



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS TABASCO**

**PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**“DETECCIÓN DE HONGOS E IDENTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS EN  
GRANOS DE MAÍZ ALMACENADOS”**

**LUIS JAVIER ARELLANO GALICIA**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO**

**2019**



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas  
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Luis Javier Arellano Galicia**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Juan Manuel Zaldívar Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**DETECCIÓN DE HONGOS E IDENTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ ALMACENADOS**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 3 de junio de 2019.

  
Luis Javier Arellano Galicia


Firma

  
Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz

Vo. Bo. Profesor Consejero

La presente tesis, titulada: “**Detección de hongos e identificación de micotoxinas en granos de maíz almacenados**”, realizada por el alumno: “**Luis Javier Arellano Galicia**”, bajo la dirección del **Consejo Particular** indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO  
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:   
DR. JUAN MANUEL ZALDÍVAR CRUZ

ASESORA:   
DRA. EDITH HERNÁNDEZ NATAREN

ASESORA:   
DRA. NYDIA DEL RIVERO BAUTISTA

ASESOR:   
DR. JOSÉ JUAN ZÚÑIGA AGUILAR

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 28 DE JUNIO DEL 2019

# DETECCIÓN DE HONGOS E IDENTIFICACIÓN DE MICOTOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ ALMACENADOS

Luis Javier Arellano Galicia, MC.  
Colegio de postgraduados, 2019.

## RESUMEN

Los hongos del género *Aspergillus* producen metabolitos secundarios tóxicos llamados aflatoxinas (AF) que invaden y afectan los granos como el maíz. Estas sustancias producen efectos negativos en humanos y animales, afectando el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Se procedió a realizar un muestreo en ocho establecimientos que comercializan granos de maíz, localizados en Cárdenas, Tabasco. Mediante la técnica de microcultivo se aislaron y caracterizaron morfológicamente cepas de hongos del género *Aspergillus spp.* y *Cunninghamella spp.*, además, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un detector de UV-VIS, se determinó la presencia de cuatro tipos de AF (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>), los cuales presentaron concentraciones que oscilaban entre 55.22 y 1256.35 µg kg<sup>-1</sup>. Las muestras analizadas superaron el nivel máximo permisible de 20 µg kg<sup>-1</sup> para aflatoxinas, establecido por las Normas Oficiales Mexicanas.

Palabras claves: *Aspergillus*, Aflatoxinas, HPLC, Límite máximo permisible.

# DETECTION OF FUNGI AND IDENTIFICATION OF MYCOTOXINS IN STORED MAIZE GRAINS

Luis Javier Arellano Galicia, MC.  
Colegio de postgraduados, 2019.

## ABSTRACT

Fungi of the genus *Aspergillus* invade and affect grains such as corn, and produce toxic secondary metabolites called aflatoxins (AF), which produce negative effects in humans and animals, affecting the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. Based on this, we proceeded to carry out a sampling in eight establishments that sell corn grain, which are located in Cárdenas, Tabasco. Using the microculture technique, fungal strains of the genus *Aspergillus spp.*, and *Cunninghamella spp.*, were morphologically isolated and characterized; Furthermore, by means of high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a detector UV-VIS, the presence of four types of AF (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) was determined, with presented concentrations ranging between 55.22 and 1256.35 µg kg<sup>-1</sup>. The samples analyzed exceed the maximum permissible level of AF, which should not exceed 20 µg kg<sup>-1</sup>, established by the Official Mexican Standards.

Key words: *Aspergillus*, Aflatoxins, HPLC, maximum permissible levels.

## AGRADECIMIENTOS

Mis Agradecimientos:

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca durante los dos años de la maestría.

Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar una maestría dentro de sus instalaciones.

A mi consejo, Dr. Juan Manuel Zaldivar Cruz, Dra. Edith Hernández Nataren, Dra. Nydia Del Rivero Bautista, Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, por el tiempo que le dedicaron a este trabajo y por guiarme a través de esta etapa.

Al Dr. Carlos Freddy Ortíz García por las facilidades brindadas en el laboratorio de fitopatología, para llevar a cabo esta investigación.

Al Dr. Enrique Sauri Duch y al Dr. Victor Manuel Moo Huchin, por permitirme realizar una estancia de investigación en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Mérida.

A Dios, por permitirme seguir mi camino a pesar de la adversidad, por otorgarme salud todos los días y por poder concluir esta meta.

A mis amados Padres y hermano, los cuales me han regalado una vida tan agradable.

A mi familia, profesores, amigos y compañeros que contribuyeron en este trabajo. A Joel, Abraham, Rosario, Raisa, Lupita y Crhistian, por la amistad brindada y por hacer de una estancia académica, una experiencia increíble.

## DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a las personas que más amo, Yolanda Clara Galicia Marín, Francisco Javier Arellano Ortiz, y Edgar Alejandro Arellano Galicia.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 General .....	3
2.2 Específicos.....	3
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Importancia de los cereales .....</b>	<b>4</b>
3.1.1 Importancia del maíz a nivel nacional .....	4
<b>3.2 Almacenamiento de granos de maíz .....</b>	<b>5</b>
3.2.1 Microorganismos presentes en granos de maíz almacenados .....	6
<b>3.3 Hongos micotoxigénicos y sus metabolitos secundarios .....</b>	<b>6</b>
3.3.1 Condiciones favorables para el desarrollo de hongos y micotoxinas .....	7
3.3.1.1 Micotoxinas.....	7
<b>3.4 Efectos Adversos de las Micotoxinas .....</b>	<b>8</b>



3.4.1 Pérdidas de productos .....	8
3.4.2 Efectos en la salud.....	9
3.4.3 Efectos de las principales micotoxinas de <i>Fusarium</i> en humanos y animales ..	10
3.4.4 Efecto de las principales micotoxinas de <i>Aspergillus</i> en humanos y animales .	10
3.4.4.1 Aflatoxinas .....	11
3.4.4.2 Efectos por aflatoxinas.....	12
<b>3.5 Medidas para el control de las micotoxinas .....</b>	<b>13</b>
3.5.1 Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos.....	13
3.5.2 Normatividad para micotoxinas (niveles máximos permisibles) .....	14
3.5.2.1 Regulación de micotoxinas por la UNION EUROPEA (UE).....	15
3.5.2.2 Regulación de micotoxinas por la ADMINISTRACIÓN DE ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS [Food and Drugs Administration (FDA)].....	18
3.5.2.3 Regulación de micotoxinas por el Código de alimentos (Codex Alimentarius) .....	19
3.5.2.4 Regulación de micotoxinas por las Normas Oficiales Mexicanas .....	21
<b>3.6 Investigaciones de micotoxinas realizadas a nivel mundial de micotoxinas ..</b>	<b>24</b>
<b>3.7 Investigaciones de micotoxinas realizadas en México.....</b>	<b>25</b>
<b>3.8 Características morfológicas de hongos del género <i>Aspergillus</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Ubicación del sitio de estudio.....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Toma de muestras .....	27
<b>4.2 Aislamiento e identificación de los hongos.....</b>	<b>27</b>
4.2.1 Desinfección de los granos de maíz previo a la siembra .....	27
4.2.2 Siembra de los granos en el medio de cultivo.....	28
4.2.3 Purificación de hongos e identificación morfológica.....	29
<b>4.3 Determinación del contenido de aflatoxinas en granos de maíz .....</b>	<b>32</b>

4.3.1 Procedimiento para la cuantificación de la curva de calibración .....	32
4.3.2 Control analítico .....	32
4.3.3 Procedimiento para la extracción de aflatoxinas.....	33
4.3.4 Condiciones cromatográficas.....	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Aislamiento de hongos presentes en granos de maíz.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Descripción de las características morfológicas a nivel de género de los hongos aislados en granos de maíz.....</b>	<b>35</b>
5.2.1 Caracterización de la colonia tipo 1 .....	36
5.2.2 Caracterización de la colonia tipo 2 .....	37
5.2.3 Caracterización de la colonia tipo 3 .....	38
5.2.4 Caracterización de la colonia tipo 4 .....	39
5.2.5 Caracterización de la colonia tipo 5 .....	40
5.2.6 Caracterización de la colonia tipo 6 .....	41
<b>5.3 Cuantificación de aflatoxinas mediante HPLC-UV-VIS. ....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades químicas de las 5 aflatoxinas más representativas (tomado de Carvajal, 2013).....	12
<b>Tabla 2.</b> Contenido máximo permisible para micotoxinas del hongo <i>Fusarium</i> en granos y cereales (adaptado de CE, 2007).....	16
<b>Tabla 3.</b> Contenidos máximos permitidos para aflatoxina B <sub>1</sub> , M <sub>1</sub> y la suma de aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> en µg kg <sup>-1</sup> (adaptado de CE, 2010).....	17
<b>Tabla 4.</b> Límite máximo establecido para Ocratoxina A en cereales (adaptado de CE, 2012).....	18
<b>Tabla 5.</b> Límites máximos permisibles para micotoxinas propuestos por la FDA. ....	19
<b>Tabla 6.</b> Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por el Codex Alimentarius (adaptado de FAO/OMS, 2018b).....	20
<b>Tabla 7.</b> Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por el Codex Alimentarius (adaptado de FAO/OMS, 2018b).....	21
<b>Tabla 8.</b> Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos establecidos por la NOM-247-SSA1-2008. ....	22
<b>Tabla 9.</b> Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por la NOM-187-SSA1/SCFI-2002. ....	23
<b>Tabla 10.</b> Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por la NOM-188-SSA1-2002. ....	23
<b>Tabla 11.</b> Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por la NOM-184-SSA1-2002. ....	24
<b>Tabla 12.</b> Conteo de colonias de hongos presentes en granos de maíz. ....	35
<b>Tabla 13.</b> Frecuencia de colonias de hongos presentes en granos de maíz almacenados (número y porcentaje). ....	42
<b>Tabla 14.</b> Concentración de 4 tipos de aflatoxinas (µg kg <sup>-1</sup> ) en muestras de maíz de cárdenas, Tabasco.....	47

## LISTA FIGURAS

- Figura 1.-** Estructuras químicas de las principales aflatoxinas por su alto potencial, carcinógeno, mutágeno y teratogénico (Tomado de Martínez *et al.*, 2013b). ..... 11
- Figura 2.-** A) Inoculación de granos de maíz en caja Petri con agar Sabouraud. B) Observación del desarrollo de colonias fúngicas a las 120 horas de cultivo..... 29
- Figura 3.-** Descripción gráfica de la técnica de microcultivo. A) Colocación del portaobjetos sobre la varilla de vidrio, B) Fragmentación del medio de cultivo en cuadros de 1.5 x 1.5 cm. C) Colocación de un fragmento sobre el portaobjetos. D) Siembra de los hongos aislados y colocación del cubreobjetos con adición de agua glicerizada. E) Remoción del cubreobjetos del hongo aislado. F) Tinción del tejido micelial con azul de lactofenol (Bonifaz, 2012). ..... 31
- Figura 4.-** Cromatograma de una solución de 400 µL de la mezcla estándar de aflatoxinas..... 33
- Figura 5.-** Caracterización Macro y microscópica de la colonia aislada del género *Cunninghamella* sp. (A) Morfología macroscópica (B) Micelio cenocítico teñido con azul de lactofenol, observado a 40X. .... 36
- Figura 6.-** Caracterización macro y microscópica de la colonia aislada del género *Aspergillus* sp. (A) Morfología inicial de la colonia. (B) Micelio pigmentado posterior a las 48 horas. (C) Conidióforos teñidos con lactofenol azul y (D) Conidióforos teñidos con lactofenol blanco observados a 40x. .... 37
- Figura 7.-** (A) Colonia de *Aspergillus* spp., en agar Sabouraud, 72 horas, 37°C. (B) y (C) Cabeza aspergilar teñida con lactofenol azul. (D) Conidióforos teñidos con lactofenol blanco observados a 40x. .... 38
- Figura 8.-** Colonia de *Aspergillus* spp. (A)Características macroscópicas. (B) y (C) Conidióforos teñidos con azul de lactofenol. (D) Conidióforo tenido con lactofenol blanco observado a 40x. .... 39
- Figura 9.-** (A) Colonia de *Aspergillus* spp. (B) y (C) Tejido micelial teñidos con azul de lactofenol. (D) Tejido micelial teñido con lactofenol blanco observados a 40x..... 40

<b>Figura 10.-</b> Colonia de <i>Aspergillus</i> spp. (A) Características macroscópicas. (B), (C) y (D) Tejido micelial teñido con lactofenol azul, observados a 40x. ....	41
<b>Figura 11.-</b> La linealidad de las curvas de calibración (con un volumen de inyección de 20 $\mu$ L de la mezcla estándar de aflatoxinas. ....	46
<b>Figura 12.-</b> Concentración de aflatoxinas totales (suma de AFG <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> y AFB <sub>1</sub> ), en muestras de maíz destinado al consumo humano. ....	49

## 1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son definidas como biomoléculas o metabolitos secundarios altamente tóxicos para animales y seres humanos, son producidos por hongos, pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Méndez-Albores y Moreno, 2009; Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

Existe una gran variedad de micotoxinas, entre ellas se encuentran las aflatoxinas (AF), las fumonisinas (FM), los tricotecenos (TRC), las ocratoxinas (OT), la patulina (PAT), la zearalenona (ZEN), entre otras, las cuales presentan efectos adversos sobre seres humanos y animales (ganado, cerdos, aves), afectando también los productos derivados de estos, tales como: huevos, lácteos y embutidos (Ismail y Papenbrock, 2015; OMS, 2018a). Las AF son las micotoxinas más representativas debido a sus efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos (Martínez *et al.*, 2013b). Debido a esto, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica a las AFs dentro del grupo 1 en su sistema de clasificación como agente altamente carcinogénico en humanos (Arrúa *et al.*, 2013).

Las micotoxinas pueden encontrarse en una gran cantidad de productos, debido a que los hongos son capaces de proliferar y producir estos metabolitos secundarios en diferentes sustratos. Algunos productos susceptibles son las semillas oleaginosas [cacahuates (*Arachis hypogaea*) y almendras (*Prunus dulcis*)], especias [chiles (*Capsicum annuum*)], frutas, cereales [trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays* L.)] y productos derivados del maíz como las harinas y tortillas (Requena *et al.*, 2005; Carvajal, 2013; Martínez *et al.*, 2014; Zuki-Orozco *et al.*, 2018).

Los alimentos con presencia de hongos se convierten en un peligro potencial para los animales y seres humanos que los consumen; por lo tanto, existe una necesidad continua de proteger la salud. Debido a que las micotoxinas no se pueden eliminar completamente, diversos países han establecido límites máximos permisibles, para limitar la exposición a estos contaminantes biológicos (FAO, 2018). Algunas micotoxinas como las aflatoxinas tienen mayor repercusión sobre la salud humana; por consecuencia,

el Reglamento de la Comisión Europea (CE) n° 1881/2006 fija el contenido máximo de 4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxinas totales (suma de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) en todos los cereales y subproductos, incluidos los productos de cereales transformados (UE, 2019). Por otra parte, el Código Alimentario de la FAO y la FDA de los Estados Unidos establecen 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (FAO/OMS, 2018b; FDA, 2019); mientras que las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) establecen un límite máximo de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (NOM-188-SSA1-2002; NOM-247-SSA1-2008).

La presencia de hongos en los granos de maíz puede presentarse en cualquier punto de la cadena de producción (cosecha, recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación); las condiciones adecuadas para la proliferación de hongos micotoxigenicos se atribuye a factores como una humedad mayor de 14 % en grano, una temperatura mayor de 20 °C, una humedad relativa en almacén de 70-90 %, aunado al manejo inadecuado poscosecha, el tipo de transporte y el almacenamiento prolongado (Carvajal, 2013; Arenas, 2014 y Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 General**

Determinar la presencia de hongos productores de toxinas en granos de maíz destinados al consumo humano.

### **2.2 Específicos**

Aislar los hongos presentes en granos de maíz.

Caracterizar la morfología macro y microscópica de los hongos aislados.

Determinar y cuantificar las aflatoxinas presentes en las muestras de granos de maíz mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).



### **3. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1 Importancia de los cereales**

Los granos y cereales son el alimento básico a nivel mundial, tienen una gran importancia debido a su contenido de almidón, lípidos, celulosa, gluten y distintas proteínas. Dentro de los cereales más representativos se encuentran el maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*), soya (*Glycine max*), sorgo (*Sorghum*), avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*) y centeno (*Secale cereale*). Estos granos son empleados para la producción de piensos, almidón, harina, leche, aceite, bebidas alcohólicas y biocombustibles (SAGARPA, 2017). En México la producción total de cereales en 2018 se estimó en un nivel de 36.7 millones de toneladas (SMIA, 2018).

Dentro de los cereales el maíz es el producto agrícola más cultivado en el mundo, debido a sus cualidades alimenticias para la producción de proteína animal y el suministro de elementos nutritivos para los seres humanos; además, es materia prima básica en la industria (FIRA, 2016).

##### **3.1.1 Importancia del maíz a nivel nacional**

México es un país productor de granos, ocupa el 8° lugar en producción mundial de maíz, el cual es un grano con gran relevancia, debido a su valor económico, social y cultural; además, es base de la alimentación nacional. Una parte de esta producción proviene de pequeños productores que lo emplean para el autoconsumo. En 2017, México exportó a 17 países, en términos de valor principalmente a Venezuela (58 %), Kenia (33 %) y Estados Unidos (4 %), entre otros (6 %), ubicándolo como el 10° exportador mundial de maíz grano (CIMMYT, 2017; ASERCA, 2018).

El maíz es una planta nativa de México, que actualmente se emplea para la alimentación humana y ganadera. Además, del aprovechamiento industrial. En 2012 en México el consumo per cápita promedio de maíz era aproximadamente de 160 g día<sup>-1</sup> (ASERCA,

2012); en 2014 el maíz tuvo una producción anual de 21.1 millones de toneladas, estimándose que cada habitante de México contaba con 188 kg año<sup>-1</sup> para su consumo, lo que equivalía a poco más de 0.5 kg día<sup>-1</sup>, considerando las diversas presentaciones de consumo como: harinas, tortillas y botanas, entre otras (INEGI, 2014). Para el año 2017, la producción total de maíz en 2017 fue de 27.8 millones de toneladas y el consumo per cápita aumentó a 196.4 kg de maíz, en forma de tortillas, principalmente (ASERCA, 2018).

Gran parte del territorio nacional es propicio para la producción de maíz. Los principales estados productores son Sinaloa (22 %), Jalisco (14 %), México (8 %), Michoacán (7 %), Guanajuato (6 %), Guerrero (5 %), Veracruz (5 %), Chiapas (5 %), Chihuahua (4 %), Puebla (4 %), otros estados representan el (20 %) restante. México cuenta con una superficie sembrada de 7.5 millones de hectáreas (ASERCA, 2018; SIAP, 2018).

### **3.2 Almacenamiento de granos de maíz**

La producción de maíz es estacional, por lo tanto, es necesario almacenar los granos, lo cual, puede derivar en el deterioro del producto. Los granos en mal estado (daños físicos) que son almacenados se deterioran aún más dependiendo del tiempo y las condiciones de almacenamiento (Paliwal, 2001), aunado a la interacción de diversos factores que repercuten en la calidad del grano como humedad final del grano, temperatura de almacenamiento y presencia de plagas de insectos, bacterias u hongos (Hernández *et al.*, 2009). Durante el almacenamiento los primeros indicios de deterioro de los productos son los focos de calentamiento, los cuales ocurren debido al fenómeno de la respiración, el grano absorbe oxígeno del aire y consume carbohidratos de su estructura, liberando calor (Hernández *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2017).

Las pérdidas económicas se reducen cuando las condiciones de almacén son adecuadas para mantener el grano libre de daños; para esto, se debe evitar el almacenamiento de granos húmedos o recién recogidos en contenedores, granos con daños físicos y con material extraño como paja u otro material vegetal; además, evitar

que los granos se coloquen sobre el suelo y protegerlos de la lluvia y en un ambiente limpio (FAO/OMS, 2017).

Autores como Méndez *et al.* (2005); Rosas *et al.* (2007); Mngadi *et al.* (2008) mencionan que para preservar la calidad de los granos es necesario controlar su humedad, la temperatura del ambiente y la humedad relativa, ya que son determinantes para su conservación, un nivel máximo de 15 % de humedad se considera adecuado para evitar la proliferación de hongos.

### **3.2.1 Microorganismos presentes en granos de maíz almacenados**

El maíz es una gramínea susceptible a plagas y enfermedades a lo largo de su ciclo de vida (Paliwal, 2001). Los granos pueden contener organismos o sustancias que representen un riesgo para la salud, los cuales, son introducidos principalmente durante la manipulación inadecuada en cualquier punto de la cadena de producción, desde el campo hasta el almacenamiento. Dentro de estos agentes se encuentran organismos como los insectos, bacterias y hongos patógenos y productores de micotoxinas (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

### **3.3 Hongos micotoxigénicos y sus metabolitos secundarios**

Los hongos son microorganismos heterótrofos con una estructura filamentosa, de 5-10 µm de diámetro (Vega, 2007); son ubicuos y se adaptan a diversas condiciones ambientales (Arenas, 2014), por lo cual, constituyen un grupo de organismos diversos. Se estima que podrían existir hasta 1.5 millones de especies (Madigan *et al.*, 2009), de los cuales, en los Catálogos de Autoridades Taxonómicas se han registrado en el mundo, alrededor de 70 000 especies y en México se tiene un registro de 7 000 especies (CONABIO, 2008).

Los hongos han sido empleados con diversos propósitos, para ceremonias religiosas, procesos de fermentación, aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación, agentes biológicos de control de plagas y parásitos; además, del enriquecimiento de

productos alimentarios; aunque la aportación más importante es dentro de la medicina, con el descubrimiento de la penicilina, producida por el hongo del género *Penicillium* (García-Hernández, 2011; Sagüés *et al.*, 2011; Aguilar, 2015; Guzmán, 2016).

### **3.3.1 Condiciones favorables para el desarrollo de hongos y micotoxinas**

Aunque los hongos pueden adaptarse a diversos entornos, ciertos factores climáticos y ambientales favorecen su proliferación (Agwanande *et al.*, 2016). Cada especie tiene requerimientos óptimos para su desarrollo, dentro de estos se encuentran: temperatura que oscila entre 20 y 40 °C, humedad relativa (principalmente durante el almacenamiento) de 70-90 % y un contenido de humedad del grano por encima del 15%, estas condiciones favorecen el desarrollo de muchas especies de hongos que a su vez influyen en la síntesis de micotoxinas (Blancas, 2007; Carvajal, 2013; Arenas, 2014).

#### **3.3.1.1 Micotoxinas**

El término micotoxina deriva del griego “mikes o mukos” que significa hongo y del latín “toxicum” que significa veneno; se definen como biomoléculas o metabolitos secundarios altamente tóxicos, producidos por hongos, pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos se pueden desarrollar en una amplia gama de productos agrícolas y cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea, producen enfermedades o incluso causan la muerte a animales y personas (Méndez-Albores y Moreno, 2009; Arroyo-Manzanares *et al.*, 2014).

Se conocen aproximadamente 200 tipos de micotoxinas, las de mayor interés con respecto a su aparición y toxicidad alimentaria. Los hongos del género *Fusarium* se encuentran asociados a los cereales y producen un complejo de micotoxinas denominadas tricotecenos (TCR), dentro de ellas se encuentran toxinas como el nivalenol, desoxinivalenol, toxinas T-2 y HT-2, zearalenona (ZEN) y por último se encuentran las fumonisinas, dentro de este grupo destaca la fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (FB<sub>2</sub>) y B<sub>3</sub> (FB<sub>3</sub>). Debido a su toxicidad, se han establecido límites máximos

permisibles para estas toxinas (Gómez, 2007; Kralj y Prosen, 2009; FDA, 2010b; ACSA, 2018a; OMS, 2018a).

Respecto a la toxina producida por hongos del género *Penicillium*, se reporta ocratoxinas que se da en regiones templadas frías, siendo la ocratoxina A la más importante de ellas debido a su frecuencia y toxicidad, su hallazgo se realizó en la década de 1960, y se ha clasificado como posible carcinógeno humano (grupo 2B) (Mantle, 2002; Gómez, 2007; Luna *et al.*, 2010).

Kralj y Prosen (2009) refieren que existen muchas otras micotoxinas de importancia toxicológica, pero menos estudiadas, como los alcaloides ergotínicos, enniatinas (EN), toxinas alternarias, moniliformina (MON), citrinina (CTN), beauvericina (BEA), ácido ciclopiazónico, roquefortina C, ácido micofenólico, penitremas, verruculogen, griseofulvin, citreoviridin, etc. En su mayoría, las micotoxinas son químicamente estables y soportan el procesamiento de los alimentos (OMS, 2018a).

### **3.4 Efectos Adversos de las Micotoxinas**

#### **3.4.1 Pérdidas de productos**

Gómez (2007) señala que las repercusiones en el ámbito económico a nivel mundial por micotoxinas se traducen en pérdidas económicas que se estiman en casi el 25 % de las cosechas (1000 millones de productos alimentarios al año). Estas mermas son principalmente por deterioro de alimentos (se reduce la capacidad nutritiva), aumento de los costos de producción y susceptibilidad de enfermedades infecciosas, análisis, medidas de control y restricciones de exportación, entre otros (FAO, 2018).

Los hongos pueden colonizar diversos sustratos agrícolas, dentro de estos los principales son los granos de café (*Coffea arabica*), maíz (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*) (Martinez *et al.*, 2014; Zuki-Orozco *et al.*, 2018) y arroz (*Oryza sativa*) (Luna *et al.*, 2010), semillas oleaginosas [(cacahuete (*Arachis hypogaea*), guaje (*Leucaena leucocephala*), pistacho (*Pistacia vera*), nueces (*Junglans regia*), soya

(*Glycine max*), girasol (*Helianthus annuus*), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), almendra (*Prunus dulcis*) (Requena *et al.*, 2005; Lezcano *et al.*, 2015; Agwanande *et al.*, 2016), especias [chile (*Capsicum annum*), pimienta negra (*Piper nigrum*) y jengibre (*Zingiber officinale*)] (Carvajal, 2013); alimentos balanceados, granos de uso pecuario (Flores *et al.*, 2006) y vegetación en descomposición (OMS, 2018a). Algunos hongos como los del género *Fusarium* y *Alternaria*, presentan afinidad para invadir las plantas en crecimiento, pueden vivir en raíces, tallos, hojas y semillas; mientras que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* atacan con mayor regularidad los granos almacenados. Esta clasificación no es estricta, debido a que los hongos son ubicuos (Blancas, 2007). Los hongos, además, de invadir los cultivos y productos, son parásitos capaces de producir micotoxinas que tienen efectos adversos sobre humanos y animales (Armijo y Calder, 2009).

### **3.4.2 Efectos en la salud**

Las micotoxinas representan un riesgo para la salud humana y la productividad animal, debido a ciertas propiedades como la termorresistencia y su gran variedad de efectos tóxicos; afectando órganos y sistemas; se encuentran asociadas al cáncer hepático y también pueden inducir la formación de tumores en colon, riñón y pulmón; favorecen el desarrollo de enfermedades infecciosas. Los efectos de las micotoxinas varía según la raza, la especie, la edad, la dosis, el tiempo de exposición y el estado nutricional (Richard, 2007; Méndez-Albores y Moreno, 2009; Luján, 2014; FAO, 2018).

Por otra parte, autores como, Mantle (2002); Balázs y James (2007) y FDA (2010a), refieren al comportamiento animal cuando ha ingerido gran cantidad de micotoxinas, pueden presentar diversos trastornos entre ellos el rechazo del alimento, vómito, alteraciones del sistema nervioso y de sus ciclos reproductivos (irregulares o ausentes) y diarrea. Así mismo, leucoencefalomalacia en el caso de los caballos, edema pulmonar en cerdos, defectos craneofaciales en pollos, cáncer renal en roedores, inhibición de la síntesis de proteínas, efecto inhibitorio enzimático y alteración de la retícula endoplásmica. Otros autores como Santibáñez *et al.* (2011) mencionan que en bovinos

se reduce la digestibilidad de la celulosa, disminuye la respuesta del animal y la producción de leche.

### **3.4.3 Efectos de las principales micotoxinas de *Fusarium* en humanos y animales**

**Tricotecenos:** Este grupo de micotoxinas, en los humanos, pueden producir toxicidad aguda, causando diarrea, lesiones dérmicas, irritación de la mucosa intestinal, alteración de la respuesta inmunológica e inhibición de la síntesis de macromoléculas (Martinez *et al.*, 2014); las fumonisinas se han relacionado con el cáncer de esófago en el ser humano (OMS, 2018a).

En animales, la zearalenona tiene efectos estrogénicos y puede causar infertilidad, principalmente en cerdos (OMS, 2018a); las fumonisinas se han relacionado con la toxicidad hepática y renal en animales, leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino (Gómez, 2007).

**Ocratoxinas:** Presentan una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, asegurando así su permanencia en el cuerpo y han sido clasificadas como posibles sustancias carcinógenas en humanos (grupo 2B) (Luna *et al.*, 2010). Así mismo, han sido relacionadas con la nefropatía endémica de los Balcanes, la cual es una enfermedad renal crónica (Gómez, 2007); induce daño oxidativo en el ADN y produce inmunodepresión en modelos experimentales (Molina y Ruiz, 2009). Además, puede afectar el sistema nervioso e hígado (Moreno y Alarcón, 2010).

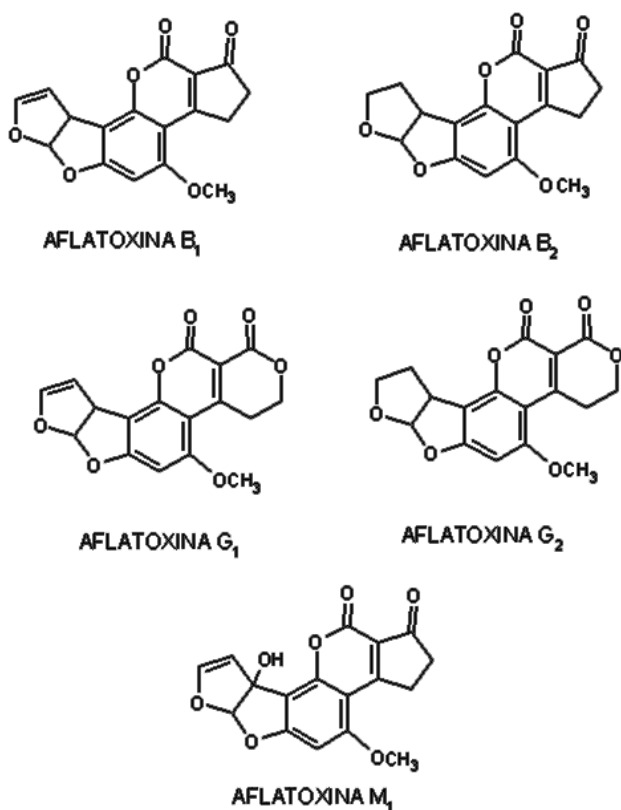
### **3.4.4 Efecto de las principales micotoxinas de *Aspergillus* en humanos y animales**

El género *Aspergillus* está constituido por alrededor de 185 especies, de las cuales 34 se han vinculado a enfermedad en humanos, dentro de ellas se encuentran infecciones superficiales (otitis externas fúngicas, onicomycosis, queratomycosis e infecciones de heridas) y aspergilosis profunda invasora, adquiriéndose habitualmente por la inhalación de conidios. Dentro de las especies más importantes se encuentran *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. terreus*; presentando menos interés *A. parasiticus*,

*A. nomius*, *A. versicolor*, *A. oryzae*, *A. ochraceus*, *A. glaucus* y *A. australi*. La especie más virulenta del género es *A. fumigatus*; sin embargo, los principales productores de aflatoxinas en granos son *A. flavus* (produce: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>) y *A. parasiticus* (produce: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) (Arenas, 2014; IARC, 2015).

### 3.4.4.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas principalmente por hongos pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Existen alrededor de 20 diferentes tipos de aflatoxinas, aunque debido a sus potenciales efectos secundarios, se han identificado cinco tipos de aflatoxinas (Figura 1) como las más representativas: aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) y aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>).



**Figura 1.-** Estructuras químicas de las principales aflatoxinas por su alto potencial, carcinógeno, mutágeno y teratogénico (Tomado de Martínez *et al.*, 2013b).



Las denominaciones “B” y “G” fueron asignadas por la fluorescencia que emiten bajo luz ultravioleta (UV), azul (B) con anillo de pentano o verde (G) con anillo de lactona. Los subíndices 1 y 2 de cada molécula química, son relativos a su movilidad cromatográfica, según su peso molecular, que permite identificarlos según sus coeficientes de retención, La AFB<sub>1</sub> es la más tóxica de las cuatro. Son solubles en solventes orgánicos como metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo, diclorometano, isopropanol y dimetilsulfóxido, e insolubles en agua o éter. Estos compuestos se pueden separar o adicionar a un radical alcohol, hidroxilo, oxidrilo o una doble ligadura lo que da diferentes propiedades a cada uno de los compuestos (Santibáñez *et al.*, 2011; Carvajal, 2013; Gavrilova *et al.*, 2014; Richard, 2007; IARC, 2015). En la Tabla 1 se muestran las propiedades químicas de las cinco aflatoxinas más importantes.

**Tabla 1.** Propiedades químicas de las 5 aflatoxinas más representativas (tomado de Carvajal, 2013).

Aflatoxina	Fórmula molecular	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Absorción ultravioleta 360-362 nm
B1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	312	268-269	21,800
B2	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	314	286-289	24,000
G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	328	244-246	17,700
G2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330	327-240	17,100
M1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O	328	299	21,250 (357 nm)

#### 3.4.4.2 Efectos por aflatoxinas

Producen efectos negativos en humanos y animales, afectando el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Carvajal, 2013). Se consideran sustancias cancerígenas, teratogénicas y mutagénicas. Al ingerir alimentos contaminados con AFB<sub>1</sub>, el hígado la metaboliza a AFM<sub>1</sub> y se acumula en leche, tejidos

y huevos, aproximadamente 24 h después de su consumo. La AFB<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> presentan efectos tóxicos son similares, sobresaliendo los mutagénicos, hepatotóxicos, inmunosupresivos y carcinogénicos, afectando principalmente a infantes y adolescentes. Las aflatoxinas afectan la absorción y metabolismo de lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Santibáñez *et al.*, 2011; Carvajal, 2013; Zuki-Orozco *et al.*, 2018).

La presencia de ciertos hongos como *Aspergillus* no necesariamente implican la presencia de aflatoxinas, pues hay cepas no tóxicas; sin embargo, lo más interesante es que la ausencia de *Aspergillus* en el alimento no necesariamente implica que el alimento no contenga aflatoxinas, debido a que la toxina puede persistir aun después que el moho ha desaparecido e incluso después de la cocción del alimento (Armijo y Calder, 2009).

### **3.5 Medidas para el control de las micotoxinas**

El Centro Internacional de Investigaciones Contra el Cáncer (IARC) recomienda que para combatir las micotoxinas es necesario conocer el grado de exposición de las micotoxinas con la población, diversificar la dieta y no depender tanto de los cultivos contaminados, clasificar los granos que presenten menor daño, mejorar las condiciones de almacenamiento, reducir las cepas micotoxigénicas infectando los cultivos con cepas del mismo género que no produzcan micotoxinas (IARC 2015).

Para esto existen como medidas de control para micotoxinas como El sistema de alerta rápido y la regulación de micotoxinas, mediante límites máximos permisibles.

#### **3.5.1 Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos**

El Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF, por sus siglas en ingles), es un sistema de información sobre riesgos para la salud humana relacionados con los alimentos y piensos. Para contribuir con la seguridad alimentaria de los consumidores ha reportado que las micotoxinas son las sustancias tóxicas o contaminantes que mayor número de notificaciones presentan, seguidos por los de origen biológico y los plaguicidas. Según datos publicados del 2014 al 2017, las aflatoxinas son las micotoxinas más predominantes que se han notificado en los reportes anuales de RASFF. En 2014

hubo 359 notificaciones de micotoxinas en alimentos, aumentando hasta 475 notificaciones en 2015, la mayoría relacionada con la presencia de aflatoxinas (421 notificaciones). En 2016 hubo un ligero aumento con respecto al 2015, con un total de 489 notificaciones para micotoxinas, siendo 348 notificaciones de aflatoxinas en alimentos. El reporte anual 2017, refiere 529 notificaciones para micotoxinas de las cuales las aflatoxinas siguen siendo las más reportadas en alimentos (ACSA, 2018a).

Los datos de ocurrencia son extremadamente importantes para determinar el riesgo que representan las micotoxinas tanto para humanos como para animales; sin embargo, esto es solo una parte de la evaluación de riesgos que lleva al establecimiento de regulaciones (Pereira *et al.*, 2014).

### **3.5.2 Normatividad para micotoxinas (niveles máximos permisibles)**

Existe una necesidad continua de proteger la salud de los humanos y animales susceptibles al limitar su exposición a las micotoxinas. A pesar de muchos años de investigación y de la introducción de buenas prácticas en la producción, el almacenamiento y la cadena de distribución de alimentos, las micotoxinas siguen siendo un problema. Muchos países regulan o sugieren niveles permitidos de micotoxinas en alimentos y piensos debido a su importancia para la salud pública y su impacto comercial (FAO, 2018). Algunas micotoxinas tienen menor repercusión sobre la salud humana, por lo tanto, al superar los límites máximos permisibles sus efectos son menos críticos en comparación con otras micotoxinas como las aflatoxinas las cuales son consideradas como carcinógenos para el ser humano (ACSA, 2018a).

Las micotoxinas no se pueden eliminar completamente; sin embargo, se puede mantener sobre los límites máximos permisibles en los alimentos y los piensos para que la exposición de la población a través de los alimentos no suponga un riesgo (ACSA, 2018b). La toxicidad de estos metabolitos ha llevado a muchos países a establecer regulaciones estrictas para el control de alimentos y piensos, y el consiguiente establecimiento de una legislación para controlar su posible contaminación (Juan *et al.*,

2012). Por tanto, la Organización Mundial de la Salud, la Comisión Europea, la FDA, el Codex Alimentario y las Normas mexicanas han propuesto cantidades permisibles para los alimentos.

### **3.5.2.1 Regulación de micotoxinas por la UNION EUROPEA (UE)**

La Unión Europea (UE) es una asociación económica y política compuesta por 28 países, que en conjunto cumplen normas de calidad estrictas, teniendo como objetivo principal de toda la legislación el proteger la salud de los consumidores. La política y la actuación de la UE en materia de seguridad alimentaria se centra en higiene alimentaria, salud animal, sanidad vegetal, contaminantes y residuos. Con este fin, la UE establece el contenido máximo de determinados contaminantes en los alimentos. Los contaminantes son sustancias que no se han añadido a los alimentos de forma intencionada, sino que han llegado a ellos durante la producción, el envasado, el transporte, etc. Por consiguiente, se realizan rigurosas comprobaciones en cada fase; las importaciones procedentes de fuera de la UE deben cumplir las mismas normas y someterse a las mismas comprobaciones que los alimentos producidos en la Unión. Por consecuencia, el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión Europea fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (UE, 2019).

En la Tabla 2, se observan los contenidos máximos establecidos por el Reglamento (CE), para algunas micotoxinas del género *Fusarium*, como las fumonisinas, el deoxinivalenol y la zearalenona, presentes en granos y cereales como maíz y subproductos, trigo, avena, productos infantiles y aceite.

**Tabla 2.** Contenido máximo permisible para micotoxinas del hongo *Fusarium* en granos y cereales (adaptado de CE, 2007).

<b>Micotoxina</b>	<b><math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Producto</b>
Deoxinivalenol	1250	Cereales no elaborados; que no sean trigo duro, avena y maíz.
	1750	Trigo duro y avena no elaborados.
	1750	Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda.
	750	Cereales destinados al consumo humano directo.
	200	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles.
Zearalenona	100	Cereales no elaborados distintos al maíz.
	350	Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda.
	75	Cereales destinados al consumo directo.
	400	Aceite de maíz refinado.
	100	Maíz destinado al consumo humano directo, aperitivos de maíz y cereales a base de maíz.
	20	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles.
Fumonisinias (suma de B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> )	4000	Maíz no elaborado, excepto el destinado a molienda por vía húmeda.
	1000	Maíz y alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo.
	800	Cereales a base de maíz y aperitivos de maíz.
	200	Alimentos infantiles elaborados a base de maíz.

En la Tabla 3, se establecen los límites máximos permisibles para las aflatoxinas B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> y la suma de las aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en µg kg<sup>-1</sup>, pertenecientes al género *Aspergillus*. Los productos alimenticios que aplican son para granos, cereales, alimentos infantiles y leche cruda.

**Tabla 3.** Contenidos máximos permitidos para aflatoxina B<sub>1</sub>, M<sub>1</sub> y la suma de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en µg kg<sup>-1</sup> (adaptado de CE, 2010).

PRODUCTOS	Suma de		
	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> .	M <sub>1</sub>
Cacahuates y otras semillas oleaginosas.	8	15	-
Almendras, pistachos y huesos de albaricoque.	12	15	-
Avellanas y nueces de Brasil.	8	15	-
Subproductos de cacahuates y otras semillas oleaginosas destinados al consumo humano.	2	4	-
Todos los cereales y subproductos, incluidos los productos de cereales transformados.	2	4	-
Maíz y arroz previo, a un proceso físico antes del consumo humano directo o de su utilización como ingredientes de productos alimenticios.	-	-	-
	5	10	
Alimentos a base de cereales transformados y alimentos para niños	0.10	0	-
Leche cruda, tratada térmicamente y productos lácteos.	-	-	0.050

Por otra parte, en la Tabla 4, se puede observar el límite máximo permisible para la ocratoxina A, la cual es producida por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, aplica para productos derivados de cereales no elaborados, subproductos y cereales destinados al consumo humano directo.

**Tabla 4.** Límite máximo establecido para Ocratoxina A en cereales (adaptado de CE, 2012).

<b>Micotoxina</b>	<b><math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Producto</b>
Ocratoxina A	3	Productos derivados de cereales no elaborados, subproductos y cereales destinados al consumo humano directo.

### 3.5.2.2 Regulación de micotoxinas por la ADMINISTRACIÓN DE ALIMENTOS Y MEDICAMENTOS [Food and Drugs Administration (FDA)].

La FDA (2019) es la agencia del gobierno de los Estados Unidos, responsable de proteger la salud pública mediante la regulación de medicamentos de uso humano y veterinario, cosméticos, aparatos médicos, productos que emiten radiaciones, vacunas, productos biológicos y derivados sanguíneos. Favorece la salud pública mediante el fomento de las innovaciones de productos y proporciona información necesaria y con base científica sobre la prevención de enfermedades. Además, supervisa la seguridad de los alimentos nacionales e importados, a través de programas de monitoreo de patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *cyclospora*), contaminantes químicos (acrilamida, dioxinas), pesticidas (DDT), metales pesados y toxinas naturales (aflatoxinas, fumonisinas). La FDA cuenta con documentos, listas, políticas, programas y declaraciones, como referencia para su cumplimiento, dentro de estas se encuentran: el Manual de Orientación del Programa de Cumplimiento (CPGM), las Guías de Política de Cumplimiento (CPG) y el Manual de Procedimientos Reglamentarios (RPM).

Así mismo, en la Tabla 5, se describen algunas micotoxinas, productos y subproductos para consumo humano, regulados por las CPG que establecen los contenidos máximos permisibles para algunas micotoxinas.

**Tabla 5.** Límites máximos permisibles para micotoxinas propuestos por la FDA.

<b>Micotoxina</b>	<b>µg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Producto</b>	<b>Referencia</b>
Patulina	50	Jugo, concentrados y productos de jugo de manzana.	CPG Sec. 510.150, 2005
Deoxinivalenol	1000	Productos de trigo terminados (harina, salvado y germen), consumo humano.	FDA, 2010b
	10000	Granos y subproductos para pollos.	
Fumonisinias (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> + B <sub>3</sub> )	2000	Productos de maíz molido (desgerminado)	FDA, 2001
	4000	Productos de maíz molido (parcialmente desgerminado).	
	30000	Alimento para rumiantes y aves de corral.	
AFT (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )	20	Alimentos para consumo humano	CPG Sec. 555.400, 2005.
	100	Productos de maíz y maní destinados a la cría de ganado vacuno, cerdos o aves.	CPG Sec. 683.100, 1994
	300	Harina de semilla de algodón para ganado vacuno, porcino o aves.	
Aflatoxina M1	0.5	Leche.	CPG. Sec. 527.400, 2005

### **3.5.2.3 Regulación de micotoxinas por el Código de alimentos (Codex Alimentarius)**

El Código de Alimentos es una comisión encargada de ejecutar normas alimentarias, códigos de prácticas, directrices internacionales y otras recomendaciones, teniendo como objetivo proteger la salud de los consumidores y asegurar practicas equitativas en el comercio de alimentos, estos textos tratan sobre prácticas de higiene, etiquetado, aditivos, inspección y certificación, nutrición y residuos de medicamentos veterinarios y de plaguicidas. De modo que se ha convertido en el punto de referencia mundial para los



consumidores, la industria alimentaria y los organismos de supervisión de los alimentos de distintos países (FAO/OMS, 2018a). En el Codex Alimentarius se define a un contaminante como: “Cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de contaminación ambiental (FAO/OMS, 2015). Esta definición de contaminante incluye implícitamente las sustancias tóxicas naturales, que no se añaden intencionadamente a los alimentos y piensos (micotoxinas) (FAO/OMS, 2018b).

En la Tabla 6, se observan los límites máximos permisibles para la suma de aflatoxinas totales (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) y para la aflatoxina M<sub>1</sub>, en maíz, almendras, nueces, avellanas, cacahuates y leche.

**Tabla 6.** Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por el Codex Alimentarius (adaptado de FAO/OMS, 2018b).

Aflatoxina	$\mu\text{g kg}^{-1}$	Producto
AF total (B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub> )	10	Maíz
		Almendras (después de eliminar la cascara)
		Nueces del Brasil (todo el producto)
		Avellanas (después de eliminar la cascara)
AFM <sub>1</sub>	15	pistachos
		Cacahuete
	0.5	Leche.

En la Tabla 7, se establecen los límites máximos permisibles para algunas micotoxinas como deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina, patulina; aplica para granos, cereales y jugo de manzana.

**Tabla 7.** Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por el Codex Alimentarius (adaptado de FAO/OMS, 2018b).

<b>Micotoxinas</b>	<b><math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Producto</b>
Deoxinivalenol	200	Alimento a base de cereales para lactantes y niños.
	1000	Harina, sémola y hojuelas de trigo, maíz o cebada.
	2000	Cereales en grano (Trigo, maíz y Cebada) destinados a elaboración posterior
Fumonisinias	4000	Maíz en grano crudo.
(B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> )	2000	Harina de maíz y sémola de maíz
Ocratoxina A		Trigo
	5	Cebada
		Centeno
Patulina	50	Jugo de manzana

### 3.5.2.4 Regulación de micotoxinas por las Normas Oficiales Mexicanas

En México, la legislación es realizada a través de Normas, de las cuales, existen dos tipos básicos: las Normas Mexicanas (NMX) y las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), Las primeras son documentos técnicos que establecen y expresan una recomendación de parámetros y procedimientos sobre servicios, procesos y productos; las segundas establecen regulaciones técnicas de observancia obligatoria que tienen como finalidad proteger la seguridad y salud de las personas, las NOM son expedidas y publicadas en el Diario Oficial de la Federación (DOF) (Secretaría de Salud, 2015).

Existen 4 Normas que regulan la incidencia de aflatoxinas en cereales, estableciendo límites máximos permisibles en consumo humano ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y consumo animal (de 21 a  $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Martínez *et al.*, 2013a).

La NOM-247-SSA1-2008, establece la concentración de aflatoxinas en cereales y sus productos (sémolas o semolinas), alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harina, sémolas o semolinas o sus mezclas y productos de panificación. Además, aporta información relativa a las especificaciones sanitarias de transporte y almacenamiento de cereales, como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos establecidos por la NOM-247-SSA1-2008.

<b>Producto</b>	<b><math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Aflatoxina</b>
Cereales y sus productos:		
Harina de cereales		
Sémolas semolinas	20	AF Totales: suma de $B_1 + B_2 + G_2 + G_1$
Alimentos a base de cereales		
Productos de panificación		

La NOM-187-SSA1/SCFI-2002, instaura límites máximos permisibles de  $12 \mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxinas en masa, tortillas de maíz nixtamalizado, tostadas de maíz nixtamalizado y harinas de maíz nixtamalizado para preparar tortillas y tostadas y un límite de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , para tortillas de trigo, tortillas integrales, harinas para preparar tortillas de trigo y harinas integrales para preparar tortillas, como se puede observar en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por la NOM-187-SSA1/SCFI-2002.

<b>Producto</b>	<b><math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Aflatoxina</b>
Masa		
Tortillas de maíz		
Tostadas de maíz nixtamalizado	12	
Harinas de maíz nixtamalizado para preparar tortillas y tostadas		AF Totales: suma de $B_1 + B_2 + G_2 + G_1$
Tortillas de trigo		
Tortillas integrales	20	
Harinas para preparar tortillas de trigo		
Harinas integrales para preparar tortillas		

La NOM-188-SSA1-2002, establece un control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal como se observa en la Tabla 10; por último, en la Tabla 11, NOM-184-SSA1-2002, establece un límite máximo permisible para aflatoxina  $M_1$  de  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  para leche, fórmulas lácteas y productos lácteos combinados.

**Tabla 10.** Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por la NOM-188-SSA1-2002.

<b>Producto</b>	<b><math>\mu\text{g kg}^{-1}</math></b>	<b>Aflatoxina</b>
Cereales para consumo humano.	20	
Cereales para consumo de aves (excepto pollos de engorda).	100	AF Totales: suma de $B_1 + B_2 + G_2 + G_1$
Cereales para cerdos en engorda, maduros destinados a reproducción.	100	
Cereales para rumiantes de engorda en etapa de finalización	300	

**Tabla 11.** Niveles máximos permisibles de micotoxinas para alimentos determinados por la NOM-184-SSA1-2002.

Producto	$\mu\text{g kg}^{-1}$	Aflatoxina
Leche		
Pasteurizada		
Ultrapasteurizada	0.5	M <sub>1</sub>
Esterilizada		
Deshidratada		

En México, aún no existe una legislación que aplique para otras micotoxinas que ya han sido detectadas en otros alimentos y productos para humanos y animales como los tricotecenos, las ocratoxinas, patulina (Robledo-Marengo *et al.*, 2012); así como para aflatoxinas específicas como la B<sub>1</sub>, la cual es altamente tóxica (Martínez *et al.*, 2013a).

### 3.6 Investigaciones de micotoxinas realizadas a nivel mundial de micotoxinas

Se han realizado investigaciones a nivel mundial sobre la contaminación de los alimentos por micotoxinas. Diversos autores como Martínez *et al.* (2014) estudiaron la presencia de deoxinivalenol (DON) en 50 muestras de trigo, donde encontraron que el 24 % presentó valores de DON  $\geq 1 \mu\text{g g}^{-1}$ , el 26 % varió entre 0.5 y 0,99  $\mu\text{g g}^{-1}$ , mientras que el 50 % restante mostró valores inferiores a 0.5  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Por otra parte, Mejía *et al.* (2014), evaluaron la presencia de aflatoxinas en 47 muestras de productos derivados de cereales para consumo humano que se expenden en los mercados de la ciudad de Trujillo, Perú, solo en dos muestras hubo presencia de AF con niveles de 1.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 1.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Mientras que, Pleadin *et al.* (2015) determinaron la presencia de la aflatoxina B<sub>1</sub> de 972 muestras de maíz, obtenidas en granjas durante un periodo de 5 años y encontraron una concentración máxima de 2072  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . En otro estudio realizado en Camerún Ediage *et al.* (2014) analizaron 165 muestras de maíz en hogares agrarios, de las cuales, se determinó la presencia de algunas micotoxinas como las fumonisinas (20-5412  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), aflatoxina B<sub>1</sub> (6-645  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), roquefortina C (1-181  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y desoxinivalenol (27-3842  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Por otro lado, en la región oriental de Kenia, Kilonzo *et al.* (2014) cuantificaron

la exposición de los hogares a las aflatoxinas a través del consumo de maíz y sus productos, recolectaron 20 muestras, de las cuales el 45 % estaban contaminadas con aflatoxinas en concentraciones que variaban entre 18 y 480  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Del mismo modo, en Turquía, Algül y Kara (2014) analizaron 21 muestras de harina de maíz, de las cuales obtuvieron valores que fluctúan entre un mínimo de  $0.18 \pm 0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$  y un máximo de  $13.92 \pm 0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales. Baoua *et al.* (2016), encontraron valores para aflatoxinas totales que oscilaron entre 57.9 - 504.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 26.3 - 478.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 30.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 188.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en Benín, Burkina Faso, Togo y Ghana, respectivamente. Paralelamente, en Ghana, Blankson y Mill-Robertson (2016) evaluaron 35 productos alimenticios a base de cereales destinados a bebés y niños, siete de los productos muestreados eran a base de maíz, de los cuales el 100 % presentó contaminación con aflatoxina B<sub>1</sub> en un rango de  $1.40 \pm 0.03 - 12.86 \pm 0.004 \mu\text{g kg}^{-1}$ , para aflatoxinas totales presentó una concentración de  $2.29 \pm 0.01 - 20.74 \pm 0.05 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Turner *et al.* (2000) estimaron que más del 30 % de los niños de Gambia están expuestos a alimentos contaminados con más de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas. En Cuba, el cáncer constituye la segunda causa de muerte, como una de las causas más importantes se encuentra la ingestión de alimentos contaminados con micotoxinas (Astoviza y Suárez, 2005).

Orimí (2001) señala que las toxinas derivadas de los hongos constituyen un problema de salud pública en prácticamente todas las regiones del mundo, estas se propagan a través de los alimentos incorporándose a la cadena trófica y en muchos casos los efectos sobre la salud se manifiestan a través del tiempo, es decir, los síntomas no son inmediatos.

### **3.7 Investigaciones de micotoxinas realizadas en México**

Por otra parte, en México se han realizado estudios de identificación de especies fúngicas a nivel de género y la cuantificación de algunas micotoxinas presentes en diversos granos, dentro de estos autores se encuentran Santibáñez *et al.* (2011) quienes llevaron a cabo un estudio de hongos micotoxigénicos, en el municipio de Zapotlán, Jalisco. Estos autores analizaron 30 muestras de alimento comercial o elaborado, almacenado en granjas. Como resultados obtuvieron que el 100 % de las muestras

analizadas presentaron contaminación por hongos y el 33 % de dichas muestras fueron positivas para aflatoxinas B<sub>1</sub> (70 %), B<sub>2</sub> (30 %), G<sub>2</sub> (40 %) y G<sub>1</sub> (10 %), todas ellas con una concentración de 81 µg kg<sup>-1</sup>, el porcentaje de la AFB<sub>1</sub>, es elevado y constituye un problema de salud pública, debido a que la AFB<sub>1</sub> es metabolizada por los bovinos y excretada en la leche en forma de aflatoxina M<sub>1</sub>, la cual tiene efectos mutagénicos, hepatotóxicos, inmunosupresivos y carcinogénicos. Por otro lado, en el municipio de Coatepec, Veracruz, Luna *et al.* (2010) estudiaron la concentración de ocratoxina A, en café verde en 3 almacenes, donde el 100 % de las muestras de café analizadas presentó contaminación con ocratoxinas A, con valores que fluctuaron desde 1.2 a 7.8 µg kg<sup>-1</sup>. Por otro lado, Flores *et al.* (2006), analizaron 133 muestras de alimentos balanceados y granos, empleados en la producción de aves, cerdos y ganado, la mayor incidencia con ocratoxina se presentó en concentraciones que variaron en un rango de 1 a 352 µg kg<sup>-1</sup>; sin embargo, en maíz se presentó la aflatoxina B<sub>1</sub> en concentraciones de 3 a 10 µg kg<sup>-1</sup>.

### **3.8 Características morfológicas de hongos del género *Aspergillus***

El género *Aspergillus* está constituido por hongos filamentosos que habitualmente se reproducen asexualmente por conidios (Deuteromycetes), presentando algunas especies también reproducción sexual (Ascomycetes) (Palacio *et al.*, 2003).

Dentro de las características para la identificación a nivel de generó del hongo, Barnett y Hunter (1987) describen las siguientes características:

Conidióforos en posición vertical, simples, que terminan en una inflamación globosa o claviforme, portan fiálides en el ápice o se irradian desde toda la superficie; Conidios (fialosporas): conglomerados, globosos, a menudo de color diverso en masa, en cadenas basípetas secas.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Ubicación del sitio de estudio**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Colegio de Posgraduados, Campus Tabasco. Se identificaron los sitios que venden granos de maíz a granel, ubicados en la avenida Lázaro Cárdenas del municipio de Cárdenas, Tabasco (17°59'00"N 93°22'00"O). El sitio de estudio presenta un clima cálido húmedo en el 95 % de su superficie, con un promedio anual de precipitación de 2000 mm anuales y una temperatura media anual de 27 °C (INEGI, 2017).

#### **4.1.1 Toma de muestras**

Se colectaron muestras de 1 kg de granos de maíz, a granel en ocho establecimientos. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético, tipo Ziploc se etiquetaron con la fecha y un número, acorde al establecimiento muestreado, para su análisis.

### **4.2 Aislamiento e identificación de los hongos**

Para llevar a cabo el aislamiento e identificación de los hongos se procedió a preparar el medio de cultivo Agar Sabouraud (BD *Difco*<sup>TM</sup>), desarrollado por BD (2013). Se diluyeron 65 g de Agar Sabouraud en 1 L de agua destilada y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos en autoclave (marca Allamerican, modelo 1925X). El medio de cultivo se colocó en la cámara de flujo laminar (marca Labconco, modelo 8811). Para verterlo en las cajas Petri (100 x 15 mm), adicionando 15 mL por caja, después de su solidificación se refrigeraron hasta su utilización a 4 °C.

#### **4.2.1 Desinfección de los granos de maíz previo a la siembra**

Antes de realizar la inoculación se tomó una muestra de 100 g a la cual se le realizó una limpieza física, desechando las impurezas: restos vegetales, elementos minerales,



elementos diversos, los granos germinados, inmaduros y con daños visibles. Para la desinfección de los granos se emplearon las metodologías propuestas por Hernández-Delgado *et al.* (2007); Martínez *et al.* (2014) y Agwanande *et al.* (2016). Después de la limpieza se pesaron 20 gramos que se introdujeron en alcohol etílico a 96° (tipo industrial) durante dos minutos, enseguida se enjuagaron con agua destilada estéril por dos minutos con agitación manual. A continuación se colocaron en inmersión en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración del 1 % (cloralex ®), por un periodo de dos minutos y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril durante dos minutos.

#### **4.2.2 Siembra de los granos en el medio de cultivo**

Para la siembra de los granos en el medio de cultivo se siguió la metodología desarrollada por Soliman (2003), la cual consiste en tomar 10 granos de la muestra desinfectada descrita en el párrafo. Los granos se sembraron en las cajas Petri que contenía medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (Figura 2A) bajo una campana de flujo laminar. Por cada muestra de maíz seleccionada se utilizaron tres placas obteniendo un total de 24 cajas. Las cajas se sellaron con papel parafilm y fueron incubadas a 37 °C durante un periodo de 120 horas en oscuridad, en una incubadora (marca Lab-line, modelo Imperial II). Se realizaron observaciones a las 48, 72 y 120 horas de incubación (Figura 2B), registrando el número de colonias por grano.



**Figura 2.-** A) Inoculación de granos de maíz en caja Petri con agar Sabouraud. B) Observación del desarrollo de colonias fúngicas a las 120 horas de cultivo.

#### **4.2.3 Purificación de hongos e identificación morfológica**

Después de 120 horas de cultivo, se observó la formación de diferentes colonias y para obtener los aislamientos puros de cada colonia fúngica encontrada, estas fueron resembradas en agar sabouraud incubados a 37 °C por otras 120 horas. Después de este periodo de tiempo se procedió a realizar la caracterización macro y microscópica para la identificación de los hongos a nivel de género, se emplearon claves, referencias bibliográficas, fotografías y guías disponibles de acuerdo con Alcorn y Yeager (1938), Barnett y Hunter (1987), Navi *et al.* (1999), Abarca (2000), Washington *et al.* (2008), Pitt y Hocking (2009), Arenas (2014) y Bragulat *et al.* (2017).

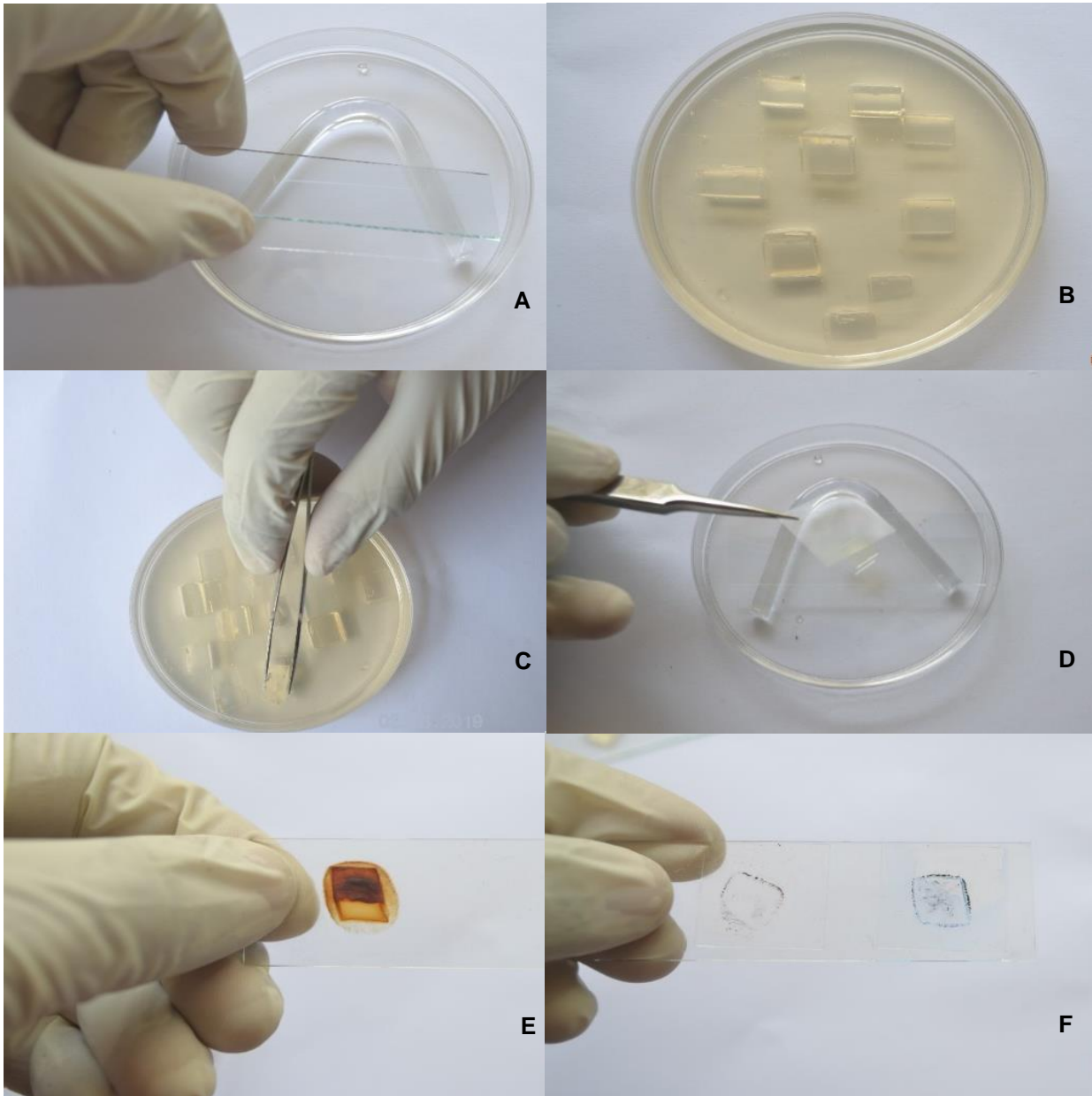
#### **Tipos de colonias**

El estudio macroscópico se realizó mediante observaciones visuales del aspecto como el color en el anverso y reverso de la colonia, la presencia de pigmentos, la textura de la superficie y la forma del micelio. Las colonias fúngicas se fotografiaron con ayuda de una cámara fotográfica digital (marca Nikon, modelo D3100).

## **Observación de estructura fúngica**

Para la identificación microscópica de las estructuras fúngicas *in situ*, se empleó la técnica de microcultivo (Figura 3), descrita por Bonifaz (2012). Esta técnica consiste en la siembra de una parte de micelio fúngico en un fragmento de medio de cultivo sobre un portaobjetos, incubando hasta su desarrollo, para posteriormente, teñirlo y observar el micelio del hongo, sin deterioro de su morfología, permitiendo de esta manera la caracterización de su estructura microscópica (conidióforo, hifas, vesícula, fiálides, métulas y conidios) e identificación.

Mediante la técnica de microcultivo previamente descrita, a partir de tejido micelial teñido con azul de lactofenol se procedió a observar y fotografiar las estructuras microscópicas de los hongos, con ayuda de un microscopio de contraste de fases con cámara digital integrada (marca Motic, modelo BA310) a un objetivo de 40x. La frecuencia de aparición de los géneros de hongos aislados se calculó mediante la técnica descrita por Meer *et al.* (2013).



**Figura 3.-** Descripción gráfica de la técnica de microcultivo. A) Colocación del portaobjetos sobre la varilla de vidrio, B) Fragmentación del medio de cultivo en cuadros de 1.5 x 1.5 cm. C) Colocación de un fragmento sobre el portaobjetos. D) Siembra de los hongos aislados y colocación del cubreobjetos con adición de agua glicerinada. E) Remoción del cubreobjetos del hongo aislado. F) Tinción del tejido micelial con azul de lactofenol (Bonifaz, 2012).

### **4.3 Determinación del contenido de aflatoxinas en granos de maíz**

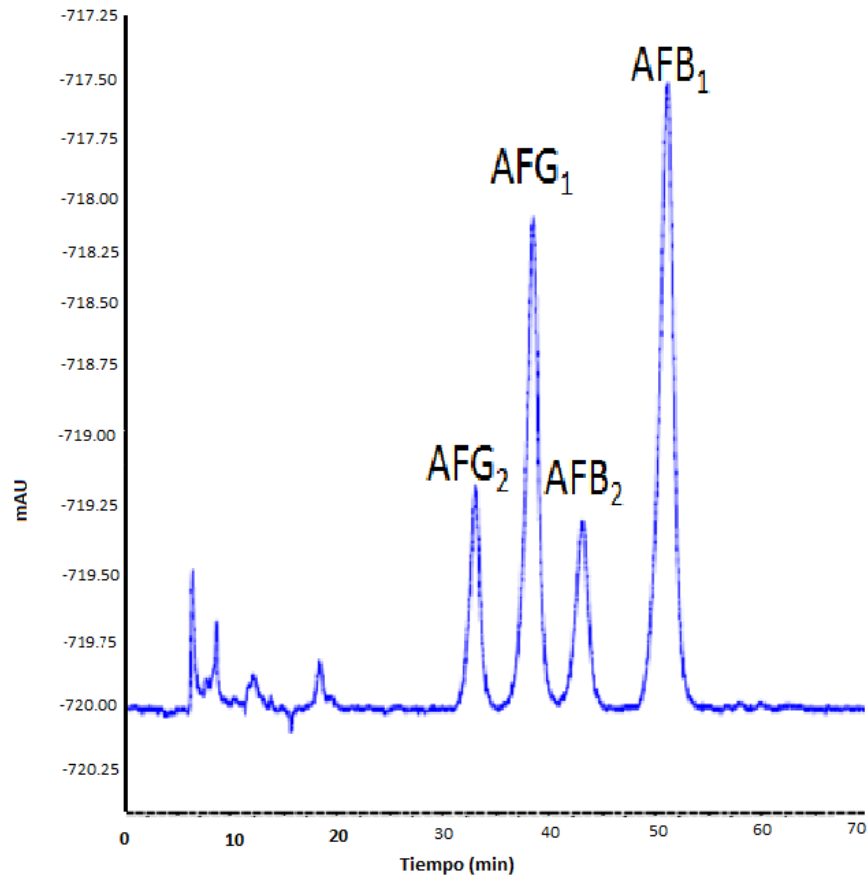
Para el estudio de aflatoxinas se emplearon las metodologías descritas por Abbas *et al.* (2008) y Accinelli *et al.* (2014), todos los reactivos fueron de grado analítico de la marca Sigma-Aldrich, Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), Metanol (CH<sub>3</sub>OH) y óxido de aluminio (alúmina) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. El agua empleada para la preparación de las disoluciones fue grado HPLC.

#### **4.3.1 Procedimiento para la cuantificación de la curva de calibración**

La curva de calibración se preparó a partir del estándar de aflatoxinas (Sigma Aldrich), el cual contiene en una mezcla de cuatro aflatoxinas (AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFB<sub>1</sub> Y AFB<sub>2</sub>). Se prepararon diluciones empleando los siguientes volúmenes del estándar: 50, 100, 150, 300 y 400 µL, todas se aforaron a 500 µL con metanol, con esta preparación se determinó la concentración (µg µL) de cada aflatoxina a dichos volúmenes.

#### **4.3.2 Control analítico**

Antes de comenzar con la separación cromatográfica se realizaron 2 corridas de control, una con la fase móvil y posteriormente se realizó otra corrida con el estándar de aflatoxinas, esto para garantizar que no hubiera interferencias debido a estas dos fuentes. Se realizó el mismo procedimiento con las concentraciones de la curva de calibración, un duplicado de muestra y una muestra enriquecida. En la figura 4 se muestra el cromatograma de la mezcla de aflatoxinas en la curva de calibración utilizada, empleando OpenLAB paquete de software CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies).



**Figura 4.-** Cromatograma de una solución de 400  $\mu$ L de la mezcla estándar de aflatoxinas.

#### 4.3.3 Procedimiento para la extracción de aflatoxinas

Para la extracción de las aflatoxinas se emplearon las metodologías descritas por Abbas *et al.* (2008) y Accinelli *et al.* (2014), la cuantificación de aflatoxinas se realizó en los extractos, tal como se describe a continuación: una submuestra de 100 g se pesó de las muestras colectadas en los diferentes establecimientos, las muestras seleccionadas fueron enjuagadas con agua destilada para remover el polvo, las partículas extrañas y los restos de granos quebrados. Posteriormente, fueron trituradas, por separado, en un molino manual para granos (marca Estrella, modelo 11539) y se tomaron 20 g de cada muestra triturada y cada una se mezcló con 100 mL de una solución de metanol:agua (70:30) a temperatura ambiente, con agitación de 150 rpm, durante 20 min.

Consecutivamente, se filtraron empleando papel de filtro Whatman #1. Del filtrado obtenido se colocaron 5 mL de cada muestra en tubos eppendorf y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, en una centrifuga (Marca Eppendorf, Modelo 5702). Se tomaron 3 mL del sobrenadante para limpieza; fueron colocados en una minicolumna empacada con óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ). Posteriormente, el extracto filtrado se volvió a centrifugar a 10,000 rpm, durante 5 minutos y el sobrenadante se colocó en tubos eppendorf para su lectura en HPLC.

#### **4.3.4 Condiciones cromatográficas**

Las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de las aflatoxinas presentes en la muestra se establecieron tomando como referencia lo establecido por el estándar de aflatoxinas, optimizando las condiciones. Se inyectó un volumen de 20  $\mu$ L de forma manual en el loop de la bomba (HPLC) marca Agilent 1220 infinity, acoplado a un detector UV-Vis, equipado con una columna Nucleosil C18 (250 mm, 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), en modo isocrático, empleando una fase móvil 60:40 de agua:acetonitrilo/metanol 50/50. El flujo empleado fue de 0.2 mL  $min^{-1}$  a 28 °C y 360 nm de longitud de onda. El instrumento fue controlado por el OpenLAB paquete de software CDS ChemStation Edition (Agilent Technologies).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento de hongos presentes en granos de maíz

De los granos de maíz se aislaron 85 colonias las cuales se agruparon en siete grupos por similitud, el conteo de estas colonias por tipo se observa en la Tabla 12, dentro de los cuales el que obtuvo una mayor proliferación fueron las colonias de tipo 2 y tipo 3, con 23 y 16 colonias, respectivamente. La caracterización macro y microscópica de seis tipos de hongos se describen en un apartado posterior, un tipo no se caracterizó debido a la falta de criterios para su determinación.

**Tabla 12.** Conteo de colonias de hongos presentes en granos de maíz.

Muestra	COLONIAS						
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5	Tipo 6	Tipo 7
1	0	6	3	1	-	1	2
2	0	5	-	2	1	-	1
3	5	3	1	-	-	2	1
4	0	2	5	1	-	-	3
5	0	2	-	7	1	-	1
6	1	4	1	1	-	-	2
7	0	-	2	-	3	-	7
8	0	1	4	-	-	1	3
Total	6	23	16	12	5	4	20

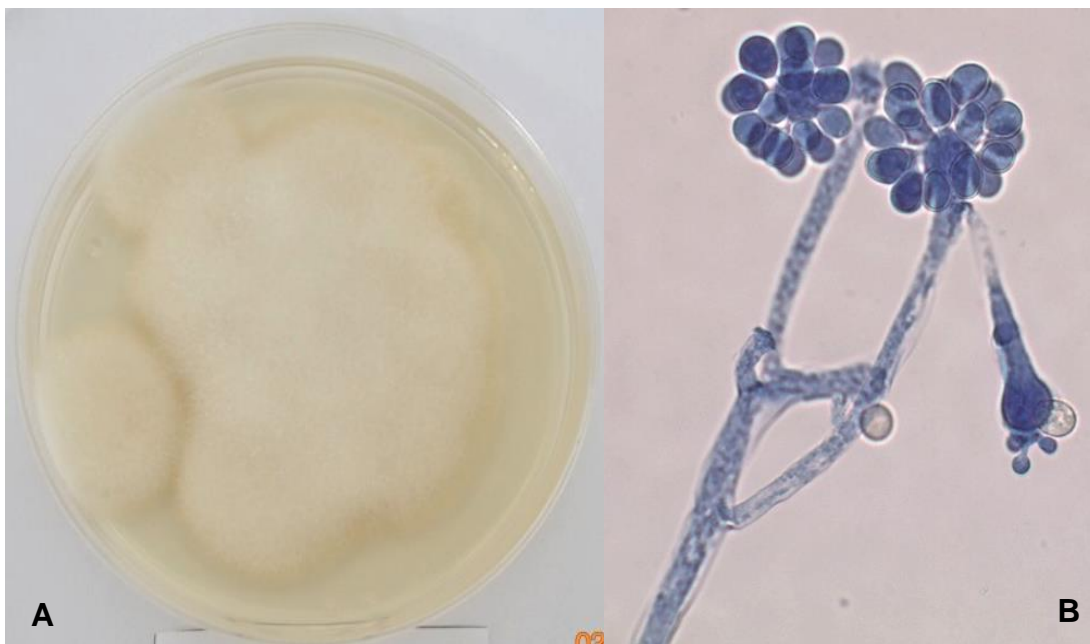
### 5.2 Descripción de las características morfológicas a nivel de género de los hongos aislados en granos de maíz

Los diferentes tipos de hongos encontrados en los granos de maíz, se caracterizaron una vez logrado su desarrollo en Agar Sabouraud, para la descripción de su estructura macro y microscópica, se emplearon las claves taxonómicas previamente descritas, la descripción de estas características se describen a continuación.



### 5.2.1 Caracterización de la colonia tipo 1

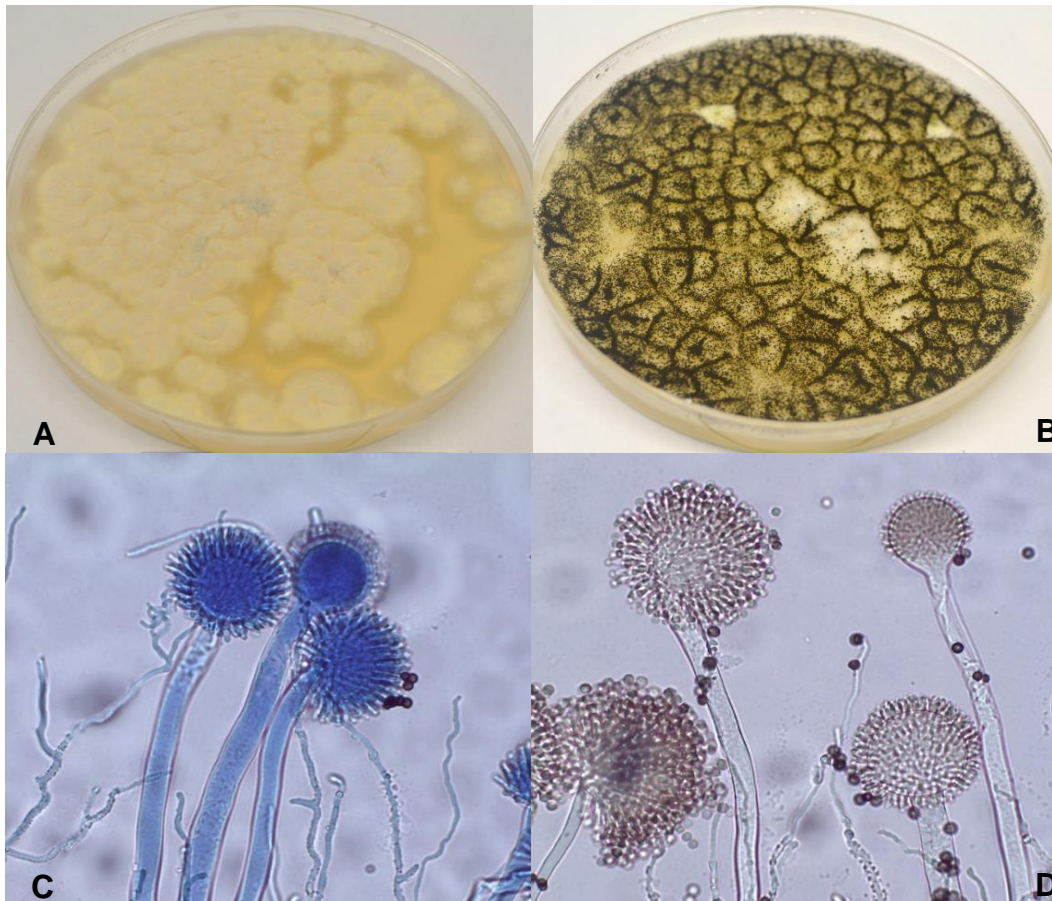
La colonia tipo 1 (Figura 5A), es de crecimiento rápido, cubrió toda la caja Petri en un periodo de 48 horas, la textura es algodonosa, inicialmente de color blanco, posteriormente adquirió una tonalidad grisácea. El reverso de la colonia presenta tonalidades amarillas, sin pigmentos. En la Figura 5B, se muestra un micelio hialino, esporangióforo ramificado con presencia de esporas globosas especializadas, denominadas esporangiolos, adheridas a una columela grande de superficie globular mediante dentículos, estas características son similares a las descritas por Alcorn y Yeager (1938), Pitt y Hocking (2009), Bonifaz (2012), Arenas (2014) y Bragulat *et al.* (2017) para describir al género *Cunninghamella*, el cual pertenece al orden Mucorales.



**Figura 5.-** Caracterización Macro y microscópica de la colonia aislada del género *Cunninghamella* sp. (A) Morfología macroscópica (B) Micelio cenocítico teñido con azul de lactofenol, observado a 40X.

### 5.2.2 Caracterización de la colonia tipo 2

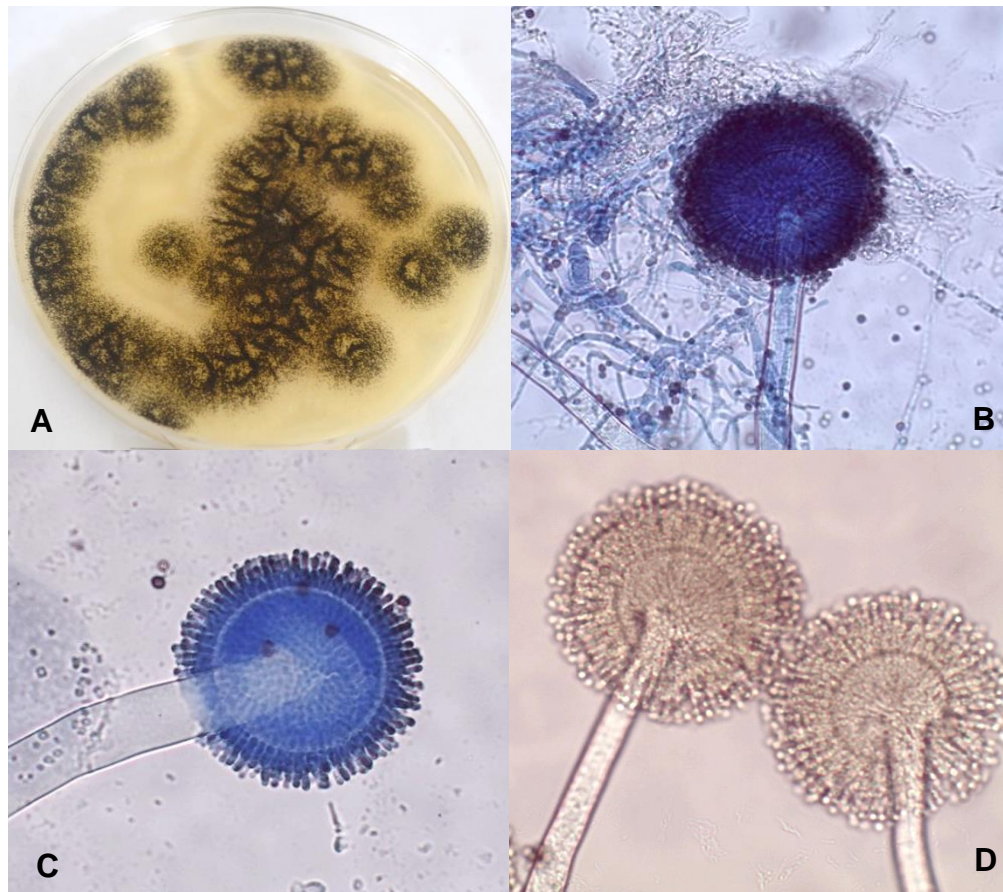
La colonia tipo 2 es plana, con crecimiento invasivo y un diámetro de 55 mm, con una textura de aspecto aterciopelado (Figura 6A), con una coloración blanco-amarillento, la cual se pigmenta de color negro (Figura 6B); el reverso de la colonia presenta surcos radiales. Las Figuras 6C y 6D, presentan conidióforos de paredes lisas y gruesas, micelio hialino y cenocítico con una vesícula semiesférica y biseriada con presencia de conidios, estas estructuras pertenecen al género *Aspergillus* según lo descrito por Barnett y Hunter (1987), Navi *et al.* (1999), Abarca (2000), Washington *et al.* (2008), Pitt y Hocking (2009) y Arenas (2014).



**Figura 6.-** Caracterización macro y microscópica de la colonia aislada del género *Aspergillus* sp. (A) Morfología inicial de la colonia. (B) Micelio pigmentado posterior a las 48 horas. (C) Conidióforos teñidos con lactofenol azul y (D) Conidióforos teñidos con lactofenol blanco observados a 40x.

### 5.2.3 Caracterización de la colonia tipo 3

La colonia tipo 3 se observa en la Figura 7A, la cual muestra una textura aterciopelada a flocosa, con coloración amarilla y pigmentación oscura, presentó surcos radiales en el anverso y reverso de la colonia, bordes irregulares y un halo claro. En las Figuras 7B, 7C y 7D se observa una cabeza aspergilar con conidióforo grueso, el micelio no presenta septos y es hialinos; una vesícula globosa y biseriada con conidios en disposición radiada. Todas estas características han sido descritas para hongos del género *Aspergillus* por Barnett y Hunter (1987), Navi *et al.* (1999), Abarca (2000), Washington *et al.* (2008), Pitt y Hocking (2009) y Arenas (2014).

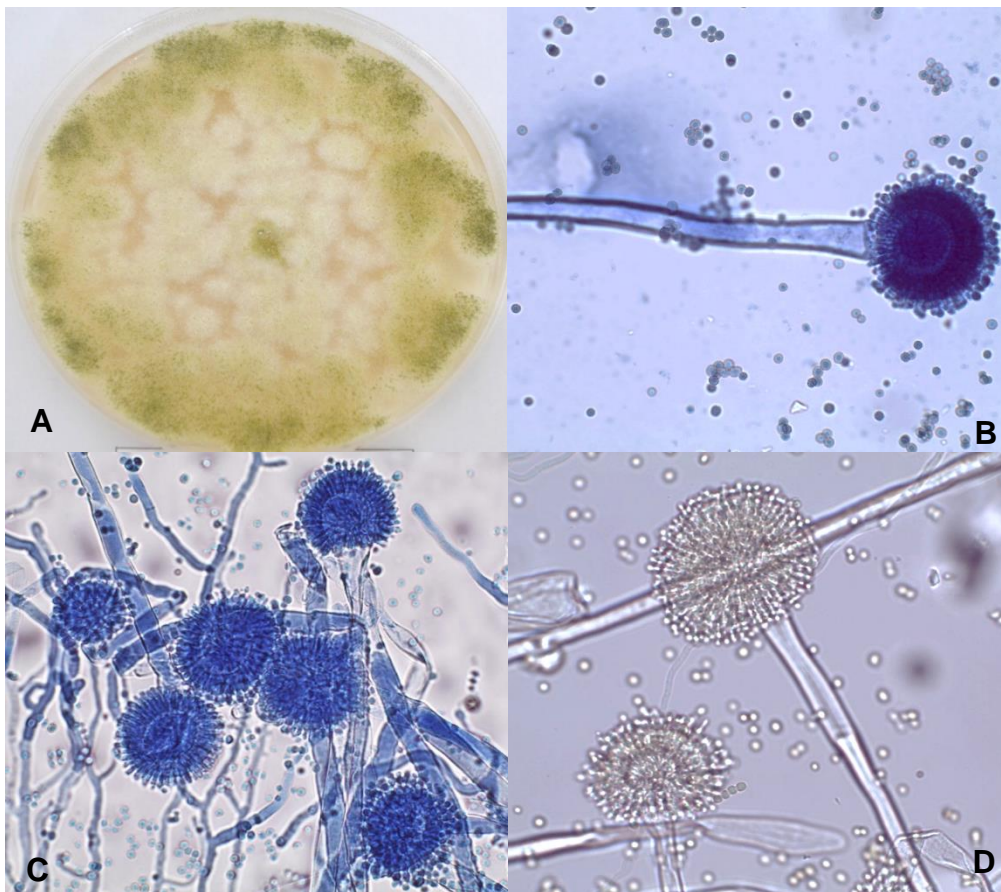


**Figura 7.-** (A) Colonia de *Aspergillus* spp., en agar Sabouraud, 72 horas, 37 °C. (B) y (C) Cabeza aspergilar teñida con lactofenol azul. (D) Conidióforos teñidos con lactofenol blanco observados a 40x.



#### 5.2.4 Caracterización de la colonia tipo 4

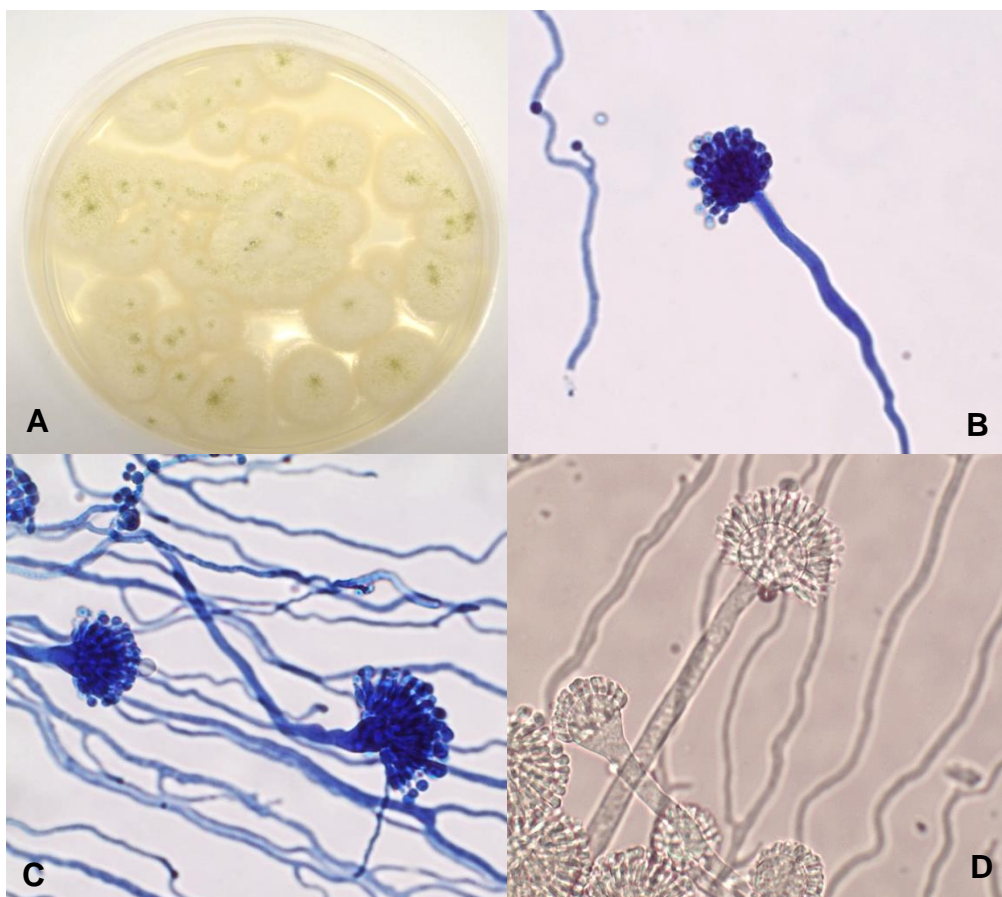
En la Figura 8A se observa la colonia 4, la cual presenta rápida proliferación siendo altamente invasiva, los bordes son irregulares con un halo claro; la textura es pulverulenta y granular; el color de la colonia es blanco con una pigmentación difusa de tonalidad verde, el reverso es liso y no presenta color. Dentro de las características microscópicas que se muestran en las Figuras 8B, 8C y 8D, se observa conidióforos lisos, hialinos e irregulares, una vesícula semiesférica y biseriada, fiálides y conidios dispuestos en toda la superficie, características descritas por autores como Barnett y Hunter (1987), Navi *et al.* (1999), Abarca (2000), Washington *et al.* (2008), Pitt y Hocking (2009) y Arenas (2014) para la identificación de hongos del género *Aspergillus*.



**Figura 8.-** Colonia de *Aspergillus* spp. (A)Características macroscópicas. (B) y (C) Conidióforos teñidos con azul de lactofenol. (D) Conidióforo teñido con lactofenol blanco observado a 40x.

### 5.2.5 Caracterización de la colonia tipo 5

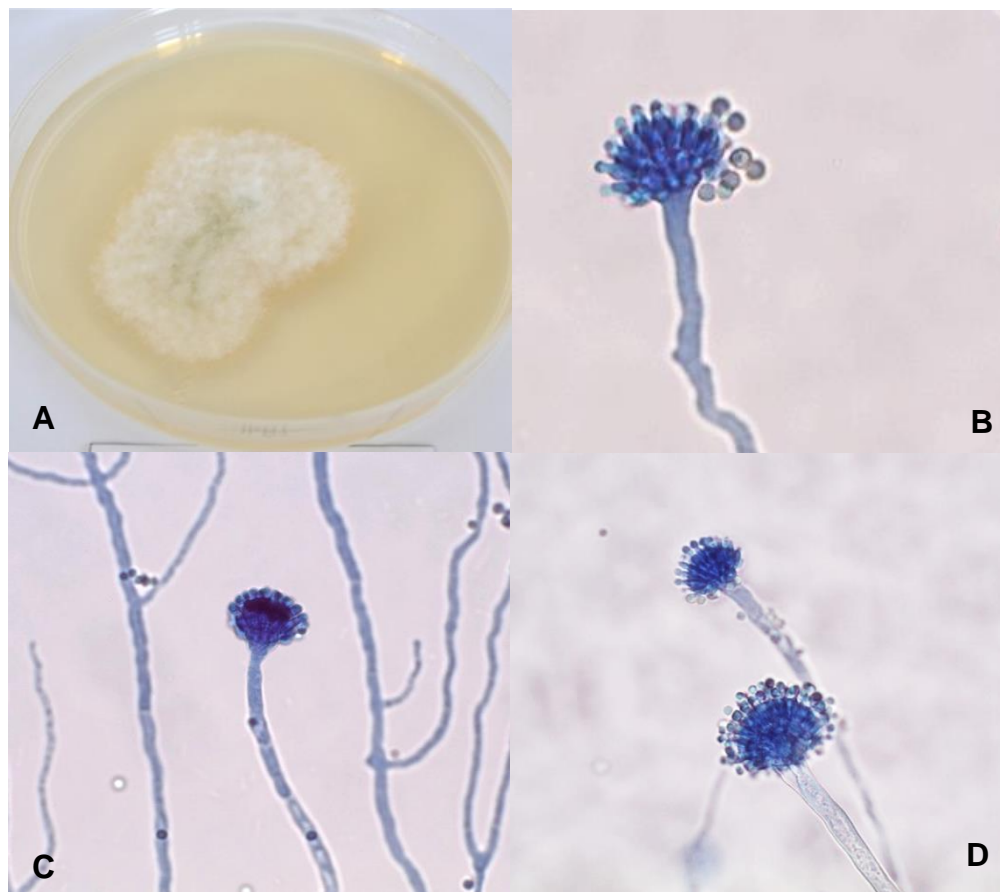
La colonia tipo 5 proliferó a las 48 horas de cultivo, en la Figura 9A, se muestra la textura de la colonia la cual es algodonosa, de forma y bordes irregulares; presenta un halo claro y un color blanco con una pigmentación verde, con un reverso liso y sin coloración. Para las Figuras 9B, 9C y 9D, se observó la presencia de conidióforos hialinos, ramificados y sin septos, una vesícula semiesférica uniseriada con fiáldes en disposición radiada sobre la mitad superior de la vesícula. Las características descritas son similares a diversos autores como Barnett y Hunter (1987), Navi *et al.* (1999), Abarca (2000), Washington *et al.* (2008), Pitt y Hocking (2009) y Arena (2014), para la descripción del género *Aspergillus*.



**Figura 9.-** (A) Colonia de *Aspergillus* spp. (B) y (C) Tejido micelial teñidos con azul de lactofenol. (D) Tejido micelial teñido con lactofenol blanco observados a 40x.

### 5.2.6 Caracterización de la colonia tipo 6

La colonia tipo 6 se describe en la Figura 10A, presenta bordes irregulares, halo claro, textura algodonosa y un color blanco con pigmentación verde; el reverso es amarillo con surcos radiales. Para las características microscópicas se observa un conidióforo de paredes hialinas, rugosas e irregulares, la cabeza es biseriada con una vesícula semi-esférica y conidios en disposición de cadenas como se muestra en la Figuras 10B, 10C y 10D. Esta descripción se contempla dentro del género *Aspergillus* al compararla con autores como Barnett y Hunter (1987), Navi *et al.* (1999), Abarca (2000), Washington *et al.* (2008), Pitt y Hocking (2009) y Arenas (2014). Dado que se presentan dudas con respecto a la caracterización de este hongo se envió a otra institución para un análisis molecular.



**Figura 10.-** Colonia de *Aspergillus* spp. (A) Características macroscópicas. (B), (C) y (D) Tejido micelial teñido con lactofenol azul, observados a 40x.

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron un total de 85 colonias, de las cuales para el Género *Aspergillus* se obtuvieron 59 colonias, para *Cunninghamella* se obtuvieron 6 colonias y 20 colonias no fueron identificadas. En la Tabla 13 se muestra la proliferación de 12 colonias para las muestras seleccionadas en los establecimientos 1, 3 y 7, seguidos por las muestras de los establecimientos 4 y 5 donde se observaron 11 colonias y por último las muestras de los establecimientos 2, 6 y 8 que mostraron 9 colonias.

**Tabla 13.** Frecuencia de colonias de hongos presentes en granos de maíz almacenados (número y porcentaje).

Establecimiento (Muestras)	Colonias de hongos						
	<i>Aspergillus</i> <i>sp.</i>	%	<i>Cunninghamella</i> <i>sp.</i>	%	NI*	%	UFC Total
1	10	83.3	0	0	2	16.6	12
2	8	88.8	0	0	1	11.1	9
3	6	50	5	41.6	1	8.3	12
4	8	72.7	0	0	3	27.2	11
5	10	90.9	0	0	1	9.09	11
6	6	66.6	1	11.1	2	22.2	9
7	5	41.6	0	0	7	58.3	12
8	6	66.6	0	0	3	33.3	9
Total	59	69.4	6	7.05	20	23.5	85

\*NI= No Identificado

Los resultados mostraron que el 100 % de las muestras presentaron contaminación por hongos, siendo estos, mayores a los resultados obtenidos por Hernández-Delgado *et al.*

(2007) quienes en un estudio similar obtuvieron un 71.7 % de la presencia de hongos en granos de maíz almacenados.

En los resultado el género *Aspergillus* presentó el mayor porcentaje (69 %) de contaminación en los granos de maíz, estos resultados son superiores a los obtenidos por Hernández-Delgado *et al.* (2007) quienes encontraron una incidencia del 40 % del género *Aspergillus* en un estudio realizado en granos de maíz almacenado en Tamaulipas, México. Sin embargo, coinciden con los resultados alcanzados por Soliman (2003), quien obtuvo una contaminación en los granos de maíz por el género *Aspergillus* del 70 %, 70 % y 60 %, en 3 provincias de Egipto, Daqahlia, Gharbia y Kafer el-sheikh, respectivamente. Por otra parte, Chauhan *et al.* (2016) también reportan la presencia del 75 % de este mismo hongo en granos de maíz, en la zona Gedeo, Etiopía. Esto pudo ser debido, a que este hongo representa un género que es ubicuo y que predomina en climas tropicales, cálidos y húmedos, además de que poseen la capacidad de proliferar en una gran cantidad de sustratos (Lazo y Sierra 2008; Castrillo *et al.*, 2013) siendo los granos de maíz muy propensos a la contaminación de hongos de este género (Karami-Osboo *et al.*, 2012). Además, el género *Aspergillus* es capaz de producir infecciones denominadas “aspergilosis” que afectan al ser humano, se presentan mediante cuadros clínicos como aspergilosis invasiva, aspergilosis crónico pulmonar y aspergilosis broncopulmonar alérgica (Valle *et al.*, 2010; Fortún *et al.*, 2012), aunado a esto es uno de los principales hongos micotoxigénicos, por lo tanto, su presencia en los granos de maíz debe ser motivo de alerta debido al riesgo que representa por su producción de aflatoxinas (Castrillo *et al.*, 2013).

*Cunninghamella spp.*, es un patógeno oportunista inusual, que pertenece al orden de los Mucorales y causa infección en pacientes inmunosuprimidos (Ferrara *et al.*, 2017), estas infecciones se denominan Murcomicosis, dentro de las manifestaciones más frecuentemente asociadas a ellos están las infecciones rinocerebral, pulmonar, gastrointestinal, cutánea y diseminada (Arias y Garzón, 2010). Las infecciones por *Cunninghamella* son infrecuentes per particularmente severas y asocian elevada mortalidad (González-Abad y Alonso, 2013). Para los resultados El género



*Cunninghamella* fue el que menor cantidad de colonias presentó en los granos de maíz, solo el 7 % de los aislamientos pertenecieron a este hongo; estos resultados son bajos comparados con los resultados reportados por Soliman (2003), quien obtuvo un porcentaje de frecuencia del 20 % para una especie de *cunninghamella* presente en granos de sorgo; Además otros autores como Franco *et al.* (2014), determinaron la presencia de *cunninghamella* en 4 de 21 muestras en granos de café y Agwanande *et al.* (2016), encontraron la presencia de *cunninghamella* en maíz.

Otro factor que influye en la contaminación de los granos de maíz almacenados por hongos son las condiciones de los establecimientos, donde los granos están expuestos a la intemperie en contenedores de plástico o de madera para su comercialización; estos recipientes no cuentan con tapas que protejan a los granos de agua de lluvia, del sol, del polvo, de las plagas y otros contaminantes ambientales; además, los granos que no se vierten en estos contenedores, son almacenados en costales apilados en el suelo, dentro de instalaciones con mala ventilación y en algunos casos en lugares sucios. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Hernández-Delgado *et al.* (2007). Por otra parte, Abedeta *et al.* (2018) quienes en estudios realizados señalan que las malas prácticas y estructuras de almacenamiento inadecuadas son sistemas tradicionales que promueven la proliferación de patógenos; en tales condiciones, los productos almacenados como el maíz son vulnerables a la contaminación por hongos. Así mismo, Arroyo-Manzanares *et al.* (2014) y Agwanande *et al.* (2016) mencionan que es importante tomar en cuenta las condiciones ambientales y que los requerimientos óptimos que necesitan los hongos para proliferar como son una temperatura de 20 a 40 °C y una humedad relativa de 70 - 90 %, debido a lo anterior, las condiciones climáticas en Tabasco son adecuadas para el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas en granos de maíz almacenados (Blancas, 2007; Carvajal, 2013; Arenas, 2014).

### 5.3 Cuantificación de aflatoxinas mediante HPLC-UV-VIS.

La cuantificación de las aflatoxinas se llevó a cabo en los extractos, como previamente se ha descrito en el apartado 4.3.1. La calibración se realizó empleando una curva de calibración preparada a partir de:

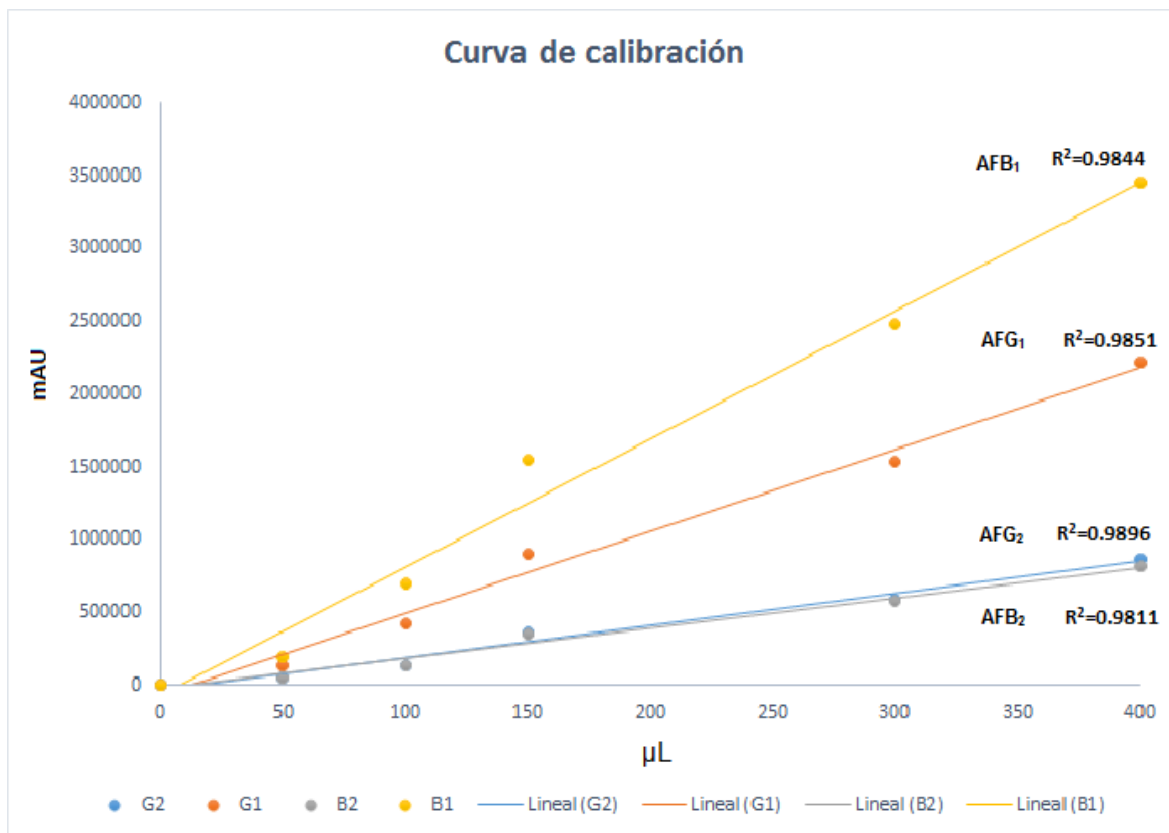
Para determinar la AFG<sub>2</sub> se utilizaron concentraciones de 0.037, 0.074, 0.111, 0.222 y 0.296 µg µL, donde se obtuvo la siguiente ecuación de regresión  $y = 3E+06x - 33703$ , donde  $y$ =área y  $x$ =cantidad de AFG<sub>2</sub>. La curva de calibración es lineal en el rango evaluado, y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9811.

Para la AFG<sub>1</sub> se utilizaron concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.6 y 0.8 µg µL, obteniéndose la siguiente ecuación de regresión  $y = 3E+06x - 63072$ , donde  $y$ =área y  $x$ = cantidad de AFG<sub>1</sub>. La curva de calibración es lineal en el rango evaluado, y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9896.

Para la AFB<sub>2</sub> se utilizaron concentraciones de 0.028, 0.056, 0.084, 0.168 y 0.224 µg µL, obteniéndose la siguiente ecuación de regresión  $y = 4E+6x - 22660$ , donde  $y$ =área y  $x$ = cantidad de AFB<sub>2</sub>. La curva de calibración es lineal en el rango evaluado, y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9851.

Para la AFB<sub>1</sub> se utilizaron concentraciones de 0.116, 0.232, 0.348, 0.696 y 0.928 µg µL, obteniéndose la siguiente ecuación de regresión  $y = 4E+06x - 69436$ , donde  $y$ =área y  $x$ = cantidad de AFB<sub>1</sub>. La curva de calibración es lineal en el rango evaluado, y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9844.

El volumen de inyección de la mezcla estándar diluida fue de 20 µL y se obtuvo una excelente linealidad para cada compuesto, todas con coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor a 0.98, como se observa en la Figura 11.



**Figura 11.-** La linealidad de las curvas de calibración (con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla estándar de aflatoxinas).

En este estudio se obtuvo la presencia de uno de los principales géneros de hongos productores de micotoxinas en muestras de maíz que se destinan al consumo humano, aunado a esto se encontraron concentraciones de 4 tipos de aflatoxinas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>).

En la Tabla 14, se observan los niveles de aflatoxinas para cada establecimiento evaluado. El 100 % de las muestras analizadas resultó positivo para al menos alguno de los 4 tipos de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>), con valores que oscilan entre una concentración mínima de 55.22  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y una máxima de 1 256.35  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , que varían dependiendo el tipo de aflatoxina, 2 de las muestras presentaron una contaminación sinérgica con los 4 tipos de aflatoxinas, presentando un riesgo mayor para la población, en otros casos no logró detectarse niveles de alguno de los 4 tipos de aflatoxinas.

**Tabla 14.** Concentración de 4 tipos de aflatoxinas ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en muestras de maíz de cárdenas, Tabasco.

Muestra	AFG <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFB <sub>1</sub>
1	143.83 $\pm$ 0.20	326.87 $\pm$ 0.46	55.22 $\pm$ 0.08	623.04 $\pm$ 0.88
2	384.90 $\pm$ 0.09	167.11 $\pm$ 0.01	1 256.35 $\pm$ 0.017	268.71 $\pm$ 0.04
3	ND*	ND*	104.52 $\pm$ 0.02	ND*
4	377.34 $\pm$ 0.13	355.84 $\pm$ 0.10	362.00 $\pm$ 0.10	ND*
5	311.57 $\pm$ 0.08	ND*	ND*	ND*
6	666.08 $\pm$ 0.08	215.73 $\pm$ 0.01	ND*	ND*
7	356.11 $\pm$ 0.12	ND*	333.51 $\pm$ 0.10	ND*

\* ND-NO DETECTADO

La AFB<sub>1</sub> se encontró en el 29 % de las muestras, las concentraciones detectadas fueron una mínima de 268.71  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la muestra 1 y una máxima de 623.04  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la muestra 2. A su vez la AFG<sub>2</sub> tuvo la mayor presencia, detectada en el 86 % de las muestras, con una concentración mínima de 143.83  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y una concentración máxima de 666.08  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para la muestra 3 no fue detectada. Del mismo modo se detectó la AFG<sub>1</sub> en el 57 %, la concentración más baja fue de 167.11  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en la muestra 2 y la muestra 4 presentó la concentración más elevada con 355  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , para las muestras 3,5 y 7 no se detectó esta aflatoxina. Por último, se determinaron los valores para la AFB<sub>2</sub> la cual presentó un porcentaje de contaminación del 71 % de las muestras, obteniéndose los valores más bajos 55.22  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en la muestra 1 y los valores más altos de 1 256.35  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para la muestra 2, esta aflatoxinas no fue detectada en las muestras 5 y 6. Estas concentraciones son comparables con los valores reportados por Warth *et al.* (2012) quienes reportaron en Burkina Faso, África, que el 50 % de sus muestras de maíz destinado a consumo humano presentaba contaminación por las aflatoxinas en diferentes concentraciones AFB<sub>1</sub> (3.4 - 636  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), AFG<sub>2</sub> (13.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), AFG<sub>1</sub> (12.3 - 56.8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), AFB<sub>2</sub> (7.4 - 46.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y en Mozambique reportaron valores para AFB<sub>1</sub> de 16.3 - 363  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , AFG<sub>2</sub> valores de 9.6-40.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , AFG<sub>1</sub> valores de 19.7-256  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y para AFB<sub>2</sub> concentraciones que oscilaban entre 6.9-31.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Las concentraciones encontradas en esta investigación para la aflatoxina B<sub>1</sub> fueron valores que oscilan entre 268.71 y 623.04 µg kg<sup>-1</sup>, estas concentraciones son menores a las reportadas por Pleadin *et al.* (2015) quienes reportaron una concentración máxima de 2072 µg kg<sup>-1</sup> en Croacia para muestras de maíz obtenidas en granjas.

En este estudio la AFG<sub>2</sub> fue la aflatoxina con mayor presencia, encontrándose hasta en un 86 % de las muestras, seguida de la AFB<sub>2</sub> que se encontró en el 71 %, la AFG<sub>1</sub> con un 57 % y por último la AFB<sub>1</sub> en un 29 %, con estos resultados encontramos que hay mayores concentraciones de las aflatoxinas que son menos peligrosas para los humanos de acuerdo a Carvajal (2013) quien ordena las AF acorde a su nivel de peligrosidad y toxicidad en el siguiente orden: AFB<sub>1</sub> > AFG<sub>1</sub> > AFB<sub>2</sub> > AFG<sub>2</sub>. La importancia de las aflatoxinas es principalmente su capacidad de bioacumulación en el cuerpo humano, debido a esto la exposición crónica a las aflatoxinas tiene repercusiones para la salud, afectando órganos como el hígado y el riñón, causando cáncer hepático y relacionándose con otros tipos de cáncer (Urrego y Díaz, 2006 y Carvajal, 2013). En México, sólo existen normativas para las aflatoxinas totales, sin embargo, no hay normas que sean específicas para cada aflatoxina, específicamente para la B<sub>1</sub> (Martínez *et al.*, 2013a), la cual es el hepatocarcinógeno más potente, se encuentra clasificada en el Grupo 1 como carcinógeno para los humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Pleadin *et al.*, 2015).

Para las concentraciones de aflatoxinas totales se realizó la suma de las concentraciones de los 4 tipos de aflatoxinas. En la Figura 12 se presentan las concentraciones de aflatoxinas totales para cada muestra, en la cual la muestra 2 presentó la mayor contaminación por aflatoxinas totales con una concentración de 2077.7 µg kg<sup>-1</sup> y el establecimiento 3 presentó una concentración mínima de 104.52 µg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 12.-** Concentración de aflatoxinas totales (suma de AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> y AFB<sub>1</sub>), en muestras de maíz destinado al consumo humano.

El tipo y la cantidad de micotoxinas producidas por una especie fúngica pueden variar de un año a otro y depende de la especie del hongo, de un mal manejo de los granos y de igual manera se asocia a de parámetros climáticos cómo el factor más crítico, la contaminación por aflatoxinas se presenta con mayor frecuencia en regiones cálidas, húmedas, tropicales y subtropicales (Karami-Osboo *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014; Pleadin *et al.*, 2015; Londoño-Cifuentes y Martínez-Miranda, 2017), todas estas condiciones son favorables en la entidad, cabe destacar que muestras con porcentajes relativamente bajos de hongos del género *Aspergillus* arrojaron resultados considerables de Aflatoxinas. En Tabasco no se cuenta con estudios previos sobre la incidencia de aflatoxinas presentes en maíz o algún otro grano, sin embargo, las concentraciones reportadas son altas comparadas con Mejía *et al.* (2014) quien reporta concentraciones de 1.0 y 1.2 µg kg<sup>-1</sup> de aflatoxinas, en muestras de maíz y que señalan al maíz como uno de los cereales más susceptibles a la contaminación por aflatoxinas

Todas las concentraciones obtenidas de las muestras de maíz se encuentran por encima de las normas NOM-247-SSA1-2008 y NOM-188-SSA1-2002, las cuales establecen como límite máximo permisible  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales para maíz. Debido a que estos granos se comercializan a diario en la entidad, autores como Martinez *et al.* (2014) y Zuki-Orozco *et al.* (2018) sugieren la necesidad de mantener informados tanto a consumidores como a los vendedores de estos granos, sobre los riesgos que conlleva el consumir alimentos contaminados con aflatoxinas, como son las enfermedades hepáticas y varios tipos de cáncer en México, ya que estas toxinas se han encontrado en algunos componentes de la dieta mexicana.

## 6. CONCLUSIONES

En las muestras de maíz se encontraron 85 colonias de hongos, los cuales se clasificaron en 7 tipos. A partir de la caracterización macro y microscópica se identificaron los hongos a nivel de género, encontrando 5 hongos pertenecientes al género *Aspergillus* y 1 un hongo del género *Cunninghamella*.

Se identificaron 4 tipos de aflatoxinas ( $AFB_1$ ,  $AFB_2$ ,  $AFG_1$  Y  $AFG_2$ ), presentes en los granos de maíz, siendo la  $AFB_2$  la que presentó la mayor concentración con  $1,256.35 \mu\text{g kg}^{-1}$ . El 100 % de las muestras superaron los límites máximos permisibles, establecidos por las NOM-247-SSA1-2008 y NOM-188-SSA1-2002 de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , para la suma de aflatoxinas totales, las concentraciones encontradas fluctuaron entre  $104.52 \mu\text{g kg}^{-1}$  y  $2077.07 \mu\text{g kg}^{-1}$ .



## **7. RECOMENDACIONES**

Estos resultados muestran, la importancia de conservar las condiciones de almacenamiento para evitar el desarrollo de hongos y a su vez la proliferación de aflatoxinas, de igual manera se deben mantener las condiciones asépticas dentro de los establecimientos que se dedican a la comercialización de los granos, así como contar con recipientes adecuados que garanticen la protección de estos contra plagas y fenómenos atmosféricos como la lluvia, el viento y el sol. Se requiere un monitoreo continuo sobre los granos de maíz y otros alimentos, por parte de las autoridades sanitarias, además, de aplicar las normas establecidas para regular las concentraciones de contaminación tomando en cuenta a las aflatoxinas y las interacciones de estas con otras micotoxinas por su acción sinérgica y sus efectos sobre la salud humana.

Aunado a esto es necesario capacitar a los expendedos y consumidores sobre los daños ocasionados por el consumo de granos contaminados con hongos y sus micotoxinas y los efectos secundarios que presentan en la salud humana y animal.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:79-84.
- Abbas, H., Accinelli, C., Zamblotowicz, R., Abel, C., Bruns, H., Dong, Y. and Shier, W. 2008. Dynamics of Mycotoxin and *Aspergillus flavus* Levels in Aging Bt and Non-Bt Corn Residues under Mississippi No-Till Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:7578-7585.
- Abedeta, G., Diriba, S., Ocho, F., and Hensel, O. 2018. Potential for mycotoxin-producing fungal growth in various agro-ecological settings and maize storage systems in southwestern Ethiopia. *Journal of Stored Products Research* 76:22-29.
- Accinelli, C., Abbas, H., Vicari and Shier, W. 2014. Aflatoxin contamination of corn under different agro-environmental conditions and biocontrol applications. *Crop Protection* 63:9-14.
- Aguilar, R. 2015. Los albores de la penicilina en México. Tzintzun. *Revista de estudios históricos* 62:242-270.
- Agwanande, W., Tatsadjieu, L., Jazet, P., Priya, P., Anie, M., Manilal, V., Krishnakumar, B., and Amvam, H. 2016. Isolation and Molecular Identification of Fungi in Stored Maize (*Zea mays* L) and Groundnuts (*Arachis hypogaea* L) in Ngaoundere, Cameroon. *American Journal of Microbiological Research* 4(3):85-89.
- Alcorn, G. and Yeager, C. 1938. A monograph of the Genus *Cunninghamella* with additional descriptions of common species. *Mycologia* 30(6):653-658.
- Algül, I. and Kara, D. 2014. Determination and chemometric evaluation of total Aflatoxin, Aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy Metals content in corn flours from Turkey. *Food Chemistry* 150:70-76.
- Arenas, R. 2014. *Micología Médica Ilustrada* (Quinta ed.). Editorial McGraw-Hill. México. 450 p.
- Arias, G. y Garzón, J. 2010. Zigomicosis. *Infectio* 14(2):181-192.
- Armijo, J., y Calder, J. 2009. Esquema de acciones para evitar, controlar y desinfectar productos de hongos y aflatoxinas. *Revista Peruana de Química E Ingeniería Química* 12(2):15-24.

- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J., Gámiz-García, L. y García-Campaña, A. 2014. Control de micotoxinas en alimentos. *BOLETÍN GRASEQA* 7:16-31.
- Arrúa, A., Moura, J. and Fernández, D. (2013). Aflatoxinas, un riesgo real. Reportes científicos de la FACEN 4(1):68-81
- ASERCA. 2012. Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2012: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p.
- Astoviza, M., y Suárez, M. 2005. Micotoxinas y cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 24(1):54–59.
- Balázs E. and James, S. 2007. The Mycotoxin Threat to Food Safety. *International Journal of Food Microbiology* 119:1-2.
- Baoua, I., Amadou, L., Bakoye, O., Abdoulaye, O., Baributsa, D. and Murdock, L. 2016. Maize quality in markets in four west African countries. *Journal of Stored Products Research* 69:26-30.
- Barnett, H. and Hunter, B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi (Fourth Edition). New York, Macmillan. 216 p.
- Blancas, M. 2007. Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15(1):180-184.
- Blankson, G. and Mill-Robertson, F. 2016. Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. *Food Control* 64:212-217.
- Bonifaz, A. 2012. Micología Médica Básica (Cuarta ed.). Editorial MC-GRAW HILL. México. 558 p.
- Bragulat, M., Castellá, G., Isidro-Ayza, M., Domingo, M. and Cabañes, F. 2017. Characterization and phylogenetic analysis of a *Cunninghamella bertholletiae* isolate from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Revista Iberoamericana de Micología* 34(4):189-252.
- Carvajal, M. 2013. Transformación de la aflatoxina B<sub>1</sub> de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB<sub>1</sub>-ADN. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas* 16(2):109-120.

- Castellari, C., Cendoya, Ma., Marcos, F., Barrera, V. y Pacin, A. 2015. Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays L.*) almacenados en silos bolsa en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 47(4):305-359.
- Castrillo, M., Horianski, M. y Jerke, G. 2013. Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* en la yerba mate comercializada en posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. *Revista Argentina de Microbiología* 45(2):110-113.
- CE. 2007. Comisión Europea. DO L 255. REGLAMENTO (CE) N° 1126/2007 DE LA COMISIÓN, de 28 de septiembre de 2007. Que modifica el reglamento (CE)n° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por los que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos de maíz. 14-17 p.
- CE. 2010. Comisión Europea. DO L 150. REGLAMENTO (EU) N° 165/2010 DE LA COMISION, de 26 de febrero de 2010. Que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. 8-12 p.
- CE. 2012. Comisión Europea. DO L 176. REGLAMENTO (UE) N°549/2012 DE LA COMISION, de 5 de julio de 2012. Por el que modifica el Reglamento (CE) n°1881/2006 de la Comisión, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, en lo que concierne a los contenidos máximos de los contaminantes ocratoxina A, PCBs no similares a las dioxinas y melanina en los productos alimenticios. 43-45 p.
- Chauhan, N., Washe, A., and Minota, T. 2016. Fungal infection and Aflatoxin contamination in maize collected from Gedeo zone, Ethiopia. *SpringerPlus* 5:753.
- CIMMYT. 2017. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Poscosecha para pequeños productores de maíz en México. *Revista Enlace* 41:1-64.
- Ediage, E., Hell, K., and Saeger, S. 2014. A comprehensive study to explore differences in mycotoxin patterns from agro-ecological regions through maize, peanut, and cassava products: a case study, Cameroon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(20):4789-4797.

- FAO/OMS. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Comisión Del Codex Alimentarius, Manual de Procedimiento. Roma, Vigécima tercera edición (23 era). 243 p.
- FAO/OMS. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. CAC/RCP 51-2003. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas. Codex Alimentarius. 15 p.
- FAO/OMS. 2018a. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Qué es el Codex. Codex Alimentarius. 5ta edición. FAO, Roma. 52 p.
- FAO/OMS. 2018b. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. CXS- 1993-1995, Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos. Codex Alimentarius. 75 p.
- Ferrara, G., Mercedes, M., Colmenares, L y Rodríguez-Adrián, L. 2017. Murcomicosis rinosinusal por *Cunninghamella bertholletiae* en un paciente con leucemia. A propósito de un caso. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 37(2):71-74.
- Flores, C., Hernández, L. y Vázquez J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimentos balanceados y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica Pecuaria en México* 44(2):247-256.
- Fortún, J., Meije, Y., Fresco, G. y Moreno, S. 2012. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30(4):201-208.
- Franco, H., Vega, A., Reyes, S., De León, J. y Bonilla, A. 2014. Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 64(1):42-49.
- García-Hernández, M. 2011. De la micología clásica a la moderna. *Medicina Universitaria* 13(53):171-226.
- Gavrilova, M., Slepchenko, E., Mikheeva, E and Derybina, V. 2014. Voltammetric determination of aflatoxin B1. *Procedia Chemistry* 10:114-119.
- Gómez, A. 2007. Alimentos y micotoxinas, implicaciones en la seguridad alimentaria. *Farmacia profesional* 21(8):49-53.
- González-Abad, M. y Alonso, M. 2013. Zigomicosis en niños: infección diseminada por *Cunninghamella bertholletiae*. *Archivos de Bronconeumología* 49(1):35-39.

- Guzmán, G. 2016. Las relaciones de los hongos sagrados con el hombre a través del tiempo. *Anales de antropología* 50:134-147.
- Hernández, C., Rodríguez, Y., Niño, Z. y Pérez, S. 2009. Efecto del almacenamiento de granos de maíz (*Zea mays*) sobre la calidad del aceite extraído. *Información Tecnológica* 20(4):21-30.
- Hernández-Delgado, S., Reyes-López, M., García-Olivares, J. y Mayek-Pérez, N. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25(2):127-133.
- IARC. 2015. Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Control de las micotoxinas en los países de ingresos bajos y medios. Informes de grupos de trabajo 9:56.
- INEGI. 2017. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Anuario estadístico y geográfico de Tabasco 2017. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. 440 p.
- Ismail, A. and Papenbrock, J. (2015). Mycotoxins: Producing Fungi and Mechanisms of Phytotoxicity. *Agriculture* 5:492-537.
- Juan, C., Ritieni, A., and Manes, J. 2012. Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 134(4):2389-2397.
- Karami-Osboo, R., Mirabolfathy, M., Kamran, R., Shetab-Boushehri, M., and Sarkari S. 2012. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control* 23(1):271-274.
- Kilonzo, R., Imungi, J., Muiro, W., Lamuka, P. and Njage, P. 2014. Household dietary exposure to aflatoxins from maize and maize products in Kenya. *Food Additives and Contaminants: Part. A* 31(12):2055-2062.
- Kralj, I. and Prosen, H. 2009. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10(1):62-115.
- Lazo, R. y Sierra, G. 2008. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:7-11.

- Lezcano, J., Martínez, B. y Alonso, O. 2015. Caracterización cultural y morfológica e identificación de especies de *Aspergillus* asociadas a semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y forrajes* 38(2):176-181.
- Londoño-Cifuentes, E. y Martínez-Miranda, M. 2017. Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Revista Biosalud* 16(1):53-66.
- Luján, M. 2014. Relaciones íntimas entre los microorganismos y el cáncer. *Revista Argentina de Microbiología* 46(3):173-174.
- Luna, M., Lozada, Y. y Trigos, Á. 2010. Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arábica*) almacenado. *Revista mexicana de micología* 32:63-68.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., y Clark, D. 2009. Brock Biología de los microorganismos (Duodécima ed.). Editorial PEARSON. España. 1256 p.
- Mantle, P. 2002. Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50(3-4):143-146.
- Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C. y Vázquez, G. 2013a. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2):126-146.
- Martínez, M., Vargas, L. y Gómez, V. 2013b. Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud* 12(2):89-109.
- Martinez, M., Castañares, E., Dinolfo, M., Pacheco, W., Moreno, M., y Stenglein, S. 2014. Presencia de *Fusarium Graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. *Microbiología* 46(1):41-44.
- Meer, H., Iram, S., Ahmad, I., Fateh, F. and Kazmi, M. 2013. Identification and characterization of post harvest fungal pathogens of mango from domestic markets of Punjab. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 4(4):650-658.
- Mejía, N., Alvarado, P. y Vázquez, N. 2014. Determinación de aflatoxinas en productos derivados de cereales de consumo humano en Mercados de Trujillo (Perú). *Revista REBIOLEST* 2(2):5-11.
- Méndez-Albores, A., y Moreno, M. 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Ciencia* 60(3):1-7.

- Méndez, G., Solorza, J., Velázquez, M., Gómez, N., Paredes, O., y Bello, L. 2005. Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia* 39(3):267-274.
- Mngadi, P., Goviden, R., and Odhav, B. 2008. Co-occurring mycotoxins in animal feeds. *African Journal of Biotechnology* 7(13):2239-2243.
- Molina, A. y Ruiz, C. 2009. Un caso de probable nefropatía endémica de los Balcanes. *Nefrología* 29(1):87-88.
- Moreno, M. y Alarcón, A. 2010. Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. *Revista Médica Clínica Las CONDES* 21(5):749-755.
- Navi, S., Bandyopadhyay, R., Hall, A., and Bramel-Cox, P. 1999. A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain. Information Bulletin no. 59 (In En. Summaries in En, Fr). Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 118 pp. ISBN 92-9066-416-9. Order code IBE 059.
- Orimí, J. 2001. Riesgos para la salud asociados a los alimentos. *Medicina Integral* 38(1):1-46.
- Palacio, A., Soledad, M. y Pontón, J. 2003. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Revista Iberoamericana de Micología* 20:90-98.
- Peralta, M., Cárdenas, M., Reyes, M., Molina, X., Aguirre, R., Peralta, R., Reyes, J. y Antúnez, G. 2017. Innovación tecnológica en la clasificación y almacenamiento de maíz: incidencia en la alimentación de animales. *Revista Electrónica de Veterinaria* 18(2):1-10.
- Pereira V., Fernandes J. and Cunha S. 2014. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Food Science and Technology* 36:96-136.
- Pitt, J. and Hocking, A. 2009. *Fungi and Food Spoilage* (Third Edition). Editorial Springer US. 519 p.
- Pleadin, J., Vulic, A., Persi, N., Skrivanko, M., Capek, B. and Cvetnic, Z. 2015. Annual and regional variations of Aflatoxin B1 levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control* 47:221-225.



- Requena, F., Saume, E. y León, A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* 23(4):393-410.
- Richard, J. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses- An overview. *International Journal of Food Microbiology* 119(1-2):3-10.
- Robledo-Marengo, M., Rojas-García, A., Medina-Díaz, I., Barrón-Vivanco, B., Romero-Bañuelos, C., Rodríguez-Cervantes, C., y Girón-Pérez, M. 2012. Micotoxinas en Nayarit, México: Estudio de casos. *Revista Bio Ciencias* 2(1):92–98.
- Rosas, I., Gil, A., Ramírez, B., Hernández, H., y Bellon, M. 2007. Calidad física y fisiológica de semilla de maíz criollo almacenada en silo metálico y con métodos tradicionales en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30(1):69-78.
- SAGARPA. 2017. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Maíz blanco y amarillo mexicano. México. 25 p.
- Sagüés, M., Purslow, P., Fernández, S., Fusé, L., Iglesias L. y Saumell, C. 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología* 28(4):143–147.
- Santibáñez, R., Hernández, M., Montañez, O., Tapia J., Martínez J., y Avellaneda J. 2011. Identificación y cuantificación de hongos micotoxigenicos en alimento para bovinos. *Ciencia y Tecnología* 4(1):19-23.
- Soliman, H. 2003. Mycoflora and Mycotoxins of Cereal Grains in Delta, Egypt. *Mycobiology* 31(4):183-190.
- Turner, P., Mendy, M., Whittle, H., Fortuin, M., Hall, A. and Wild, C. 2000. Hepatitis B infection and aflatoxin biomarker levels in Gambian children. *Trop Med Int Health* 5:837-841.
- Urrego, J. y Díaz, G. 2006. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina* 54(2):108-116.
- Valle, J., González-Barcala, F. Álvarez-Dobaño, J. y Valdés, L. 2010. La aspergilosis pulmonar invasiva en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Médica de Chile* 138(5):612-620.

- Vega, J. (2007). Química del Medio Ambiente (segunda ed.). Editorial ALFAOMEGA. México. 236 p.
- Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M. and Krska, R. 2012. Quantitation of Mycotoxins in Food and Feed from Burkina Faso and Mozambique Using a Modern LC-MS/MS Multitoxin Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(36):9352-9363.
- Washington, C., Stephen, D., William, M., Koneman, E, Gary, W., Paul C. y Gail, L. 2008. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color (6ta edición). Editorial PANAMERICANA. 1696 p.
- Williams, S., Baributsa, D. and Woloshuk, C. 2014. Assessing purdue improved crop storage (PICS) bags to mitigate fungal growth and aflatoxin contamination. *Journal of Stored Products Research* 59:190-196.
- Zuki-Orozco, B., Batres-Esquivel, L., Ortiz-Pérez, M., Juárez-Flores, B. and Díaz-Barriga, F. 2018. Aflatoxins Contamination in Maize Products from Rural Communities in San Luis Potosi, Mexico. *Annals of Global Health* 84(2):300-305.

## **PAGINAS CONSULTADAS DE LA WEB**

- ACSA. 2018a. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. El RASFF: Sistema de Alerta Rápida Para Alimentos y Piensos. Consultado el 03 de diciembre de 2018, disponible en: <http://acsa.gencat.cat/es/detall/article/EI-RASFF-Sistema-dalerta-rapida-per-a-aliments-i-pensos>.
- ACSA. 2018b. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Micotoxinas. Consultado el 07 de diciembre de 2018, disponible en: <http://acsa.gencat.cat/es/detall/article/Micotoxinas>.
- ASERCA. 2018. Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. Maíz grano cultivo representativo de México. Consultado el 07 de noviembre de 2018, disponible en: <https://www.gob.mx/aserca/es/articulos/maiz-grano-cultivo-representativo-de-mexico?idiom=es>.
- BD. 2013. Instrucción de uso-medios en placas listas para usar, BD Sabouraud Glucose Agar. Consultado el 15 de marzo de 2019, disponible en: [www.bd.com](http://www.bd.com).

- CONABIO. 2008. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Catálogo de autoridades taxonómicas de los hongos (Fungi) de México. Base de datos SNIB-CONABIO. México. Consultado el 15 marzo de 2018, disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/CAT.html>.
- CPG Sec. 510.150. 2005. Apple juice, Apple Juice Concentrates, and Apple Juice Products-Adulteration with Patulin. FDA. Consultado el 23 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/default.htm>.
- CPG Sec. 527.400. 2005. Whole Milk, Lowfat Milk, Skim Milk – Aflatoxin M1. Consultado el 23 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/default.htm>.
- CPG Sec. 555.400. 2005. Foods-Adulteration With Aflatoxin. Consultado el 23 de febrero 2019 disponible en: <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/default.htm>.
- CPG. Sec. 683.100. 1994. Action Levels for Aflatoxins in Animal Feeds. Consultado el 23 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/default.htm>.
- FAO. 2018. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Food safety and quality: Micotoxinas. Consultado el 20 de octubre de 2018, disponible en: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>.
- FDA. 2001. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds. Consultado el 10 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/default.htm>.

- FDA. 2010a. U.S. Food and Drug Administration. Chemical Contaminants, Metals, Natural Toxins and Pesticides Guidance Documents and Regulations. Consultado el 23 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/default.htm>.
- FDA. 2010b. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat products for Human Consumption and Grains and Grain By Products used for Animal Feed. Consultado el 23 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/default.htm>.
- FDA. 2019. Food and Drugs Administration. Chemical, Metals, Natural Toxins and Pesticides Guidance Documents and Regulations. Consultado el 10 de enero de 2019, disponible en: <https://www.fda.gov/food/guidance-documents-regulatory-information-topic-food-and-dietary-supplements/chemical-metals-natural-toxins-pesticides-guidance-documents-regulations>
- FIRA. 2016. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Panorama Agroalimentario, Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial, Maíz 2016. Consultado el 13 de marzo 2016, disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama\\_Agroalimentario](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario).
- INEGI. 2014. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) 2014. Información relevante. Boletín de prensa núm. 328/15. Consultado el 10 de agosto 2015, disponible en: <http://www.beta.inegi.org.mx/default.html>.
- NOM-184-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana. Productos y Servicios. Leche, Fórmula Láctea y Producto Lácteo Combinado. Especificaciones Sanitarias. DOF, 23 de octubre 2002. Consultado el 10 de enero de 2019, disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/184ssa12.html>.
- NOM-187-SSA1/SCFI-2002. Norma Oficial Mexicana. Productos y Servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones Sanitarias. Métodos de Prueba. DOF, 18 de agosto 2003. Consultado el 10 de enero de 2019, disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/187ssa1scfi02.html>.

- NOM-188-SSA1-2002. Norma Oficial Mexicana. Productos y Servicios. Control de Aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones Sanitarias. DOF, 15 de octubre 2002. Consultado el 10 de enero de 2019, disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>.
- NOM-247-SSA1-2008. Norma Oficial Mexicana. Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harina, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. DOF, 2 de junio de 2008. Consultado el 10 de enero de 2019, disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/NOMcereales\\_12434.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/NOMcereales_12434.pdf).
- OMS. 2018a. Organización Mundial de la Salud. Micotoxinas. Consultado el 18 de febrero de 2019, disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>.
- OMS. 2018b. Resumen sobre inocuidad de los alimentos. Consultado el 02 de febrero de 2019, disponible en [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/chemical-risks/gems-food/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/gems-food/en/).
- Paliwal R. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. FAO. Consultado el 12 de enero 2018, disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s00.htm#toc>.
- Secretaria de Salud. 2015. Documentos. Normas Oficiales Mexicanas. Consultado el 27 de febrero 2019, disponible en: <https://www.gob.mx/salud/en/documentos/normas-oficiales-mexicanas-9705>.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de siembras y cosechas, resumen nacional. Consultado el 15 de febrero de 2019, disponible en: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do).
- SMIA. 2018. Sistema mundial de información y alerta temprana. Resumen informativo por países. FAO. Consultado el 15 de enero de 2019, disponible en: <http://www.fao.org/giews/country-analysis/es/>.
- UE. 2019. Unión Europea. Seguridad alimentaria en la UE. Consultado el 19 de febrero de 2019, disponible en: [https://europa.eu/european-union/index\\_es](https://europa.eu/european-union/index_es).