad y detección Fluorométrica para deoxinivalenol:

1. Se colocan 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregan 200 mL de agua destilada y licua a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasa a través de un filtro de papel aflautado, se realiza una segunda filtración en papel microfibra de vidrio.
3. Se agregan 6 mL del extracto filtrado a la columna de inmunofinidad.
4. Se lava dos veces la columna con 10 mL de agua destilada.
5. Transferir la columna a una jeringa de vidrio seca.
6. Se realiza la elución de la micotoxina con 0.75 mL de metanol grado HPLC y colecta en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro.
7. Se transfieren 0.5 mL del eluato a un segundo tubo fluorométrico, se añaden 0.5 mL de metanol grado HPLC, posteriormente 0.5 mL del revelador A y 0.5 mL del revelador B y se mezcla en vortex por 5 segundos. Se lee la concentración en el fluorómetro.

Técnica de Cromatografía por Inmunofinidad y detección Fluorométrica para fumonisinas:

1. Se colocan 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregan 100 mL de metanol al 80% y licua a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasa a través de un filtro de papel aflautado y se colecta en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyen con 40 mL de solución 0.1% Tween PBS.
3. Se filtra el extracto diluido a través de filtro microfibras y 10 mL del extracto filtrado se agregan a la columna de inmunofinidad.
4. Se lava la columna con 10 mL de solución 0.1% Tween PBS y un segundo lavado con 10 mL de agua destilada.
5. Se realiza la elución de la micotoxina con 1 mL de metanol grado HPLC y colecta en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro. Se añade 1 mL del revelador Fumonitest y se lee la concentración.

Técnica de Cromatografía por Inmunofinidad y detección Fluorométrica para ocratoxinas:

1. Se colocan 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregan 100 mL de metanol al 80% y licua a alta velocidad durante 1 minuto.
2. Se pasa a través de un filtro de papel aflautado y se colecta en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyen con 40 mL de agua destilada.
3. Se filtra el extracto diluido a través de filtro microfibras y 10 mL del extracto filtrado se agregan a la columna de inmunofinidad.
4. Se lava la columna con 10 mL de buffer de lavado para micotoxinas y posteriormente con 10 mL de agua destilada.
5. Se realiza la elución de la micotoxina con 1.5 mL con solución de Ocratest y colecta en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro y se lee la concentración.

Técnica de Cromatografía por Inmunofinidad y detección Fluorométrica para zearalenona:

1. Se colocan 20 g de muestra con 2 g de cloruro de sodio en licuadora. Se agregan 50 mL de metanol al 80% y licua a alta velocidad durante 2 minutos.

2. Se pasa a través de un filtro de papel aflautado y se colecta en un vaso de precipitado. 10 mL del extracto filtrado se diluyen con 40 mL de solución 0.1% Tween PBS.
3. Se filtra el extracto diluido a través de filtro microfibras y 10 mL del extracto filtrado se agregan a la columna de inmovilización.
4. Se lava la columna con 10 mL de solución 0.1% Tween PBS y un segundo lavado con 10 mL de agua destilada.
5. Se realiza la elución de la micotoxina con 1 mL de metanol grado HPLC y se colecta en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro. Se añade 1 mL del revelador Z y se lee la concentración en el fluorómetro.

Técnica de Inmunoensayo Competitivo para aflatoxinas, ocratoxinas y fumonisinas:

1. Para la extracción 20 g de muestra molida junto con 100 ml de solución de metanol al 70% se mezclan vigorosamente por 2 minutos en licuadora y posteriormente se filtra.
2. Se toma la cantidad de celdillas verdes que se van a utilizar (una celdilla por cada muestra, más las de los controles) y el mismo número de celdillas recubiertas con anticuerpos.
3. Se agregan 200 μ l de conjugado (frasco de tapa verde) a cada celdilla de mezclado y usando una punta nueva cada vez, agregar 100 μ l de las muestras y controles a las celdillas de mezclado, con la micropipeta multicanal, se mezclan las celdillas aspirando y vaciando a las puntas varias veces.
4. Se transfieren 100 μ l de las celdillas de mezclado a las celdillas recubiertas correspondientes e incuban por 15 minutos a temperatura ambiente. Se desechan las celdillas de mezclado.
5. Utilizando una pipeta multicanal se llena cada una de las celdillas recubiertas con agua, se repite este proceso 5 veces. Debe asegurarse de remover todos los residuos de agua, colocando la tira de las celdillas hacia abajo sobre una toalla de papel golpeándolos fuertemente.
6. Se colocan 100 μ l del sustrato que contiene la enzima a cada celdilla e incuban 5 minutos a temperatura ambiente.

7. Con la pipeta multicanal se agregan 100 μ l de la solución que detiene la reacción de la enzima con el complejo antígeno-anticuerpo en cada celdilla. El color de la solución debe cambiar de azul a amarillo.
8. Se limpia la base de las celdillas y leer a 450 nm en el lector (espectrofotómetro) tomando como blanco el aire.

Los valores medios de absorción obtenidos de los estándares y de las muestras se dividen por el valor de absorción del primer estándar (estándar cero) y se multiplican por 100. De esta forma, el estándar cero es igual a 100% y los demás valores de absorción se indican en porcentaje.

$$\frac{\text{Absorción del estándar (muestras)}}{\text{Absorción del estándar cero}} \times 100 = \% \text{ Absorción}$$

Deben aplicarse los valores calculados para los estándares a un sistema de coordenadas en papel semilogarítmico contra la concentración de las micotoxinas en ppb o ppm según el caso. La concentración de la micotoxina correspondiente a la absorción de cada muestra puede ser leída directamente de la curva de calibración o utilizando el programa proporcionado Romer labs.

Los resultados se contrastaron mediante el Análisis de Varianza a un nivel de confianza del 95% y 99%. Se compararon de acuerdo al tipo de variedad y entre localidades. Los datos climatológicos se presentan en tablas y figuras para el estudio comparativo.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Contaminación por micotoxinas

Los hallazgos en la determinación de micotoxinas en el maíz presentaron bajos niveles de aflatoxina mediante la técnica de inmunoensayo enzimático y no fue detectada por cromatografía de inmunoafinidad. Los niveles promedio por localidad fluctuaron de 0.77 ppb a 3.47 ppb. No se observó diferencia estadística ($p > 0.05$) entre localidades y variedades (tabla 8).

Tabla 8. Niveles promedio de aflatoxinas (ppb) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoensayo Enzimático

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
ACATIC	1.0	0.1	0.77	0.06	0.93	0.95
AMECA	1.4	0.27	0.96	1.67	2.13	0.21
IXTLAHUACÁN	2.03	1.78	1.13	0.12	3.47	0.42
VILLA CORONA	0.8	ND	0.93	0.15	1.47	1.29

ppb: partes por billón : \bar{x} promedio s: desviación estándar ND: no detectado

Se encontró 100% de contaminación de fumonisinas en las muestras analizadas por cromatografía de inmunoafinidad con niveles promedio de 3.53 a 17.9 ppm (tabla 9) y mediante inmunoensayo enzimático se observó en el 70%, con niveles de 0 a 4 ppm (tabla 10). Cuando se compararon los resultados obtenidos por cromatografía de inmunoafinidad se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) entre variedades en Ameca, mostrando la mayor contaminación la variedad UDG 600 (12.8 ppm), no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las otras localidades. Sin embargo, Villa Corona, mostró la mayor contaminación por fumonisinas en las tres variedades. Los resultados obtenidos por inmunoensayo enzimático fueron menores en todas las localidades y variedades estudiadas, a los detectados por cromatografía de inmunoafinidad, mostrando los mayores niveles de fumonisinas la variedad UDG 601 en Acatic, Ameca e Ixtlahuacán de los Membrillos.

Tabla 9. Niveles promedio de fumonisinas (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunoafinidad

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
ACATIC	4.57	4.53	7.53	3.13	7.2	4.39
AMECA	12.8 a	4.91	6.67 b	0.57	5.7 b	0.87
IXTLAHUACÁN	9.7	8.6	3.53	1.65	4.77	2.73
VILLA CORONA	11.9	7.38	11.36	7.54	8.97	4.37

Las literales a y b indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre variedades.
ppm: partes por millón \bar{x} : promedio s: desviación estándar

Tabla 10. Niveles promedio de fumonisinas (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoensayo Enzimático

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	S	\bar{x}	S
ACATIC	0.43	0.75	3.4	2.51	0.37	0.32
AMECA	0.13	0.15	2.03	3.35	0.03	0.06
IXTLAHUACÁN	3.0	4.35	4.0	4.19	0.27	0.25
VILLA CORONA	1.6	2.89	0	0	0.07	0.07

ppm: partes por millón \bar{x} : promedio s: desviación estándar

La detección de ocratoxina mostró resultados contrastantes entre técnicas, cuando se analizaron mediante cromatografía de inmunoafinidad los niveles promedios entre localidades fueron de 2.73 a 38.67 ppb (tabla 11), correspondiendo a Villa Corona la menor contaminación; se encontró diferencia estadística entre variedades ($p < 0.01$) en Acatic y Ameca. Además de observarse diferencia significativa ($p < 0.05$) entre localidades cuando se compararon en la variedad UDG 601, mostrando la mayor concentración de ocratoxinas en

Acatic e Ixtlahuacán de los Membrillos. Los resultados que se obtuvieron mediante inmunoensayo enzimático fluctuaron de 0.67 a 3.2 ppb, mostrando la variedad UDG 601 los mayores valores en Acatic y Ameca (tabla 12).

Tabla 11. Niveles promedio de ocratoxinas (ppb) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunofinidad

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
ACATIC	2.73 c	1.32	37.66 a *	12.01	18.53 b	0.58
AMECA	19.67 b	1.53	19.33 b **	0.58	24.0 a	2.0
IXTLAHUACÁN	35.67	1.53	38.67 *	1.53	13.93	18.38
VILLA CORONA	7.6	1.91	9.03 ***	0.99	8.2	1.74

Las literales a y b indican diferencia estadística $p < 0.01$ entre variedades.

Los asteriscos *, ** y *** indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre localidades

ppb: partes por billón \bar{x} : promedio s: desviación estándar

Tabla 12. Niveles promedio de ocratoxinas (ppb) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Inmunoensayo Enzimático

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	S
ACATIC	1.75	1.48	2.8	0.42	1.1	0.14
AMECA	0.67 b	0.45	2.5 a	0.4	0.8 b	0.26
IXTLAHUACÁN	1.63	0.57	1.23	0.40	1.57	0.32
VILLA CORONA	3.2 a	0.17	1.2 b	0.40	0.93 b	0.23

Las literales a y b indican diferencia altamente significativa $p < 0.01$ entre variedades.

ppb: partes por billón \bar{x} : promedio s: desviación estándar

La detección de deoxinivalenol mediante cromatografía de inmunoafinidad mostró niveles promedio entre 3.13 y 16.17 ppm, se observó diferencia estadística ($p < 0.05$) entre localidades cuando se analizó la variedad UDG 601, siendo mayor la concentración para Acatic (tabla 13), mientras que Villa Corona mostró la menor concentración de deoxinivalenol en la tres variedades de maíz estudiadas.

Tabla 13. Niveles promedio de deoxinivalenol (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunoafinidad

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
ACATIC	16.17	17.21	12.53 a	4.39	4.97	1.46
AMECA	7.1	3.41	7.67 b	1.62	8.87	0.99
IXTLAHUACÁN	8.93	3.0	4.1 c	0.5	6.47	3.93
VILLA CORONA	3.53	0.70	3.97 c	1.07	3.13	0.40

Las literales a, b y c indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre localidades.
ppm: partes por millón \bar{x} : promedio s: desviación estándar

Las concentraciones de zearalenona presentes en el maíz se mantuvieron en un rango de 0.01 a 0.51 ppm (tabla 14), mostrando los mayores niveles la variedad UDG 601 en Ixtlahuacán de los Membrillos y la variedad UDG 602 en Villa Corona, existiendo diferencia estadística entre las variedades de maíz en Villa Corona y entre localidades cuando se compararon en la variedad UDG 600.

Tabla 14. Niveles promedio de zearalenona (ppm) detectados en las variedades de maíz cosechadas en cuatro localidades del estado de Jalisco mediante Cromatografía de Inmunofinidad

Localidad	UDG 600		UDG 601		UDG 602	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
ACATIC	0.11	0.09	0.35	0.31	0.25	0.06
AMECA	0.32	0.14	0.3	0.12	0.17	0.02
IXTLAHUACÁN	0.1	0.01	0.51	0.36	0.22	0.21
VILLA CORONA	0.22 b	1.83	0.33 ab	0.06	0.5 a	0.02

Las literales a y b indican diferencia estadística $p < 0.05$ entre variedades.
ppm: partes por millón \bar{x} : promedio s: desviación estándar

VIII.2. Condiciones ambientales

La tabla 15 muestra las temperaturas reportadas durante el ciclo primavera-verano 1997 en las cuatro localidades evaluadas. Los registros obtenidos se presentan para máximas, mínimas y promedio por quincena. El rango de temperaturas máximas en Acatic fue de 25.7 a 31.7°C; en Ameca de 30.2 a 37°C; Ixtlahuacán de los Membrillos de 27.5 a 30.8°C; y en Villa Corona de 28.7 a 33°C. Las temperaturas mínimas disminuyeron en las localidades en forma similar la segunda quincena de octubre (Figura 6), registrando la menor temperatura Ixtlahuacán de los Membrillos (4.5°C). Las temperaturas promedios se mantuvieron en un rango de 16 a 23°C en Acatic; de 19.7 a 27.7°C en Ameca; en 16.7 a 23.9°C en Ixtlahuacán y de 18.1 a 24.2°C en Villa Corona, Jalisco.

Tabla 15. Temperaturas (°C) registradas en Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villa Corona durante el ciclo primavera – verano 1997

Fecha	ACATIC			AMECA			IXTLAHUACÁN			VILLA CORONA		
	máx	\bar{x}	Mín	máx	\bar{x}	Mín	máx	\bar{x}	mín	máx	\bar{x}	mín
1ª jun	31.7	23.2	14.7	37.5	27.7	18.0	30.8	23.9	16.9	33.0	24.2	15.4
2ª jun	26.9	21.6	16.2	33.7	26.5	19.4	27.6	22.9	18.2	30.2	23.6	17.0
1ª jul	26.3	20.9	15.4	32.0	25.2	18.3	27.8	23.0	18.1	29.1	22.6	16.0
2ª jul	26.7	20.9	15.2	32.2	25.2	18.1	28.1	23.0	17.8	29.8	23.1	16.3
1ª ag	27.2	20.8	14.5	32.1	25.4	18.7	28.5	23.2	17.8	29.1	22.5	15.9
2ª ag	27.1	20.4	13.6	32.6	25.6	18.6	28.5	22.7	17.0	29.6	22.2	14.7
1ª sep	25.7	19.7	13.8	32.0	25.2	18.3	27.5	22.3	17.1	29.6	23.0	16.3
2ª sep	27.1	20.8	14.4	32.5	25.8	19.1	28.0	22.7	17.4	30.2	23.2	16.2
1ª oct	26.4	20.0	13.6	32.3	24.8	17.4	28.6	22.7	16.7	29.5	22.7	15.9
2ª oct	25.8	16.1	6.4	31.6	21.3	10.9	29.1	17.0	4.9	28.7	18.5	8.2
1ª nov	26.4	18.2	9.9	30.2	21.8	13.4	29.0	17.1	5.2	28.8	20.1	11.4
2ª nov	26.1	16.0	5.8	31.2	19.7	8.2	28.8	16.7	4.5	29.0	18.1	7.2

1ª: promedio de primera quincena 2ª: promedio de segunda quincena máx: máxima \bar{x} : promedio mín: mínima.

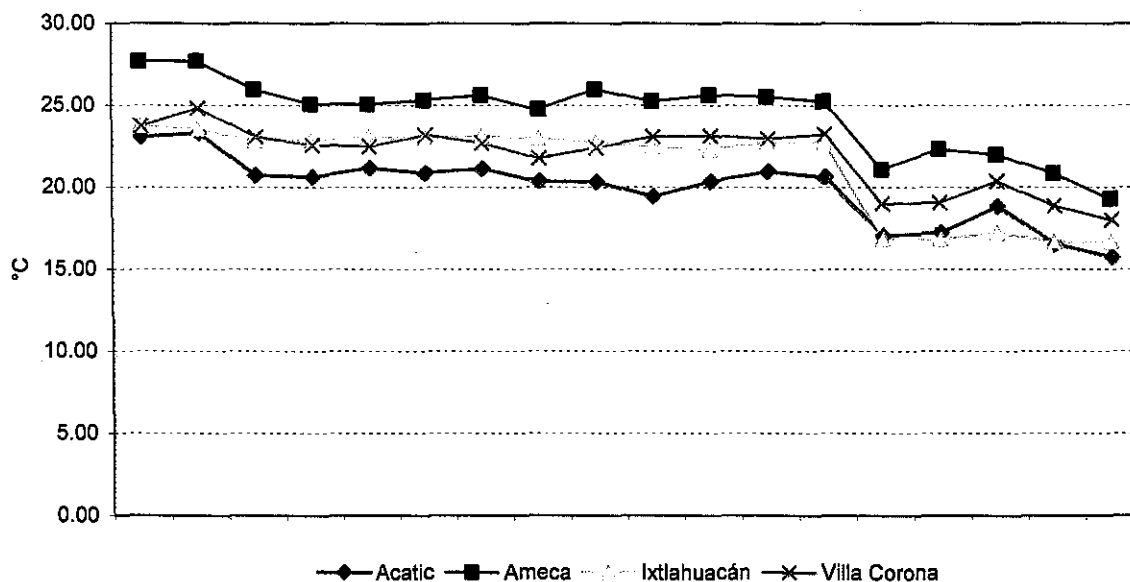


Figura 6. Temperaturas promedio registradas durante el ciclo primavera-verano 1997

La precipitación pluvial en las distintas localidades se presenta en la tabla 16. Los niveles fueron registrados en milímetros (mm) y fueron los acumulados cada 10 días.

Tabla 16. Precipitación pluvial acumulada (mm) durante el ciclo primavera-verano 1997

Fecha	Acatic	Ameca	Ixtlahuacán de los membrillos	Villa Corona
1-10 junio	20.8	8.5	7.1	9.5
11-20 junio	49.4	63.5	88.1	48
21-30 junio	183	58.4	71.7	113
1-10 julio	185.6	69.7	45.1	45.5
11-20 julio	14.8	65	76.2	111.5
21-31 julio	54.5	84	53.4	28.4
1-10 agosto	16.7	60.5	41.8	52.5
11-20 agosto	48	46.7	17.4	14.3
21-31 agosto	32	7.1	54.3	20
1-10 septiembre	39.4	90.5	18.3	30.5
11-20 septiembre	25.4	6	17.2	18.5
21-30 septiembre	7.6	89.5	2.6	12
1-10 octubre	12.9	24.7	16.4	29
11-20 octubre	129.8	60	100.7	64
21-31 octubre	0	0	0	0
1-10 noviembre	5.4	4.1	4.8	3.5
11-20 noviembre	11.8	26	25.8	22
21-30 noviembre	0	0	0	0

Se observó alta precipitación en Acatic durante la tercera decena de junio y primera de julio, posteriormente se mantuvo constante, excepto por la segunda decena de octubre, cuando se incrementó nuevamente (Figura 7). En las otras localidades la precipitación pluvial mostró mínimas variaciones y en todas disminuyeron durante la última decena (21 al 30 de noviembre). La mayor precipitación pluvial se observó en Acatic, durante la primera decena de julio con 185.6 mm y en la segunda decena de octubre con 129.8 mm. Destaca el incremento de la precipitación pluvial que se registró en Ixtlahuacán de los Membrillos durante la segunda decena de octubre, los niveles fueron de 100.7 mm, mayor que en la época de lluvias.

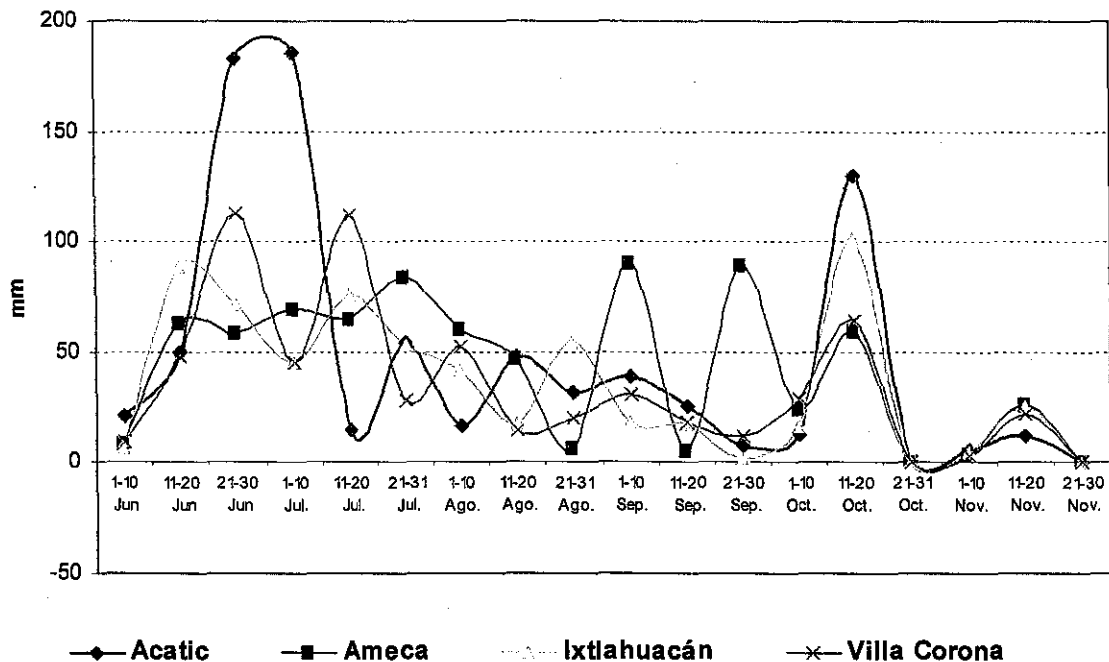


Figura 7. Precipitación pluvial acumulada durante el ciclo primavera-verano 1997

IX. DISCUSIÓN

La contaminación por deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxinas y zearalenona en el 100% de las muestras analizadas por cromatografía de inmunoafinidad es indicativo de la alta incidencia de micotoxinas en el maíz, lo cual ha sido reportado a nivel mundial por Boutrif y Canet, (1998).

Los niveles de aflatoxinas en el maíz fueron relativamente bajos, solo detectadas por inmunoensayo enzimático, con concentraciones por debajo de los límites tolerables para humanos y animales (Boutrif y Canet, 1998), la baja contaminación de aflatoxinas puede atribuirse a que el cereal se almacenó al término de la cosecha en frascos de polipropileno una vez que alcanzó un porcentaje de humedad menor a 11%, lo que pudo evitar la contaminación por especies de *Aspergillus* productoras de aflatoxinas, especies de mayor impacto en el almacén, puesto que se requieren condiciones de humedad superiores a 13% y temperaturas de 25 a 30°C para su desarrollo (Gourama y Bullerman, 1995), mientras que en campo existen pocos reportes de la contaminación por aflatoxinas.

Los niveles de fumonisinas detectados por ambas técnicas se consideran de impacto a la salud, si bien los encontrados por cromatografía de inmunoafinidad son superiores en todas las localidades y variedades estudiadas. Cuando los niveles fueron evaluados por cromatografía de inmunoafinidad, Villa Corona, destacó con la mayor contaminación en todas las variedades, lo que no coincide con lo observado mediante inmunoensayo enzimático.

Las condiciones ambientales que prevalecieron en las localidades estudiadas, son propicias para el desarrollo de las especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas (Chulze y col., 1996), lo que pudo influir en la contaminación por fumonisinas en todas las localidades y variedades. Si se consideran las concentraciones detectadas por cromatografía de inmunoafinidad, la mayoría de las muestras superan los niveles tolerables para humanos (2 ppm) y en algunas especies de animales (equinos 5 ppm y cerdos 10 ppm) (FDA, 2002). En países, como Sudáfrica, China e India, existe relación epidemiológica de niveles elevados de fumonisinas en maíz, con el incremento de cáncer esofágico en humanos. En Transkei, región

de Sudáfrica, existe alta incidencia de cáncer esofágico, se reportan niveles de 10.5 ppm de fumonisinas en maíz aparentemente sano y de 63.2 ppm en maíz mohoso (Hopmans y col., 1993). En otros países los niveles varían considerablemente, en Italia los niveles reportados por Doko y Visconti, (1993) fueron de 0.01 a 6.8 ppm; en China, Japón y Nepal se han encontrado valores de 0.6 a 4.1 ppm (Ueno y col., 1993); en Egipto de 1.8 a 3 ppm; en Brasil de 0.2 a 38.5 ppm (Bullerman y Tsai, 1994); en Argentina de 0.08 y 16.76 ppm (Chulze y col, 1997) y en Estados Unidos de 3.5 a 7.4 ppm (Castelo y col., 1998).

En México, son pocos los estudios relacionados con la contaminación de fumonisinas, entre estos los efectuados por Reyes y col. en 2000, quienes encuentran concentraciones de 6.5 en Ameca, y 10.2 en Jocotepec, municipios del estado de Jalisco.

Se han realizado numerosos estudios respecto a la contaminación por fumonisinas, ya que dichas micotoxinas han demostrado ser importantes promotoras de cáncer en humanos y animales, entre los que se encuentran los que involucran procesos de descontaminación de productos a base de maíz, particularmente en países donde el maíz es la base de la alimentación (Bullerman y Tsai, 1994). En México, ha sido evaluado el proceso de nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas y la producción de sus hidrolizados, productos que conservan la toxicidad y permanecen atados a la matriz del alimento (Hendrich y col., 1993). Reyes y col. (2002) demostraron que existe baja eficiencia del proceso de nixtamalización en la descontaminación de fumonisinas, detectándose en tortilla niveles de FB_1 de 4.36 ppm, FB_2 de 0.051 ppm e hidrolizado de FB_1 de 0.874 ppm. De acuerdo con los valores recomendados de fumonisinas para humanos, que son de 2 ppm en maíz y de 4 ppm para productos de masa (FDA 2002), los niveles encontrados en el presente estudio fueron considerados de riesgo a la salud. Por lo tanto, es necesario se efectúen estudios relacionados con la contaminación con fumonisinas en el maíz y sus productos, además de evaluar el grado de exposición en la población.

La concentración de ocratoxinas presente en las tres variedades de maíz y determinada por cromatografía de inmunoafinidad, sobrepasa los límites tolerables para la alimentación de humanos (5 ppb), gallinas ponedoras (10 ppb); cerdos y pollos (25 a 50 ppb) (Gimeno, 2001),

niveles que se presentaron en algunas localidades del estudio. En bovinos no existe información suficiente sobre la acción tóxica de la ocratoxina A, posiblemente por la acción de la microflora ruminal que la metaboliza e hidroliza en ocratoxina α que no es tóxica y no se degrada, efecto que puede ocurrir con otros rumiantes (Gimeno 2002).

Estos resultados deben ser considerados con reserva, puesto que los resultados contrastantes entre ambas técnicas son preocupantes, ya que cromatografía de inmunoafinidad mostró niveles elevados y de alto riesgo a la salud, en tanto, inmunoensayo enzimático presentó como nivel máximo a 3.2 ppb, valor que se encuentra por debajo de los niveles recomendados para humanos (Slayne, 2000).

La incidencia de ocratoxina se reporta en cereales, en carne y productos cárnicos, vino, legumbres, cerveza, frutas secas y café. En Europa existe gran interés sobre la reglamentación de los niveles de ocratoxina en dichos alimentos, lográndose a la fecha como recomendación el límite tolerable de 5 ppb para la Comunidad Económica Europea (Slayne, 2000).

Desde que se publicaron datos sobre la genotoxicidad de la ocratoxina A, investigadores equiparan el riesgo de esta micotoxina con la aflatoxina, lo que ha provocado incremento en los estudios relacionados con la contaminación de la ocratoxina A. Además de ser una toxina renal carcinogénica, teratogénica e inmunotóxica, se sabe que causa nefropatía en cerdos y probable asociación con la enfermedad renal humana denominada "nefropatía endémica de los Balcanes" y en los tumores del tracto urinario (Pittet, 1998).

Los niveles presentes de deoxinivalenol (DON) en el maíz de las tres variedades y en las cuatro localidades fueron elevados si se comparan con los niveles preventivos recomendados por FDA para humanos y animales (Scott, 1994), que son de 1 ppm en productos de cereales (especialmente trigo) para consumo humano; de 10 ppm en cereales y subproductos destinados al ganado vacuno y aves de corral; y de 5 ppm para cerdos, perros y gatos (Mirocha, 1999).

La concentración de DON detectada en el presente estudio fue mayor a la reportada en Chile, por Vega y col. (2000), quienes encuentran valores de 0.8 a 5.3 ppm. En Estados Unidos los

niveles registrados en 1981 variaron de 0.1 a 42 ppm en maíz, mientras que en trigo la concentración fue de 0.02 a 9 ppm. En China se reportó contaminación de 1 a 40 ppm; en el Reino Unido de 0.01 a 0.36 ppm; en Francia de 0.14 a 0.6 ppm y en Argentina de 0.20 a 0.40 ppm (FAO/OMS, 1999). Recientes investigaciones en Turquía mostraron niveles de 2.67 ppm en harina de maíz (Omurtag y Boyoglu, 2003).

Contaminaciones de 2.5 y 4.9 ppm de DON durante el desarrollo del pollo provocaron anomalías significativas sobre los parámetros productivos (Bergsjö y col., 1993), mientras que en vacas lecheras niveles entre 6 y 12 ppm administrados por períodos de 10 semanas provocaron disminución significativa en la producción lechera y de la grasa en leche (Charmley, y col., 1993), por lo que los niveles detectados en el presente estudio pueden ser considerados de riesgo a la salud de humanos y animales.

Los niveles de zearalenona fueron relativamente bajos, si se consideran los niveles recomendados para pollos y gallinas, los cuales requieren dosis elevadas para presentar trastornos a la salud. La DL_{50} en pollitos es de 15 ppm mediante administración oral (Mirocha y col. 1978), sin embargo, en otras especies como cerdos, niveles entre 100 y 200 ppb pueden ocasionar problemas de fertilidad. También se tienen reportes de problemas estrogénicos en cerdas gestantes que consumieron niveles de zearalenona de 500 ppb y en cerdas en lactación con niveles de 250 ppb, evidentemente, estos trastornos se relacionan con la duración de la ingesta del alimento contaminado y la sensibilidad de las cerdas según la raza, pudiendo haber casos donde alguna de estas concentraciones no afecte significativamente (Gimeno, 2000).

En bovinos productores de leche, se sugiere que la concentración de zearalenona máxima tolerable no debe exceder los 250 ppb en la ración final, ya que los problemas además de la disminución de la producción lechera pueden llegar a ocasionar abortos. En Latinoamérica se tienen pocos reportes de la contaminación por ZEA en granos, escasamente los estudios realizados en Chile indican una contaminación de 0.3 ppb a 31 ppb (Vega y col. 2000).

Debido a la alta actividad biológica de la zearalenona y a la frecuencia en los cereales, especialmente en trigo y maíz nueve países han establecido niveles máximos tolerables de

zearalenona en alimentos que varían de 0 a 1000 ppb. Entre estos, Brasil, Francia y Uruguay establecen 200 ppb en cereales como el maíz y trigo. Cuando se trata de alimentación para cerdos, no se debe suministrar niveles mayores de 1 ppm (FAO/OMS/PNUMA, 1999). En México no se han establecido niveles tolerables, por lo que deben impulsarse estudios en el futuro que permitan determinar dichos niveles.

En términos generales no se observaron diferencias importantes entre las variedades de maíz estudiadas, apreciándose en algunos casos mayores niveles de contaminación en la variedad UDG 600, sin ser significativa la diferencia. Estos resultados posiblemente se deben a que los genotipos de las variedades estudiadas fueron similares, cuyo germoplasma es de tipo semidentado, presentando solo variación respecto a un menor tiempo de cosecha la variedad UDG 602 (130 – 140 días) mientras que las variedades UDG 600 y 6001 tienen un periodo de cosecha de 150 días; sin embargo, en este estudio, las tres variedades fueron cosechadas en el mismo período, lo cual aparentemente no influyó sobre los niveles de contaminación de las micotoxinas.

Todas las localidades estudiadas (Acatic, Ameca, Ixtlahuacán de los Membrillos y Villacorona) en el estado de Jalisco presentaron contaminación por deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxinas, y zearalenona siendo mayor la concentración de fumonisinas en Villa Corona, mientras que las otras micotoxinas se presentaron en niveles similares en las diferentes localidades y en todos los casos por lo que respecta a las determinaciones realizadas por cromatografía de inmunoafinidad, los valores son de impacto a la salud principalmente para humanos.

Los niveles de micotoxinas en el maíz pueden fluctuar considerablemente de un año a otro, en función de numerosos factores como por ejemplo las condiciones ambientales desfavorables que incrementan la invasión por hongos y la proliferación de estos ya sea en campo o durante el almacenamiento (FAO/OMS/PNUMA, 1999). Las condiciones climáticas de temperatura y humedad relativa registradas durante el ciclo de cultivo primavera-verano 1997, fueron similares en las cuatro localidades bajo estudio, condiciones consideradas apropiadas para el desarrollo de la planta y el rendimiento de maíz, condiciones que también son favorables para

el desarrollo de hongos productores de micotoxinas, ya que las especies *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*, principales productores de fumonisinas requieren como temperatura óptima de crecimiento 27°C; *F. graminearum* (*roseum*), principal productor de DON y zearalenona, requiere de 24 a 27°C para su desarrollo, no obstante, la producción de zearalenona se efectúa principalmente a temperaturas entre 10 y 12°C, sin embargo, parece ser que se han encontrado variedades de *Fusarium roseum*, como *F. roseum* “*gibbosum*” y “*semitectum*” que han sido capaces de producir en granos de sorgo a 25°C, cantidades de zearalenona equivalentes a las producidas a la temperatura de 10°C (Gimeno, 2000).

En el presente estudio se encontraron en todas las muestras DON, fumonisinas, ocratoxina y zearalenona, las cuales se presentaron en menor o mayor proporción según la localidad, situación frecuente en campo. Los informes de otras investigaciones indican sobre la contaminación conjunta de micotoxinas como fumonisina B₁/aflatoxina B₁; ocratoxina A/aflatoxina B₁; ocratoxina A/citrinina; ocratoxina/DON; aflatoxina B₁/DON, en granos y alimentos balanceados (FAO/OMS/PNUMA, 1999).

En países como Indonesia, se reporta la co-ocurrencia de aflatoxinas, DON, zearalenona y fumonisinas, los niveles detectados mediante cromatografía de líquidos de alta precisión fueron de 119 ng/g de aflatoxinas; 895 ng/g de fumonisinas; 26 ng/g de DON y 12 ng/g de zearalenona (Ali-N., 1998). En Holanda se detectaron DON y zearalenona niveles de 3,198 y 677 ng/g respectivamente (Tanaka, 1990). En Corea se encontró DON (4 ppm) y zearalenona (0.6 ppm) en maíz sano y mohoso (Sohn y col., 1999).

La presencia de múltiples toxinas en el mismo alimento proporciona nuevos motivos de preocupación, dado que la información toxicológica sobre los efectos de la exposición simultánea es todavía muy limitada. Sin embargo, en una alimentación diversificada se registrará una exposición a múltiples toxinas en concentraciones bajas con carácter intermitente y durante largos períodos de tiempo. No se conocen aún los efectos finales de esta exposición constante, aunque es difícil prever los efectos de micotoxinas múltiples, ciertos estudios in vitro pueden ayudarnos a predecir los resultados. Por otra parte, existe la combinación de múltiples factores entre los que se incluyen la interacción química o la

potenciación/inhibición de diferentes vías metabólicas. Se han observado respuestas diferentes según las proporciones de la combinación, por consiguiente, según el grado de contaminación pueden representar diferentes peligros para la salud (FAO/OMS/PNUMA, 1999).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, es necesario se realicen nuevas investigaciones que permitan validar las técnicas analíticas utilizadas, ya que se apreciaron importantes diferencias en los niveles detectados particularmente para ocratoxinas y fumonisinas, lo que pudiera deberse a que las técnicas utilizadas pueden sobreestimar o subestimar la concentración presente en el alimento, si bien su aplicación en campo se considera una herramienta práctica, rápida y económica para la determinación de micotoxinas, estas carecen de la precisión, exactitud y sensibilidad de la cromatografía de líquidos de alta precisión.

X. CONCLUSIONES

1. Se encontró contaminación por deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxinas, y zearalenona en la totalidad de las muestras mediante cromatografía de inmunoafinidad y en niveles superiores a los tolerables por humanos.
2. Las aflatoxinas solo fueron detectadas mediante inmunoensayo enzimático, con niveles por debajo de los límites tolerables recomendados por FDA.
3. Los niveles de micotoxinas detectados mediante Cromatografía de Inmunoafinidad se pueden considerar de riesgo a la salud: deoxinivalenol en bovinos, cerdos y aves; fumonisinas en equinos y cerdos; ocratoxinas en cerdos y aves; y zearalenona en bovinos y cerdos.
4. La contaminación por micotoxinas fue similar estadísticamente entre las variedades de maíz UDG 600, 601 y 602.
5. Villa Corona fue la localidad con mayor contaminación por fumonisinas y con menor de deoxinivalenol y ocratoxinas.
6. La temperatura ambiental durante el ciclo primavera-verano 1997 presentó un comportamiento similar en las cuatro localidades.
7. No se observó relación entre las condiciones ambientales y la ocurrencia de micotoxinas en las cuatro localidades evaluadas.
8. Se observaron diferencias marcadas entre las determinaciones entre cromatografía de inmunoafinidad e inmunoensayo enzimático.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ademoyero A.A., and Hamilton P.B. (1989). Influence of degree of acetylation of scirpenol mycotoxins on feed refusal by chickens. *Poult. Sci.*, 68:854-856.
- Agro (2000). Conversión de cultivos, investigación aplicada. Una revolución agrícola. Año 1, No. 1, Febrero-abril; México.
- Alexopoulos C. J., Mims C.W., and Blackwell M. (1996). *Introductory Mycology*. Fourth Edition. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Ali N., Sardjono, Yamashita A. and Yoshizawa. (1998). Natural co-occurrence of aflatoxins and *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia. *Food Addit Contam.* 15(4); 377-384.
- Allen N.K., Mirocha C.J., Weaver G., Aakhus-Allen S., and Bates F. (1981). Effects of dietary zearalenone on finishing broiler chickens and young turkey poults. *Poult. Sci.*, 60:124-131.
- ApSimon J.W. (1994). The biosynthetic diversity of secondary metabolites. En: *Mycotoxin in grain. Compounds other than aflatoxin*. Miller J.D., Trenholm H.L. (eds.) Eagan Press USA, pp.3-18.
- Basappa S. C. and Shantha T. (1996). Methods for detoxification of aflatoxins in foods and feeds a critical appraisal. *J. Food Sci. Technol.*, 33: 95-107.
- Beretta B., Gaiaschi A., Gailli C.L., and Restani P. (2000). Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit. Contam.*, 17:399-406.
- Bergsjø B., Herstad, O. and Nafstad, I. (1993) *Poultry Sci.* 60:166 (abstract) citado por Gimeno, A. 2003. Fusariomicotoxicosis comparativa entre pollos, gallinas, cerdos, vacas lecheras y conejos. www.Engormix.com
- Betina V. (1989). Mycotoxins as secondary metabolites. En: *Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects*. Betina V. (ed.) Amsterdam, New York.
- Blount W.P. (1961) Turkey X disease. *Turkeys. J.Brit. Turkey fed.*, 9(2):52,55-58, 61-71,77.
- Bommeli W. (1999). Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). Stations strasse 12, Liebefeld-Berna, Suiza.
- Bondy G.S. and Pestka J.J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, 3: 109-143.
- Boutrif E., and Canet C. (1998). Mycotoxins prevention and control FAO programmes. *Revue. Med Vet.*, 149: 681-684.

- Bullerman, L.L. B. and Tsai Wei-Yun J. (1994). Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisin in corn and corn-based foods and feeds. *J. Food Prot.* 57 (6): 541-546
- Campbell I.M. (1984). Secondary metabolism and microbial physiology. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 25:198-201.
- Castegnaro M. and McGregor D. (1998). Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue Med. Vet.*, 149:671-678.
- Castelo M.M., Sumner, S.S. and Bullerman, M.B. (1998). Occurrence of fumonisinas in corn-based food products. *J. Food Prot.*, 61(6):704-707
- Centro de Estadística Agropecuaria.(2000a) Anuario estadístico de producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. SAGAR
- Centro de Estadística Agropecuaria.(2000b) Anuario estadístico de producción y comercialización de maíz. SAGAR
- Centro de Estadística Agropecuaria.(2000c) Situación actual y perspectiva de la producción de maíz en México 1990-1999. SAGAR
- Centro de Estadística Agropecuaria.(2003) Situación actual y perspectiva de la producción de maíz en México. SAGAR
- Céspedes A.E. y Díaz G.J. (1997) Analysis of aflatoxins in poultry and pig feeds and feedstuffs used in Colombia. *J.AOAC Int.* 80: 1215-1219.
- Charmley L.B., Trenholm H.L., Prelusky D.B. and Nicholson, J.W. (1993). *J. Dairy Sci.* 76(11): 3580-3587. Citado por Gimeno, A. 2003. Fusariomicotoxicosis comparativa entre pollos, gallinas, cerdos, vacas lecheras y conejos. www.Engormix.com
- Charmley L.B., and Prelusky D.B. (1994). Decontamination of *Fusarium* mycotoxins. En: *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins.* Miller J.D., Trenholm H.L.(eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, pp.421-435.
- Charmley L.B., Trenholm H.L., Prelusky D.B. and Rosenberg A. (1995). Economic losses and decontamination. *Nat. Toxins.*, 3:199-203.
- Chulze S., Bertinetti C., Dalcero A., Etcheverry M., Farnochi C., Torres A. Rizzo I. and Varsavsky E. (1989). Incidence of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol on corn in Argentina. *Mycotoxin Res.* 5:9-12.
- Chulze S., Ramírez M.L., Farnochi M.C., Michelangelo P., Visconti A. and March G. (1996). *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentinian corn at different ear maturity. *J. Agric. Food Chem.* 44:2797-2801.

Colvin B.M., and Harrison L.R.(1992). Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathology*, 117: 79-82.

Colvin, B.M., Cooley A.J. and Beaver R.W. (1993). Fumonisin toxicosis in swine : Clinical and Pathologic findings. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5 :232-241. En: Norred, W.P. and Voss K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J. Food Prot*, 57(6) :522-527.

Coppock R.W., Mostrom M.S., Sparling C.G., Jacobsen B., and Ross J.C. (1990). Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Vet. Human Toxicol.*, 32:246-248.

CAST. Council for Agricultural Science and Technology. (1989). Mycotoxins economic and health risks. Report 116 November. United States of America. Pag. 7,21,24 y 25.

Da Rocha R.C.A. (2003). Toxigenous Ochratoxin mycobiota in grapes and derived products. Memorias. I Panamerican Symposium on Mycotoxins for Industry. México, D.F. Abril 2003. pp 54.

Desjardins A.E., Hohn T.M., and McCormick S.P. (1993) Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol. Rev.*, 57:595-604.

Doko, M.B and Visconti, A. (1993). Fumonisin contamination of corn and corn-based food in Italy. United Kingdom Workshop on occurrence and significance of mycotoxin. April 21-23 London, G.B.

Dutta T.K. and Das P. (2001). Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxin B₁ from feeds in India. *Mycopathologia*. 151:29-33.

Elmer W.H., and Fernandino F.J. (1992).Pathogenicity of *Fusarium* species (section Liseola) to asparagus. *Mycologia*, 84:253-257.

Escobar A. and Ragueiro O.S. (2002). Determination of aflatoxin B1 in food and feedstuffs in Cuba (1990 through 1996) using an immunoensymatic reagent kit (aplacen). *J. Food Prot*. 65:219-221.

Espada Y., Ruiz de Gopegui R., Cuadradas C., and Cabañes F.J. (1994). Fumonisin mycotoxicosis in broilers: weights and serum chemistry modifications. *Avian Dis.*, 38: 454-460.

FAO/OMS/PNUMA (1999) Micotoxinas de interes creciente. Tricotecenos. Tercera conferencia internacional mixta. Tunez, Túnez. 3-6 de marzo de 1999

FDA, (2002) fumonisin levels in human foods animal feeds. Guidance for industry U.S. Department of Health and Human Services. <http://vm.cfsan.fda.gov//edms/fumongui.html>

Franceschi S., Bidoli E., Baron A.E., and La Vecchia C. (1990). Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy. *JNCI*. 82: 1407-1411.

Frisvad J.C., and Samson R.A. (1991). Micotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. En: Cereal Grain, micotoxins, fungi and quality in drying and storage. Chelkowski J. (ed.) Developments in food Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 441-476

Galtier P. (1998). Biological fate of micotoxins in animals. *Revue Méd. vét.*, 549-554.

Galvano F., Pietri A., Bertuzzi T., Bognanno M., Chiess L., De Angelis A., and Galvano M. (1997). Activated carbons: in vitro affinity for fumonisin B1 and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food prot.*, 60: 985-991.

Galvano F., Pietri A., Bertuzzi T., Piva A., Cies L., and Galvano M. (1998). Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food prot.*, 61: 469-475.

Galvano F., Piva A., Ritieni A., and Galvano G. (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *J Food prot.*, 64: 120-131.

Garza C.I. (1994). Análisis de muestras en el laboratorio para detectar aflatoxinas. CIRNE-INIFAP-SARH. Memoria del 1^{er} Curso-taller sobre aflatoxinas en maíz. Río Bravo Tamaulipas, México.

Gelderblom W.C.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggaar R., and Kriek N.P.J. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 : 1806-1811.

Gelderblom W.C.A., Kriek N.P.J., Marasas W.F.O., and Thiel P.G. (1991). Toxicity fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*, 12: 1247-1251.

Gelderblom W.C.A., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Vleggaar R., and Cawood M.E., (1992). Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia*, 117: 11-16.

Gimeno A. (2000). *Aspergillus* Micotoxicosis comparativa entre pollos, gallinas, cerdos, vacas lecheras y conejos. <http://www.engormix.com>.

Gimeno A. (2001). Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. <http://www.engormix.com>.

Gimeno A. (2002). Fusariomicotoxicosis comparativa entre pollos, gallinas, cerdos, vacas lecheras y conejos. <http://www.engormix.com>.

González, A.V. (1995). El maíz y su conservación edit. Trillas, México. 214-252.

Gouroma H., and Bullerman L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *J. Food Prot.*, 58:1395-1404.

Gremmels J.F., Jhan A., and Blom M.J. (1995). Toxicity and metabolism of ochratoxin A. *Nat. Toxins*, 3:214-220.

Hao Y.Y., Brackett R.E., and Nakayama T. (1989): Removal of aflatoxin B₁ from peanut milk by *Flavobacterium aurantiacum*. En: Aflatoxin contamination of groundnuts: Proceeding of the international workshop, ICRISAT, Patancheru, India, pp 141-152.

Harrison L.R., Colvin B.M., Greence J.T., Newman L.E., and Cole J.R., (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium verticillioides*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2: 217-221.

Haschek, W.M., Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L. and Beasley, W.J. (1992). Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117:83-96.

Hopmans, E. C. y Murphy P.A. (1993). Detection of fumonisins B₁, B₂, B₃ and hidrolized fumonisin B₁ in corn containing foods. *J. Agric. Food Chem*, 41:1655-1658.

Hussein H.S., and Brasel L.M.(2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on human and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.

Huwig A., Freimund S., Kappeli O., and Dutler H. (2001). Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122: 179-188.

International Agency for Research on Cancer (IARC).(1986). Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposure. En: Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol 41, pp22. ,World Health Organization. Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer. (IARC), (1993a). Ochratoxin A: En: monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56, IARC pp. 489-521. Lyon, France.

International Agency for Research on Cancer. (IARC), (1993b). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 56:IARC, Lyon, France.

Jackson L.S., and Bullerman L.B. (1999). Effect of processing on *Fusarium* mycotoxins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 459: 243-261.

Jaramillo M. (1999). Interacciones micotoxinas-nutrientes. Hallazgos relevantes, Universidad de Georgia, estados Unidos- Universidad Central de Venezuela. Pag.1-4.

- Jardine D.J., and Leslie J.F. (1992). Aggressiveness of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) isolates to grain sorghum under green house conditions. *Plant Dis.*, 76: 897-900.
- Kale S., and Bennet J.W. (1992). Strain instability in filamentous fungi. En: Handbook of applied mycology. Vol. 5 : Mycotoxins in ecological systems. Bhatnagar D., Lillehoj E.B., and Arora D.K. (eds.) Marcell Dekker, Inc, Nlew York. USA. pp. 311-331.
- Krogh P. (1992). Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 213-224.
- Kubena L.F., Edrington T.S., Harvey R.B., Buckley S.A., Philips T.D., Rottinghaus G.E., and casper H.H. (1997). Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 77:1502-1509.
- Langseth W., Stenwig H., Sogn L., and Mo E. (1993). Growth of moulds and production of mycotoxins in wheat during drying and storage. *Acta Agric. Scand. Sect. B: Plant Sci.*, 43: 32-37.
- Ledeux D.R., Rottinghaus G.E., Bermudez A.J., and Alonso-Debolt M. (1999). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78: 204-210.
- Leslie J.F., Pearson C.A., Nelson P.E., and Tousson T.A. (1990). *Fusarium* species from corn, sorghum and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology.* 88: 343-350.
- Leeson S., Summers J.D., y Diaz G.J. (2000). Nutrición aviar comercial. Santa Fe, Bogota, Colombia. Pag. 93-95.
- Linsell C.A., and Peers F.G. (1977). Aflatoxins and liver cell cancer. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 471-473.
- Lopez-Garcia R., and Park D.L. (1998). Effectiveness of postharvest procedures in management of mycotoxin hazards. En: Mycotoxins in agriculture and food safety. Sinha K.K., Bhatnagar D. (eds.) Marcel Dekker, Inc. pp. 407-433
- Machen M.D., Clement B.A., Shepherd E.C., Sarr A.B., Pettit R.E., and Phillips T.D. (1988). Sorption of aflatoxins from peanut oil by aluminosilicates. *Toxicologist.*, 8:265.
- Magnoli C., Vilante M., Ponsone L., Astoreca A., Da Rocha Rosa C.A., Combina M. y Dulcero A. (2003) Estudio de la micoflora y *Aspergillus* sección Nigri en su capacidad para producir ocratoxina A (OA) en uvas para la elaboración de vinos en Argentina. Memorias. I Panamerican Symposium on Mycotoxins for Industry. México, D.F. Abril 2003. pp. 56.
- Marasas W.F.O., Jaskiewicz K., Venter F.S., and Van Schalkwyk D.J. (1988). *Fusarium verticillioides* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. Med. J/S.A. Med.*, 74: 110-114.

- Miller M.A., Honstead J.P., and Lovell R.A. (1996). Regulatory aspects of fumonisins with respect to animal feeds. Animal derived residues in foods. En: Fumonisins in foods. Jackson L.S., De Vries J.W., Bullerman L.B. (eds.), Plenum Press, New York and London, pp.363-368.
- Mirocha, C.J. (1999) Tricotecenos. FAO/OMS PNUMA sobre micotoxinas. Tercera Conferencia Internacional Mixta. Túnez, Túnez. 3-6 de marzo de 1999.
- Mirocha, C.J., Weaver, G., Whitmore, H.L., Allen, N., Pathre, S.V., Robinson, T.S., Bates, F., and Kutz, H. (1978) "Pharmacological and toxicological studies on zearalenone in food producing animals" in quaterly report IV. Contract No. 233-77-7211. FDA
- Montemayor M. (1994). Agroindustria: Micotoxinas, Agricultura. 4(26); 11-12.
- Moss M.O. (1996). Mycotoxins. Centenary review. *Mycol. Res.*, 100: 513-523.
- Neal G.E. (1998) Participation of animals biotransformation in micotox in toxicity. *Revue Méd. Vét.* 149: 555-560.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O. (1983). *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park. PA.: The Pennsylvania State University Press
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E. (1992). Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section Liseola and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(3) :984-989.
- Nelson P.E., Desjardins A.E., and Plattner R.D. (1993). Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopatol.*, 31:233-252.
- Norred W.P., and Voss K.A. (1994). Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. *J Food Prot.*, 57:52-57.
- Ominski K.H., Marquardt R.R. Sinha R.N. and Abramson D. (1994). Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. En: Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxin. Miller J.D., Trenholm H.L. (eds.) Eagen Press, St.Paul, Minnesota, USA. pp. 287-312.
- Oswald I.P., and Comèra C.(1998). Immunotoxicity of mycotoxins. *Revue. Med. Vet.*, 149: 585-590.
- Osweiler G.D. (2000). Mycotoxins contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 16:511-530.
- Osweiler G.D., Ross P.F., Wilson T.M., Nelson witte S.T., Carson T.L., Rice L.G., and Nelson H.A. (1992). Chracterization of an epizootic of pulmonary edema in swinw associated with fumonisin in corn screenings. *J. Vet. Diagn Invest.*, 4:53-59.

- Overnes G., Matre T., Siversten T., Larsen H.J., Langseth W., Reitan L.J., and Jansen J.H. (1997). Effects of diets with graded levels of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on immune response in growing pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 44:539-550.
- Paterson R.R.M., and Kozakiewicz Z. (1997). *Penicillium* and *Aspergillus* mycotoxins—diagnostic characters and quantitative data from commodities and cultures. *Fifth European Fusarium Seminar*, Szeged, Hungary, pp. 271-275
- Peers F.G., Gilman G.A., and Linsell C.A. (1976). Dietary aflatoxins and human liver cancer. A study in Swaziland. *Int. J. Cancer*, 17:167-176.
- Pfohl-Leszkowicz A. and Molinié A. (2003). Presence of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1 in French breakfast cereals. Comparison of analysis using or not Immunoaffinity clean-up before HPLC. *Memorias. I Panamerican Symposium on Mycotoxins for Industry*. México, D.F. Abril 2003. pp 26.
- Peraica M., Radic B., Lucic A., and Pavlovic M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.*, 77: 754-766.
- Pestka J.J., Abouzieed M.N., and Stikno (1995). Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technology*. pp. 120-128.
- Phillips S.I., Wareing P.W., Dutta A., Panigrahi S. and Medlock V. (1996). The mycoflora and incidence of aflatoxin, zearalenone and sterigmatocystin in dairy feed and forage samples from Eastern India and Bangladesh. *Mycopathologia*. 133:15-21.
- Pitt J.I., and Hocking A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. CSIRO Division of Food Science and Technology, Sydney Academic Press. Australia.
- Pitt J.I. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.*, 56:184-192.
- Pittet A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an updated review. *Revue. Med. Vet.*, (149) 6: 479-492.
- Piva G., Galvano F., Pietri A., and Piva A. (1995). Detoxification methods of aflatoxins: a review. *Nutr. Res.* 5: 689-715.
- Plattner R.D., Weisleder D., Shackelford D.D., Peterson R., and Powell R.G. (1992). A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia.*, 117: 23-28.
- Pont G., Jordana J., Campanera P., y Arroyo R. (1989). El problema de la contaminación fúngica en la industria de los piensos. *LUCTA*. (2ª Edición) Barcelona, España. Pag. 21-72.
- Postupolski J., Rybinska K., Szczesna M., Karlowski K., and Ledzion E. (1999). The review of the European Union documents relating to contamination of aflatoxins in food. *Rocz. Panstw. Zaki-Hig.*, 50: 57-67.

Prelusky D.B., Rotter B.A., and Rotter R.G. (1994). Toxicology of micotoxins. En: *Mycotoxins in Grains. Compound other than aflatoxin*. Miller J.D., and Trenholm H.L. (eds.) Eagan Press St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 359-404.

Price W.D., Novell R.A. and McChesney D.G. (1993). Naturally occurring toxins in feedstuffs: Center of Veterinary Medicine Perspective. *J. Anim. Sci.* 71:2556-2562.

Quatrocchi O.A., Andrizzi S.A., y laba R.F. (1992). Introducción a la HPLC aplicación y practica. Merck. Buenos Aires, Argentina pp. 15-33 y 302-323.

Rafai P., Bata A., Jakab L. and Vanyi A. (2000). Evaluation of mycotoxins-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. *Food Addit. Contam.* 17:799-808.

Ramos A.J., and Hernández E. (1997). Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilication addition to feedstuffs. A review. *Anim. Feed Sci Technol.*, 65: 197-206.

Reyes V.W.P., Nuño R.R., Ramirez A.A., Gonzalez A.A.V. 2000. Detección de *Fusarium moniliforme* y fumonisinas en tres híbridos de maíz en Ameca Jalisco. *Scientia CUCBA* 2(1): 27-33

Reyes V.W.P., Landeros R.P., Ramírez A.A. y Carvajal M.M. (2002). Efecto del proceso de nixtamalización sobre los niveles de fumonisinas y la producción de hidrolizados en masa y tortillas. *Scientia-CUCBA*. 4(2):173-182.

Rhone diagnostics technologies Ltd. (1998). Immunoaffinity columns for mycotoxins analysis. Version P14/V3/27.03.98, Maryhill Road, Glasgow, Scotland.

Riley R.T., Norred W.P., and Bacon C.W. (1993). Fungal toxins in foods recent concerns. *Anu. Rev. Nutr.*, 13: 167-189.

Ross P.F., Nelson P.E., Richard J.L., Osweiler G.D., Rice L.G., Plattner R.D., and Wilson T.M. (1990). Production of fumonisins by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolated associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbil.*, 56 : 3225-3226.

Ross P.F. (1994). What are we going to do with this dead horse?. *AOAC Int.* 77: 491-494.

Rotter B.A., Prelusky D.B., and pestka J.J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health.*, 48:1-34.

Scott P.M. (1991). Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Chelkowski J. (ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 529-572.

Scott P.M. (1994). *Penicillium* and *Aspergillus* toxins. En: *Micotoxin in grain. Compounds other than aflatoxin*. Miller J.D., and trenholm H.L. (eds.). Eagan Press USA, pp. 261-286.

- Scott P.M. (1998). Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue. Med. Vet.*, 149: 543-548.
- Scudamore K.A., Nawaz S., and Hetmanski M.T. (1998). Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit. Contam.*, 15: 30-55.
- Scudamore K.A. and Patel S. (2000). Survey for ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into United Kingdom. *Food Addit. Contam.*, 17:407-416.
- Seo J.A., and Lee Y.W. (1999). Natural occurrence of the series of fumonisins in moldy corn. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 1331-1334.
- Shier W.T. (1998). Estrogenic mycotoxins. *Revue Med. Vet.*, 149:599-604.
- Slayne M.A. (2000). Ochratoxin A in food in the UK. Memorias X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and phycoxins. Guarujá 21-25 de mayo, Sao Paulo, Brasil. pp. 55.
- Smith J.E., and Moss M.O. (1985). Mycotoxins: Formation, analysis and significance. New York: John Wiley and Sons. Pp. 1-143.
- Sohn, H. B., Seo J.A. and Lee Y.W. 1999. Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Addit. Contam.*, 16(4); 153 – 158.
- Steyn P.S. (1998). The biosynthesis of mycotoxins. *Revue. Med. Vet.*, 149: 469-478.
- Sun S. and Snyder W.C. (1981). The bakane disease of the rice plant. En: *Fusarium* diseases, Biology and Taxonomy. Nelson P.E., Tousson T.A., and Cook R.J. (eds.) Pennsylvania State University Press. University Park, PA. pp. 104-113.
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W. F.O. and Stockenstrom S. (1991). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 39 :2014-2018.
- Tanaka T. y col. 1990. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, in cereals harvested in the Netherlands *Mycopathologia*. 110(1); 19-22.
- Torres A., Chulze S., Dalcero A., Etcheverry M. and Farnochi C. (1990). Deoxynivalenol and nivalenol in wheat and by products in Argentina. *Mycotoxin Res.* 89-92.
- Trevor S., Evans E.H., Morris D.K., y Brockus C.L. (1995). Alimentación de reproductoras y pollos de engorde, para obtener un rendimiento óptimo. *Feedstuffs* Julio,3:16-17.
- Turner W.B., and Aldridge D.C. (1983). Fungal metabolites II. Academic Press, London U.K.

Ueno Y, Sugiera, A.S., Wang, D-S, Lee, V.S. Hiroka, E.Y. Hara, S., Karki, T., Chen, G. and Yu, S-Z (1993). A limited suvey of fumonisin in corn and corn-based products in Asia countries. *Mycotoxins Research*. 9:27-34

Van Egmond H. P. (1995). Mycotoxins: regulation, quality assurance and reference materials. *Food Addit. Contam.*, 12: 321-330.

Van Rensburg S.J., Cook-Mozuffari P., Van Der Watt J.J., Vicent T.J., and Purchase I.F. (1985). Hepatocelular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br. J. Cancer.*, 51: 713-726.

Varga J., Kevei E., Rinyu E., Teren J., and Kozakiewicz Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4461-4464.

Vega H., Saelzer, R., Ríos, G., Herlitz, E., Bastías C. y Vega M. 2000. Contaminación por micotoxinas de alimentos y piensos en Chile; resultados del trienio 1997-2000. Memorias III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología, celebrado 6-10 noviembre 2000 Córdoba, Argentina.

Vining L.C. (1992). Role of secondary metabolites from microbes. En: Secondary metabolites: their function and evolution. Chadwick D.J. and Whelan J. (eds.). John Wiley: Chichester. pp. 184-194.

Visconti. A. (2000). Fumonisins levels in corn and corn products global perspectives. Abstracts. *Food Addit. Contam.* 18(3):194-195.

Wakulinski W., Solfrizzo M., and Perkouski J. (1991). Susceptibility of selected winter wheat cultivars produced in Poland to *Fusarium moniliforme* head blight. *Mycotoxin Res.* 7: 473-478.

Ware G.M., Umrigar P.P. and Carman S.S. Jr. (1994) Evaluation of fumonitest immunoaffinity columns. *Analytical Letters.* 27(4):694-715.

Weaver G.A., Kurtz H.J., Behrens J.C., Robison T.S., Seguin B.E., Bates F.Y., and Mirocha C.J. (1989). Effect of zearalenone on dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 47:1826-1828.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Características de tres variedades de híbridos de alto rendimiento de maíz
(*Zea mays*)

CARACTERÍSTICAS ^a	VARIEDADES ^b		
	A	B	C
Días a floración	65-70	70	60-65
Días a cosecha	150	150	130-140
Ciclo vegetativo	Intermedio-tardío	Intermedio-tardío	Intermedio-tardío
Altura de la planta	2.20-2.50 m	2.20-2.40 m	2.20-2.30 m
Inserción de mazorca	1.20 m	1.20 m	1.10 m
Densidad de siembra	20 kg/ha	20 kg/ha	20 kg/ha
Color de grano	Blanco	Blanco	Blanco
Area de adaptación ^c	0 - 1,800	1 - 1,800	1 - 1,800

^a por el Centro de investigaciones en producción de semillas (CIPROS) Universidad de Guadalajara

^b A, B y C corresponde a UDG-600, UDG-601, UDG-602 respectivamente

^c metros sobre el nivel de mar