

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

900
29.
RECIBIDA EN LA SECRETARIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
EL 20/01/74
RUBEN
KILBE

CONTENIDO DE MICOTOXINAS EN CEREALES PARA ALIMENTO
DE ANIMALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN MACOCO PEREZ

M E X I C O 1 9 7 4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis. que realiz_o la pasante MARIA DEL
CARMEN MACOCO PEREZ
con número de cuenta 8413134-8 con el título: CONTENIDO
DE MICOTOXINAS EN CEREALES PARA ALIMENTO DE ANIMALES.

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de
BIOLOGO

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

M. en C. RENE NEFTALI MARQUEZ MARQUEZ

Director de Tesis

DR. RENE CARDENAS VAZQUEZ

M.V.Z. MARIO JAVIER SORIANO BAUTISTA

BIOL. MARIA RAQUEL GONZALEZ AVALOS

Suplente

DRA. CLARA ESQUIVEL HUESCA

Suplente

[Firma]

[Firma]

[Firma]

[Firma]

[Firma]

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, bajo la Dirección del M. en C. René Nertali Márquez Márquez, a quien manifiesto mi más --- profundo agradecimiento por la gentil paciencia, dedicación y conducción que tuvo a bien brindarme durante la realiza--- ción de este trabajo.

Hago extensivo mi agradecimiento a las siguientes institu--- ciones:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPE--- CUARIAS.

Por todo lo que me dieron.

A MIS TIOS:

**ESTEBAN, FELIPE, ANTONIO Y VICTOR,
POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE
SIEMPRE ME HAN BRINDADO.**

A MIS PADRES: GUADALUPE Y GREGORIO

A MIS ABUELOS: CARLOTA Y GABRIEL

POR ENCAMINARME Y MOTIVARME

**A SEGUIR ESTUDIANDO, PERO PRINCIPALMENTE
POR LA GRAN CONFIANZA Y AMOR QUE SIEMPRE
ME HAN DADO.**

**"A MI JURADO, POR SU VALIOSA AYUDA Y COMENTARIOS
PERTINENTES".**

A MIS HERMANOS:

**HERNILA, MARTINA, IRMA, BETY,
DAVID Y CLAUDIA, POR SER UNO DE
MIS MOTIVOS DE SUPERACION Y PARTE
IMPORTANTE DE MI VIDA**

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	3
1.1. GENERALIDADES SOBRE MICOTOXINAS.....	3
1.2. OCRATOXINAS.....	7
1.2.1 ESPECIES PRODUCTORAS DE MICOTOXINAS.....	7
1.2.2 ALIMENTOS VECTORES DE LAS OCRATOXINAS.....	7
1.2.3 TOXICIDAD DE LAS OCRATOXINAS.....	9
1.2.4 EFECTOS BIOQUIMICOS DE LA OCRATOXINA A	12
1.2.5 QUIMICA DE LAS OCRATOXINAS.....	13
1.3 AFLATOXINAS.....	16
1.3.1 ESPECIES PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS.....	16
1.3.2 ALIMENTOS VECTORES DE LAS AFLATOXINAS	17
1.3.3 TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS.....	18
1.3.4 EFECTOS BIOQUIMICOS DE LAS AFLATOXINAS.....	21
1.3.5 QUIMICA DE LAS AFLATOXINAS.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL Y METODO.....	27
3.1 METODO DISCRIMINATORIO Y CUANTITATIVO PARA OCRATOXINA A.....	28
3.1.1 REACTIVOS.....	28
3.1.2 APARATOS.....	29
3.1.3 PROCEDIMIENTO.....	30
3.1.4 CUANTIFICACION.....	31
3.2 DETERMINACION DE AFLATOXINAS POR EL METODO DE MINICOLUMNA.....	32
3.2.1 REACTIVOS.....	32
3.2.2 APARATOS.....	32
3.2.3 PROCEDIMIENTO.....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	35
5. CONCLUSIONES.....	47
6. BIBLIOGRAFIA.....	48

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar el contenido de Ocratoxina (OA) y Aflatoxina B1 (AFB1) en un total de 100 muestras de maíz, sorgo, trigo y soya, las cuales se obtuvieron de algunos centros experimentales del Instituto de Investigación Forestal y Agropecuaria y distribuidores de granos como Almacenes Nacionales de Depósito, S. A., correspondientes a las cosechas de 1993 y con orígenes en diferentes estados de la República Mexicana como: Tamaulipas, Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Sinaloa, Querétaro, Guanajuato y Puebla.

En los resultados del análisis para OA se obtuvo que el 13 % de las muestras contenía OA en niveles que estuvieron entre 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo el promedio 21.15 \pm 12.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, niveles que no rebazaron los máximos permitidos.

De 8 estados que se tomaron en cuenta 6 tuvieron muestras con OA y 3 de los 4 cereales que se analizaron, presentaron esta micotoxina siendo el sorgo en el que se observa el mayor número de muestras contaminadas.

En el caso de AFB1 el 20 % de las muestras presentaron niveles de 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un promedio de 70 \pm 59.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 6 de los 8 estados presentaron esta micotoxina, siendo Tamaulipas el estado que mayor número de muestras positivas presenta (8/31), además de tener el nivel más alto.

Es evidente que en la mayoría de los estados y tipo de cereal que se tomaron en cuenta para el análisis se encuentran estas micotoxinas; por otro lado los escasos trabajos que sobre OA se encuentran en el país hace necesario abordar estudios donde se considere un estado, un tipo de cereal y un número considerable de muestras que permita evaluar la problemática para cada uno de ellos.

El hecho de encontrar niveles de DA y AFB1, especialmente si exceden los niveles máximos permitidos y son destinados al consumo inmediato o si son almacenados en condiciones inadecuadas de humedad y temperatura para ser posteriormente procesados y dados a consumo son un grave riesgo para la población animal y de manera directa o indirecta la población humana, lo que hace necesario pugnar por un sistema de vigilancia más estricto que permita evitar la contaminación de productos agrícolas por hongos y posterior producción de micotoxinas.

1. INTRODUCCION.

1.1 GENERALIDADES SOBRE MICOTOXINAS.

La palabra micotoxina deriva del griego mykes (hongo) y del latín toxicum (veneno) y es usado para designar a los metabolitos secundarios de una gran variedad de hongos, los cuales causan cambios patológicos o anormalidades fisiológicas en el hombre y animales. El término micotoxicosis ha sido definido como un síndrome de toxicidad resultante de la ingestión crónica de micotoxinas a través de alimentos contaminados (Uraguchi, 1967).

Las circunstancias en las cuales se sospecha de una micotoxicosis como posible causa de manifestaciones clínicas en animales son principalmente las siguientes: evidencia de actividad y crecimiento de organismos micóticos en el alimento, la no transmisibilidad de los desórdenes, nula respuesta a la terapia con antibióticos y presentación estacional (Goldblatt, 1972).

Los principales factores que propician el crecimiento de hongos productores de micotoxinas son: elevado contenido de agua, alta humedad relativa del medio, la elevada temperatura ambiente, la especificidad de determinados sustratos, los elementos que componen los alimentos como el contenido en grasas o en nitrógeno, la competencia entre distintos microorganismos (Derache, 1989).

Durante el almacenamiento, más que el sustrato químico, interviene el estado físico de los alimentos o la integridad de los granos favoreciendo el crecimiento de estos hongos macromicetas. Productos como las semillas, si están molidas, o incluso si han sido lesionadas previamente por insectos, podrán ser atacadas más rápidamente por hongos. Un producto poco compresible, de volumen relativamente grande, como el maíz o los cacahuates, deja un espacio intersticial importante y por lo tanto un volumen gaseoso rico en oxígeno que permite que los hongos se desarrollen más rápidamente que en el silo, donde los granos son menores como en el caso del trigo (Derache, 1989).

El hombre también forma una variable adicional a la presencia de hongos que producen micotoxinas ya sea influyendo con sus prácticas culturales o cultivando semillas susceptibles de contaminación.

Podemos clasificar los efectos tóxicos de las micotoxinas en tres categorías: mutagenicidad, teratogenicidad y cancerogenicidad. Por ejemplo la aflatoxina es cancerígena, mutágena y teratogénica. La patulina es un potente citotóxico mutagénico, no es teratogénica en las ratas pero sí se inyecta a un embrión de pollo sí lo es; sólo es cancerígena por vía subcutánea. En la interpretación de los resultados y de las consecuencias patológicas a largo término en intoxicaciones crónicas, es necesario ser prudente y crítico frente a los métodos experimentales empleados, a las cantidades de micotoxinas utilizadas, las condiciones de alimentación animal y también frente a las consecuencias del plan de aplicación tecnológica y de la contaminación.

El hígado, por razones anatómicas y fisiológicas, es simultáneamente el órgano blanco de las micotoxinas, como lo es para otro tipo de tóxicos.

Otros órganos y sistemas afectados generalmente por las micotoxinas son: riñón, sistema nervioso, glándulas endócrinas, efecto irritante sobre la piel y mucosas.

La nefrotoxicidad por las micotoxinas se da principalmente en el caso de aflatoxinas y ocratoxinas.

Las micotoxinas neuróticas y especialmente las micotoxinas del temblor (tremórgenas) actúan a bajas concentraciones, el efecto de una sola dosis dura desde algunas horas a varios días, ejemplo de estas son la paspalina y paxilina, sintetizadas por *Claviceps paspali* y *Penicillium paxali*.

Las micotoxinas con efectos endócrinos son principalmente la zearalenona o F-2, un metabolito sintetizado por varias cepas de *Fusarium*, como *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporium*, *F. moniliforme*.

Resulta especialmente difícil y complejo tratar de definir o atribuir una especificidad de producción de una determinada micotoxina a una especie fúngica dada. Es más frecuente encontrar inespecificidad de síntesis para una determinada especie que la producción de una micotoxina específica para cada especie, por otro lado para cada micotoxina la toxicidad puede ser muy variable, tanto en su efecto como en la dosis (Derache, 1989).

TABLE 1
LAS MICOTOXINAS Y SUS ORIGENES FUNGICOS

Micotoxinas	Mohos Responsables	Toxicidad
Aflatoxina B2, G1, G2, M1, M2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Mutágeno, teratogéno, cancerígeno, hepatotóxico y neurotóxico.
Acido Penicílico	<i>Penicillium pulverulum</i> <i>Penicillium cyclopium</i> <i>Penicillium suavolens</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus sulphureus</i>	Citotóxico
Ocratoxina A y B	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Teratógeno, hepatotóxico, nefrotóxico, neurotóxico.
Patulina	<i>Penicillium patulum</i> <i>Penicillium urticae</i> <i>Penicillium claviforme</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Penicillium clavatus</i>	Citotóxico
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Efectos endocrinos.
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus regulosus</i>	
T-2	<i>Fusarium trincitum</i>	
Rubratoxina	<i>Penicillium rubrum</i> <i>Penicillium purpurogenum</i>	
Luteoskirina	<i>Penicillium islandicum</i>	
Tricotecenos	<i>Fusarium devers</i> <i>Trichothecium roseum</i>	Citotóxico, irritante de las mucosas.
Cladosporina	<i>Cladosporium cladosporoides</i>	
Termógenos	<i>Penicillium patulans</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Neurotóxicos.

Tabla 1.- Relación de las micotoxinas de las especies que producen y su efecto tóxico. (Derache, 1989).

1.2 OCRATOXINAS.

Las ocratoxinas A, B, y C incluyen un grupo de metabolitos secundarios estructuralmente relacionados producidos por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. La amplia presencia de hongos productores de ocratoxinas, su capacidad para crecer en una gran variedad de alimentos y comestibles de importancia comercial y la ocurrencia natural de la ocratoxina constituye una amenaza tanto para animales como para la salud pública (Huff, 1975).

1.2.1 ESPECIES PRODUCTORAS DE OCRATOXINAS.

Las ocratoxinas son metabolitos de hongos que se aislaron y caracterizaron inicialmente de *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al*, 1975), y posteriormente por *Penicillium viridicatum* (Ciegler, 1972) y otras especies del grupo *Aspergillus ochraceus* (*A. melleus*, *A. quercinus* y *A. sulphureus*) (Lai *et al*, 1968), pero también es sintetizada por *P. variable*, *P. purpurencens*, *P. commune* y como posible productora *P. cycloptum* (Ciegler, 1972).

1.2.2 ALIMENTOS VECTORES DE OCRATOXINAS.

Los cereales constituyen, debido a la importancia de su cultivo, de sus condiciones de cosecha y de su aporte alimentario a nivel mundial, un vector extremadamente importante. También son un medio favorable para el crecimiento y la producción de ocratoxinas.

Hasta el momento han sido descritas tres ocratoxinas: A, B y C.

La ocratoxina producida por *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium viridicatum* ha sido encontrada en varios sustratos naturales, destacando entre ellos granos de maíz (Shotwell et al, 1969), trigo, avena, arroz, cacahuates, con concomitante producción de ácido penicílico y citrinina.

Tanto la ocratoxina A como la B han sido encontradas como contaminante natural de varios productos agrícolas entre ellos la cebada, avena, mijo, arroz, nueces y frijol (Bacon et al, 1973).

En México la importación de productos alimenticios es grande debido entre otras causas a la falta de producción agrícola. Sin embargo los grandes volúmenes requeridos deben forzosamente permanecer en la bodega industrial o simplemente en silos de almacén. La posibilidad de que las materias primas se contaminen por hongos tóxicos es grande, siendo las semillas oleaginosas importantes ingredientes en la formación de alimentos, la evaluación de los niveles de micotoxinas es necesaria. Se detectaron 10 µg/kg de ocratoxina A en almendra y nuez de muestras que fueron colectadas en dos fábricas de dulces y chocolates del Distrito Federal (Peña, 1972).

En países europeos como en Italia, la ocratoxina A es frecuentemente encontrada en alimentos para consumo humano como animal, la cual puede excretarse a través de la glándula mamaria y transmitirse a los lactantes, como lo demuestra un estudio hecho por Mico, 1972, en el que de 102 muestras de leche materna el 14 % contenía ocratoxina A con un valor máximo de 12 ng/ml.

Otros productos contaminados son: el cacao, en el cual durante el procesamiento de chocolate la ocratoxina es destruida (Mico, 1972). El huevo puede llegar a contener ocratoxina en caso de intoxicaciones experimentales (Derache, 1989).

1.2.3 TOXICIDAD DE LA OCRATOXINA A.

Se han atribuido nefropatías del cerdo en Dinamarca a la Ocratoxina A (Krogh, 1973). Después de la ingestión de los alimentos contaminados se detecta una nefropatía caracterizada por incremento intersticial y fibrosis periglomerular, túbulos proximales dilatados y glomérulo esclerótico (Krogh *et al*, 1974). La dosis letal de la ocratoxina varía de 2.1 a 4.6 mg/kg para el cerdo, el pollo o la trucha; en la rata la dosis es de 20 mg/kg (Derache, 1989).

En muchas especies el órgano blanco de la ocratoxina A parece ser el riñón, aunque el hígado es también afectado lo es en menor grado (Huff, 1975). El hígado de animales afectados puede mostrar una apariencia rojo canela, los riñones pueden ser notablemente aumentados (Ramados, 1973) (Turker, 1971).

En 1965 Van Merwe observó aguda toxicidad y muerte por alimento con niveles severos de ocratoxina en exceso de 100 mg a grupos de 8 patos. Presentaron aguda infiltración de lípidos en células parenquimatosas. Los lípidos se presentaron a lo largo de los lóbulos del hígado al tracto portal de la vena central.

Gallinas alimentadas con 1,2 y 4 mg/kg de ocratoxina presentaron retraso en la madurez sexual y disminución en la producción de huevo en los niveles más bajos de ocratoxina. Con incremento de los niveles de ocratoxina la producción de huevo fue aún más reducida y las pollas presentaron una emaciación muy marcada. La morbilidad y mortalidad fue severa por 2 y 4 mg/kg. Con 4 mg/kg las pollas que sobrevivieron no tuvieron huevos a lo largo de un año de edad (Choudhury, 1971).

Prior, 1977 señala que en gallinas ponedoras a las cuales se les ha administrado ocratoxina A a niveles tan bajos como 0.5 µg/kg causa disminución en la producción de huevo y consumo alimenticio, mientras que el peso de huevo y cuerpo disminuyeron solo a altas concentraciones.

El tiempo de protombina se ve aumetado y las proteínas en el suero disminuidas con 1 µg/kg durante seis semanas. Después de retirado el alimento contaminado con ocratoxina desapareció del músculo después de 24 hrs., persistiendo en hígado y riñon por más de 48 hrs. Ningún residuo fue encontrado en grasa o piel (Prior, 1977).

En pollos para asar de un día a tres semanas, el crecimiento fue inhibido con 2,4 y 8 µg/g, mientras los riñones aumentaron de tamaño a dosis de 1 µg/g. La función renal disminuye en un 15 y 31 % a dosis de 4 y 8 µg/g respectivamente. El ácido úrico se incrementa de 38 a 48 % sobre valores control a dosis de 4 y 8 µg/g, de los electrolitos del plasma sólo el K⁺ fue significativamente alterado a altas dosis. El examen histológico de riñon muestra edema y necrosis tubular moderada.

Cambios patológicos fueron observados en todos los niveles de dosis. Los datos demuestran que la ocratoxina A es una severa nefrotoxina en pollos (Huff, 1975).

Algunas otras alteraciones producidas por ocratoxina A en exámenes pos-mortem son: hemorragias en el proventrículo de aves, deshidratación y sequedad de las mucosas.

Un estudio realizado por Doupnik, 1970 mostró un extenso daño hepático consistiendo de cambios lipídicos o focos necróticos, supresión de actividad de la médula ósea y disminución de elementos linfoides en bazo y bolsa de fabricío. La severidad de cambios histopatológicos fue directamente relacionado con la concentración de ocratoxina A.

Se administraron 8 mg/kg de ocratoxina A a ratas preñadas provocando una ocratoxicosis aguda caracterizada por pérdida de peso, depresión, diarrea, piel arrugada, polidipsia y poliuria. Cuando la dosis fue de 4 mg/kg las ratas estaban deshidratadas aparentemente deprimidas y presentaron considerable pérdida de peso después de siete dosis de toxina. Aunque cuando de les administró una dosis diaria de 1 o 2 mg/kg tuvieron leve pérdida de peso en relación a las ratas control, no hay signos de toxicosis manifiesta, en lo que respecta a dosis menores de 0.25, 0.50 y 0.75 mg/kg, estuvieron en buena condición física cuando la dosis fue completada.

Fetos de ratas a las cuales se les administró 0.75 mg/kg fueron pequeños en relación con el control y el número promedio de fetos por camada fue significativamente disminuido administrando una dosis de 1 mg/kg. Ocratoxina A indujo varias anomalías esqueléticas en fetos de madres a las cuales se les dió pequeñas dosis en 6 días a lo largo de 15 días de gestación.

Alteraciones observadas en necropsia inducida incluyendo tamaño fetal pequeño, edema subcutáneo, hematoma múltiple, ojos cerrados hocico acortado y disminución del puente de la nariz.

Se ha encontrado que la ocratoxina A también es teratogénica en gatos y hamsters (Brown, 1976).

En los Balcanes, hace 20 años, se descubrió una nefropatía endémica que afectó a 20,000 personas, caracterizada por una degeneración hialina de los glomerulos, una destrucción del epitelio tubular y una fibrosis intersticial; esta nefritis era similar a la detectada en Dinamarca en cerdos que habían ingerido cereales altamente contaminados por la ocratoxina A; se dedujo a partir de esto, quizás un poco precipitadamente que la nefropatía humana de los Balcanes era originada por la ocratoxina de los alimentos (Derache, 1989).

En lo que respecta a rumiantes una investigación indica que la ocratoxina A es degradada por estos animales. La posibilidad que ha sido sugerida es que la ocratoxina A puede ser degradada por hidrólisis de la unión peptídica por una carboxipeptidasa formando ocratoxina α no tóxica y fenilalanina. Además de la observación de que la ocratoxicosis natural en rumiantes es rara (Hult, 1976).

1.2.4 EFECTOS BIOQUÍMICOS DE LA OCRATOXINA A

La ocratoxina A reduce el glucógeno e incrementa la glucosa en suero, acelera el proceso de glucogenólisis y metabolismo de precursores del glucógeno.

Con una dosis oral de 15 mg/kg de ocratoxina causa una marcada disminución de tamaño en ratas normales y adrenalectomizadas.

Se observó la inhibición de la succinato deshidrogenasa y otras enzimas en el Ciclo de Krebs en experimentos *in vitro* con ocratoxina A en varias especies a una concentración en el rango de 10^{-2} a 10^{-6} M.

La ocratoxina A inhibe completamente la respiración acoplada y reduce la proporción ADP/O₂ a una concentración de 4×10^{-4} M. Estudios en el efecto de ocratoxina ha revelado que esta micotoxina actúa como un inhibidor de tipo competitivo de proteínas acarreadoras en el transporte mitocondrial.

Alteraciones del metabolismo de lípidos por ocratoxina parecen ocurrir más fácilmente que los efectos en el metabolismo de los carbohidratos. El efecto más pronunciado es la acumulación de los lípidos en el hígado, este efecto es primariamente un resultado del daño al transporte de lípidos después que se incrementa la biosíntesis de lípidos (Hisieh, 1979).

La actividad metabólica de la toxina en un animal es influenciada por muchos factores incluyendo la individualidad biológica tal como especie, sexo, edad y condiciones de salud; el balance nutricional, el estado hormonal y una exposición anterior a toxinas o drogas. Estos factores podrían influir en la sensibilidad de un animal individual a los efectos metabólicos básicos de las micotoxinas (Carlton *et al.*, 1973).

La ocratoxina A no tiene efecto en la actividad del complemento o respuesta de anticuerpos, pero baja significativamente los niveles de γ -globulina en suero de conejillo de indias (Richard, 1974). Un notable efecto linfocítico en las placas de Peyer, amígdalas y otros nódulos linfáticos fue observado en cerdos cuando se les administró una dosis de 1 - 2 mg/kg de ocratoxina A diariamente (Krogh *et al.*, 1974).

Ocratoxina A administrada a ratas en una dosis de 60 μ g/kg de peso diariamente produce cambios significantes en la integridad de los lisosomas y membrana plasmática así como también la utilización de la glucosa es deteriorada (Pepelijnjak, 1992).

1.2.8 QUÍMICA DE LAS OCRATOXINAS

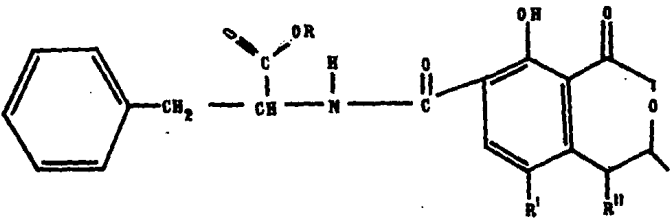
Las ocratoxinas (fig. 1) comprende un grupo de 7 metabolitos nefrotóxicos y hepatotóxicos estrechamente relacionados. La ocratoxina A es la más importante del grupo con respecto a la actividad biológica y ocurrencia natural.

La ocratoxina A contiene 7-carboxil-5-cloro-3,4-dihidroxi--3R-metil isocumarina y un enlace con una amida en el grupo 7-carboxil de la L-fenilalanina.

En 1967 Steyn y Holzappel confirmaron la estructura de la ocratoxina A por síntesis.

La obtención de formas diastereoisoméricas de ocratoxina A por repetidas preparaciones en sílica dió una pureza isomérica del 90 %.

Algunos estudios en los que se han investigado los requerimientos estructurales de la intoxicación concluyeron que el grupo hidroxil fenólico libre fue esencial para la intoxicación (Stoloff, 1977).



- R = H, R' = Cl, R'' = : OA
- R = R' R'' = H : OB
- R = Et, R' = Cl, R'' = H : OC(OA metil éster)
- R = Me, R'' = Cl, R' = H : OA metil éster
- R = Et, R' = R'' = H : OB etil éster
- R = Me, R' = R'' H : OB metil éster
- R = H, R' = Cl, = R'' = OH: 4-OR OA

ESTRUCTURA DE LAS OCRATOXINAS.

FIG. No. 1

1.3 AFLATOXINAS.

Distinguimos cuatro aflatoxinas que se encuentran naturalmente con mayor frecuencia, las cuales son: B1, B2, G1 y G2 son metabolitos extremadamente tóxicos y cancerogénicos producidos por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Otros miembros del grupo tales como M1, M2, P1, Q1 y aflatoxicol, son derivados de los cuatro anteriores como productos del metabolismo microbiano o de sistemas animales y otros metabolitos se producen espontáneamente en respuesta a las condiciones químicas, tales como B2a, G2a y D1 (Batt et al, 1980).

La aflatoxina es una de las más importantes micotoxinas conocidas ya que es un potente carcinógeno, lo cual ha sido demostrado en varios animales experimentales y su ocurrencia natural ha sido probada en varios alimentos (Uraguchi, 1967).

1.3.1 ESPECIES PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS.

A partir de 1969, en que la llamada "enfermedad X de los pavos" en Inglaterra, causó una elevada mortandad de los mismos y se descubrió que era originada por hongos del género *Aspergillus*, ha sido mayor cada día el interés por el estudio de los metabolitos secundarios, entre ellos la aflatoxina.

Con el nombre de aflatoxinas se ha denominado, como antes se mencionó a los productos metabólicos de algunos hongos, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* primeras especies reconocidas como productoras de aflatoxinas. Varios investigadores han estudiado la capacidad de otras especies de hongos productores de aflatoxinas, aunque quizá estudios confirmatorios sean requeridos; del género *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. ruber*, *A. wentii*, *A. ostianus*).

Otros hongos como el *Penicillium* (*P. citrium*, *P. frequentans*, *P. pulverulum*, *P. variabile*, *P. digitalium*, *P. expansum*, *Rhizopus sp.*) (Uraguchi, 1967).

1.3.2 ALIMENTOS VECTORES DE AFLATOXINAS.

Wlabeck Van en 1973 demostró que en las regiones tropicales húmedas donde las condiciones climáticas de temperatura y humedad son propicias para la invasión de alimentos por hongos, la contaminación por aflatoxinas presenta un problema agudo. Las aflatoxinas se han encontrado como contaminantes naturales en varios productos agrícolas como: yuca, maíz, harina de semillas de algodón, cacahuete, harina de maíz, frijol, arroz, sorgo y trigo (Borker et al, 1966).

Wogan, 1966, encontró en muestras de alimentos colectadas en varias partes del mundo, particularmente de africa y Asia, niveles de aflatoxinas en una gran variedad de productos agrícolas entre los cuales se mencionan la cebada, yuca, maíz, semillas de algodón, garbanzos, cacahuete, frijol, arroz, sorgo y trigo. En la India, en aceite de cacahuete no refinado se encontraron niveles de aflatoxina B1 que oscilaban entre 20 y 260 µg/kg, dependiendo del tiempo de almacenamiento del cacahuete antes de ser procesado. (Dwrakanatt et al, 1968).

En el tejido de los animales, la eliminación de aflatoxinas es rápida y la acumulación en las carnes es poco probable, sólo se detectan en pequeñas cantidades, en el límite de detección las carnes de embutidos. Es posible, sin embargo, las aflatoxinas en los huevos.

Las micotoxinas como la aflatoxina pasa a la leche y puede ocurrir que algunos residuos de semillas ricos en aflatoxinas determinen su presencia en la leche de ganado (Derache, 1989).

El maíz constituye alrededor de la mitad del total del volumen de alimentos consumidos anualmente en México (Torreblanca *et al*, 1987), además tiene el más alto consumo per capita y la forma en que principalmente se consume es como tortilla (Rodríguez, 1977).

También es importante puntualizar que las pérdidas de granos durante su almacenamiento por contaminación fúngica y sus metabolitos, llega a ser hasta del 30 % en México (Guarino, 1983)., constituyendo una seria amenaza para la salud del hombre y animales que llegaran a consumir dichos alimentos.

1.3.3 TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS.

Existen numerosos informes de aflatoxicosis en los animales, ocasionados por el consumo de los alimentos contaminados con estas micotoxinas (Prior, 1976).

La aflatoxina B1 es la que presenta más capacidad tóxica y carcinogénica, así mismo es la que con mayor frecuencia ocurre en la naturaleza (Cole y Cox, 1981).

La toxicidad en las aflatoxinas varía considerablemente, de acuerdo a la especie, edad, sexo y estado nutricional, siendo el hígado el órgano primariamente afectado (Qng, 1975).

Los signos clínicos son : retardo en el crecimiento y pérdida de peso, debido a la reducción en la ingesta de alimento y eficacia de su metabolismo, seguida de severo tenesmo pocos días antes de la muerte (Pier *et al*, 1970).

La aflatoxina B1 es muy tóxica para gran número de animales y vegetales. Para las algas, las bacterias, los hongos, las células en cultivo de los mamíferos, la toxicidad es del orden de 0.1 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En los mamíferos la toxicidad varía según las especies, la aflatoxina B1 es muy tóxica por vía oral para el conejo (DL50 0.3 mg/kg), para el andino (DL50 0.36 a 0.73 mg/kg), para la trucha (DL50 0.5 mg/kg); para la rata resulta menos tóxico (DL50 5.5 a 7.4 mg/kg). El perro es bastante sensible (DL50 1 mg/kg); el mono lo es menos (DL50 10 mg/kg) (Derache, 1987).

El examen postmortem puede mostrar infiltración grasa del hígado, fibrosis hepática, ascitis, edema visceral, proliferación de ductos biliares y carcinoma hepático. La capacidad de la aflatoxina B1 para inducir carcinoma hepático varía considerablemente con la especie (Cole y Cox, 1981).

Las dietas de maíz con 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas resultan genotóxicas, además de tener un efecto tóxico sobre el tejido eritropoyético de los ratones alimentados con dichas dietas (Márquez, 1989).

Además las aflatoxinas interfieren en los mecanismos de resistencia inmunitarios haciendo a los animales más susceptibles a las enfermedades. Esos efectos sobre la inmunidad y la resistencia son difíciles de reconocer porque los signos de las enfermedades están asociadas con la infección en vez de la aflatoxina que predispone al animal a la infección.

Es conocido que las aflatoxinas producen necrosis aguda, cirrosis y carcinoma del hígado en una gran variedad de especies animales, incluyendo primates no humanos. La variación de la respuesta de las especies a aflatoxina B1, está bien documentada al considerar la unión covalente a Ácidos nucleicos, metabolismo, acción mutagénica, actividad de letalidad bacteriana, transporte celular y distribución de lesiones hepáticas. Comúnmente se reconoce que las especies animales varían marcadamente en su susceptibilidad a la toxicidad crónica y aguda de aflatoxina B1 y el efecto tóxico puede ser influenciado por factores ambientales, también como el estado nutricional o fisiológico, edad sexo y pretratamiento xenobiótico (Pier *et al*, 1980).

El metabolismo juega un prominente papel en la determinación de la toxicidad de aflatoxina B1, requiere de activación metabólica para exaltar su reactividad, el efecto tóxico de la aflatoxina B1 puede ser modificado por la inducción o inhibición del sistema de la función mixta oxidasa. En general, las evidencias acumuladas se inclinan en favor de la hipótesis de que existen algunas vías metabólicas competitivas en el hepatocito, en el cual la toxicidad total es determinada por la separación de los metabolitos. La función de la mixta oxidasa a la fracción microsomal de homogenizado de hígado oxida a la AFB1 a AFQ1, AFM1, AFP1, AFB2a y el 2,3 Epóxido de AFB1, de estos AFQ1 y AFP1, se consideran productos detoxificados, mientras AFM1, aún es considerado tóxico y carcinogénico, AFB2a y Epóxido de AFB1 han sido considerados como las formas activas de AFB1, respectivamente responsables de la toxicidad aguda y del efecto carcinogénico, AFL H1 es producto de la acción combinada de oxidasas y reductasas y también se considera como producto detoxificado (Rodricks *et al*, 1977).

La capacidad de las diversas especies para reducir AFB_{2a} a AFL, está relacionado con la sensibilidad de las especies a la aflatoxicosis aguda y a la acción de la actividad reductiva y oxidativa medida como AFL/AFG₁ o AFL/metabolitos solubles, es un índice de la susceptibilidad de las especies al efecto carcinogénico de AFB₁ (Pier *et al*, 1980).

La conversión de AFB₁ a AFL se cataliza por la reductasa reversible en la fracción soluble de la preparación hepática de S - 10.

La reversibilidad de este paso enzimático ha permitido la teoría de que la AFL puede servir como un reservorio intracelular de AFB₁ y entonces pueda incrementar la acción tóxica de AFB₁ (Wogan, 1977).

1.3.4 EFECTOS BIOQUIMICOS DE LAS AFLATOXINAS.

Experimentalmente se ha demostrado que la AFB₁ requiere activación metabólica por el sistema de la función de la oxidasa mixta para formar la especie molecular activa que ha sido generalmente aceptada como 2,3-Epóxido AFB₁ (Wogan, 1977).

El epóxido electrofílico puede formar aductos con los nucleófilos celulares, tales como ácidos nucleicos y proteínas y ocasionar que estas macromoléculas sean funcionalmente inactivas. La formación de estos aductos representa la lesión bioquímica primaria producida por las aflatoxinas. La unión sobre proteínas funcionales podría provocar reducción de la actividad enzimática.

El epóxido de aflatoxina se conjuga fácilmente con el sulfhidrilo contenido en compuestos tales como la glutatión reductasa. Una vez conjugado la toxina se inactiva (Pier *et al*, 1977).

El efecto de las aflatoxinas sobre el metabolismo de carbohidratos, se indica generalmente como una reducción del glucógeno hepático y del incremento de los niveles de glucosa sanguínea en animales expuestos, y es atribuido a la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado, o el incremento de la glucogenólisis y metabolismo de los precursores del glucógeno (Pier *et al*, 1977).

Se encontró que la aflatoxina B1 disminuye la actividad de varias enzimas de la gluconeogénesis en pollos de un día de edad, incluyendo la UDP-glucosa-glucógeno transglucosidasa, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfatasa, a una dosis intraperitoneal de 2.7 mg AFB1/kg, incrementándose la actividad de la hexosa monofosfatasa deshidrogenasa, lo que causa la disminución de los precursores del glucógeno.

Además las aflatoxinas inducen una depresión del glucógeno debido a una falla en la síntesis enzimática (Pier *et al*, 1980).

En la función mitocondrial por su posible asociación con los efectos de la toxicidad aguda de las aflatoxinas, se encontró que estas inhiben ciertas enzimas del ciclo de Krebs, específicamente la AFB1 inhibe a la succinato deshidrogenasa, resultando una reducción de los sustratos para la fosforilación, también interfieren en el transporte electrónico mitocondrial, desacoplando la fosforilación oxidativa en el paso entre el citocromo b y el c, por otro lado altera también la actividad de la adenosín trifosfatasa. El efecto se manifiesta por una reducción del consumo de oxígeno en la relación ADP/O₂.

Las alteraciones sobre el metabolismo de lípidos parece ocurrir más fácilmente que sobre el metabolismo de carbohidratos. El efecto más evidente es la acumulación de lípidos en el hígado ocasionado por una falla en el transporte en vez de un incremento en su biosíntesis (Hsieh, 1979).

La aflatoxina B₁, puede reaccionar con el ADN, o específicamente inhibe la RNA polimerasa interfiriendo la transcripción. También incrementa la velocidad de fraccionamiento de RNA debido, a la alteración de la membrana lisosomal que resulta en la liberación de ribonucleasa de los lisosomas o por la estimulación de la actividad de la RNA-trasmetilasa que provoca un aumento en la alquilación (Hsieh, 1979).

1.3.5 QUIMICA DE LAS AFLATOXINAS.

Desde 1960 se logró la caracterización de cuatro compuestos químicos interrelacionados a los que se llamó de manera genérica aflatoxinas. Estos fueron después designados B₁, B₂, G₁, G₂ debido a sus colores fluorescentes B(blue) y G(green), y los subíndices 1 y 2 para cada molécula química relativa a la movilidad cromatográfica. Las primeras conjeturas de las estructuras químicas basadas en su composición y grupo de reacciones fueron remarcadamente claras para asignamientos inequívocos de estructura basados en características espectrales (estructuras I - IV).

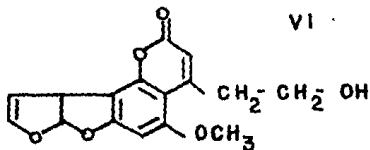
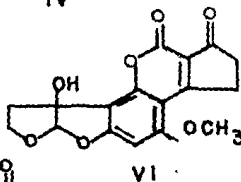
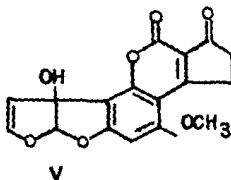
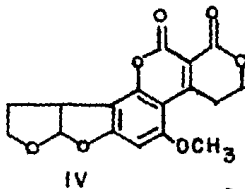
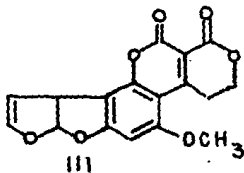
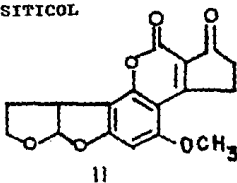
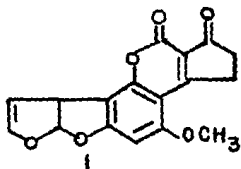
Las aflatoxinas M₁ y M₂ son derivados hidroxilados que se encontraron en la leche de vacas alimentadas con raciones que contenían B₁ y B₂ (estructuras V y VI).

Muchos estudios metabólicos de mamíferos se han concentrado en aflatoxina B₁, ya que es el más potente y más comunmente producido por hongos. De estos estudios resultó la identificación de otros metabolitos (estructuras VII, X-XIII), aflatoxina P₁ y aflatoxina Q₁.

) LAS AFLATOXINAS(

ESTRUCTURAS DE LAS AFLATOXINAS

- I.- AFLATOXINA B1
- II.- AFLATOXINA B2
- III.- AFLATOXINA G1
- IV.- AFLATOXINA G2
- V.- AFLATOXINA M1
- VI.- AFLATOXINA M2
- VII.- PARASITICOL



VII

Entre las propiedades de las aflatoxinas destaca su gran termorresistencia. Todas las aflatoxinas exhiben intensa fluorescencia cuando son excitadas con radiación ultravioleta. Las reacciones de las aflatoxinas deriva de la insaturación de la molécula de furano, y de la estructura de la lactona. Los primeros estudios y la creación de métodos para la protección de personal de laboratorio, demostró la sensibilidad de las aflatoxinas a los agentes oxidantes alcalinos tales como hipoclorito de sodio.

El ácido fenólico expone la apertura de la lactona, es particularmente reactivo como fue evidenciado en estudios de mecanismos de detoxificación con amonio. La reacción de adición de alcoholes en medio ácido con el vinil eter de la molécula de difurano es tipificada por la formación de aductos acuosos (Aflatoxina B2a) (Stoloff, 1979).

2. OBJETIVO.

- 1).- Cuantificar la concentración de Aflatoxina B1 y Ocratoxina A de cereales colectados de diferentes Estados de la República Mexicana.

3. MATERIAL Y METODO

Las 100 muestras que se utilizaron para el presente trabajo se obtuvieron de algunos centros experimentales del Instituto Nacional de Investigación Forestal y Agropecuaria y de distribuidores de granos como ANDSA, correspondientes a la cosecha de 1993, los cereales investigados son: sorgo, maíz, trigo y soya.

La determinación de ocratoxina A se realizó con el método de Valente y Rodríguez-Amaya (García, 1989); aflatoxina B₁ fue cuantificada tomando en cuenta la técnica de Tejada (Tejada, 1983)

Las muestras fueron enviadas de las fuentes antes mencionadas siguiendo el procedimiento que a continuación se menciona:

Dependiendo de la magnitud de lotes y remesas de granos que se muestrean con fines de valoración de calidad las muestras extraídas pueden ser calificadas como: muestra primaria, muestra compuesta o muestra representativa.

Muestra primaria.- Cantidad de granos que se extrae en un momento dado y en una única posición o punto de muestreo de un lote en el interior de una bodega.

Muestra compuesta.- Muestra global o total o la cantidad de granos que se obtiene reuniendo y mezclando las muestras primarias extraídas de un lote para formar una muestra que corresponda a una situación.

Muestra representativa.- Cantidad de granos que se obtiene por reducción de la muestra compuesta y que representa en sí el todo de un lote.

La muestra representativa debió tener un peso mínimo de 2 Kg para permitir se realicen las distintas determinaciones que se requieran; debió manejarse con sumo cuidado para evitar que el producto se derramara y debió protegerse de cualquier omisión descuido o sustitución, así mismo se evitó que pasara un tiempo prolongado entre la obtención de la muestra y su análisis para prevenir alteraciones que modifiquen su condición o composición.

Para contener las muestras que se se obtuvieron durante el muestreo se utilizaron bolsas resistentes de material plástico transparente, para asegurar la hermeticidad del recipiente y prevenir cambios de humedad en los granos de la muestra.

Las bolsas tuvieron una capacidad suficiente para guardar por lo menos 2.5 kg y tener espacio libre para cerrarse y sellarse con una liga elástica.

3.1 METODO DISCRIMINATORIO Y CUANTITATIVO PARA OCRATOXINA A

3.1.1 REACTIVOS

A.-Disolventes grado analítico: Metanol, cloroformo, benceno, tolueno, acetato de etilo, ácido acético y ácido fórmico.

B.-Solución acuosa de cloruro de potasio al 40 %. Disolver 40 g de KCl en agua destilada, celentar un poco y diluir a un litro.

C.-Solución clarificadora de sulfato de amonio al 30 %. Disolver 30 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en agua destilada, calentar un poco y diluir a un litro

D.-Alúmina neutra para columna cromatográfica de 100-200 mallas (Merck No. 1077).

E.-Placas de cromatografía 20 X 20 sílica gel 60, 0.25 mm de espesor. Activar las placas antes de usarlas a 110^o C durante una hora.

F.-Solventes de desarrollo: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (5+4+1). Tolueno/acetato de etilo/ácido acético (50+49+1).

G.-Gel sílice, Sílica gel 60, 70-230 mallas (Merck No. 7734).

H.-Sulfato de calcio anhidro, 20-40 mallas, preparado de sulfato de calcio anhidro en polvo.

3.1.2 APARATOS.

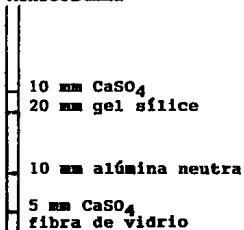
A.-Licuadora doméstica con vaso de vidrio y tapa.

B.-Gabinete para observación equipado con lámpara de luz ultravioleta CAMAG, longitud de onda de 366 nm.

C.-Las columnas se observan en un gabinete en un cuarto oscuro.

D.-Columnas. Las columnas se hicieron con tubo de vidrio de 8 mm de diámetro externo, longitud 200 mm con un cuello de 60 mm, después adelgazar uno de los extremos a aproximadamente 4 mm de diámetro externo. Se empacaron las columnas con un tapón de fibra de vidrio, 5 mm de CaSO₄, 10 mm de alúmina neutra, 20 mm de gel sílice 10 de CaSO₄ (Figura No. 3). Se secaron una hora a 100^o C y se mantuvieron en el desecador.

Minicolumna



agregar 2 ml extracto de cloroformo de la primera extracción y dejar drenar hasta el tope de CaSO₄

agregar 4 ml de tolueno/acetato de etilo/ácido acético (50+49+1).

FIG. No. 3

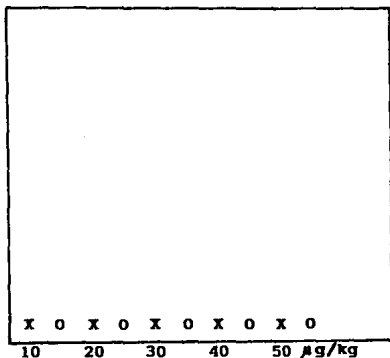
3.1.3 PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se pesaron 50 g de muestra y se colocaron en un vaso de licuadora, se adicionaron 270 ml de metanol y 30 ml de solución acuosa de KCl al 40 %.
- 2.- Se licuó durante 5 min. a velocidad baja.
- 3.- Se filtró a través de un embudo de vidrio con papel preplizado (Whatman No. 4) y se colectó en una probeta de 150 ml.
- 4.- Se transfirieron los 150 ml del extracto a un vaso de precipitados de 600 ml, y se agregaron 150 ml de clarificadora (NH₄)₂SO₄ o acetato de zinc en el caso de que la muestra fuera sorgo y 50 ml de tierra de diatomeas (medido en un vaso de precipitados de 50 ml).
- 5.- Se mezclaron con agitador de vidrio y se filtró como en el paso 3.
- 6.- Se transfirieron 150 ml del extracto en un embudo de separación de 1000 ml y se agregaron 150 ml de agua destilada.
- 7.- La extracción se hizo con 2 X 10 ml de cloroformo en dos porciones independientes.
- 8.- Se agregaron 2 ml de extracto de cloroformo a la primera extracción y se dejó drenar hasta el tope de CaSO₄.
- 9.- Se agregaron 4 ml de tolueno/acetato de etilo/ácido acético (50+49+1).
- 10.- Las columnas se examinaron bajo luz ultravioleta de onda larga. La presencia de ocratoxina se evidencia en la interfase gel sílice/alúmina en una banda azul fluorescente.

3.1.4 CUANTIFICACION.

- 1.- Se combinaron 3 ml de cada uno de los extractos de cloroformo.
- 2.- Se evaporaron casi a sequedad en baño de vapor a 80° C.
- 3.- Se redisolvió el residuo en 200 µl de benceno.
- 4.- Se colocó el vial en baño ultrasónico por 30 seg.
- 5.- Se hicieron manchas en las placas de cromatografía (Figura No. 4). Usando extracto y estándar.
- 6.- El desarrollo de la placa se hizo en un tanque no equilibrado con solvente de desarrollo tolueno/acetato de etilo/Ácido fórmico (5+4+1), colocando diferentes cantidades de soluciones estandar, contra los cuales se compararía la muestra, después desarrollar la placa, para cuantificar la toxina de la muestra.

PLACA CROMATOGRAFICA



X ESTANDAR OCRATOXINA A

O MUESTRA

FIG. No. 4

3.2 DETERMINACION DE AFLATOXINA POR EL METODO DE MINICOLUMNA

3.2.1 REACTIVOS.

A.-Disolventes grado reactivo: Metanol, benceno, cloroformo, acetonitrilo, 2-Propanol.

B.-Disolvente de extracción: Metanol al 60 % en agua V/V.

C.-Disolvente de desarrollo: $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CN-2 Propanol (93+5+2)}$.

D.-Solución de acetato de plomo al 20 %. Disolver 200 g de acetato de plomo neutro $3\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, calentar un poco en baño , agregar 3 ml de ácido acético y diluir a un litro.

E.-Alúmina acídica para columna cromatográfica de 80-200 mallas (merck No. 1078). Ajustar la alúmina a actividad II adicionando 3 % de agua, agitar bien y equilibrar toda la noche.

F.-Algodón absorbente. Agitar en cloroformo caliente, exprimir y secar al aire.

G.-Ayuda filtro o tierra de diatomeas.

H.-Silica gel para columnas cromatográficas de 0.063 - 0.2 mm (Merck No. 1754). Secar a 110°C durante 2 horas y almacenar en un desecador.

3.2.2 APARATOS.

A.-Licuadora doméstica con vaso de vidrio con tapa.

B.-Gabinete para observación equipado con lámpara de luz ultravioleta de banda larga.

Las columnas se observan en un cuarto oscuro.

C.-Minicolumnas. Las minicolumnas se hicieron con un tubo de vidrio de aproximadamente 15 cm de largo, 6 mm de diámetro externo y 4 mm de diámetro interno. Para empacar las columnas se tapa uno de los extremos con un pedacito de algodón bien apretado. Se agregó 1 cm de alúmina acidica, 1 cm de Na_2SO_4 anhidro, 9 cm de silica gel y otro tapón de algodón, almacenarlas sobre un desecador sobre P_2O_5 .

3.2.3 PROCEDIMIENTO.

- 1.- Se pesaron 50 g de muestra y se colocaron en un vaso de licuadora adicionando 150 ml de disolvente de extracción, 10 g de ayuda filtro, mezclado en la licuadora por 3 min.
- 2.- Se filtró a través de papel filtro (Whatman No.4). Se recogieron 50 ml del filtrado.
- 3.- En un vaso de precipitado de 250 ml se pusieron los 50 ml del filtrado, 20 ml de acetato de plomo al 20 % y 150 ml de agua destilada se dejó reposar durante 3 min. para permitir la floculación o precipitación.
- 4.- En un embudo de separación de 125 ml se transvasaron 100 ml del filtrado anterior y se agregaron 3 ml de benceno, se agitó vigorosamente durante un minuto. Cuando se separaron las fases, se drenó y se separó la fase inferior acuosa.
- 5.- Se lavó la fase bencénica con 50 ml de agua destilada invirtiendo el embudo suavemente durante 10 veces para impedir emulsiones. Se drenó y se descartó la fase acuosa, se transfirió la fase bencénica en un frasco pequeño de 6-8 ml. Se adicionó una pizca de sulfato de sodio anhidro y se agitó para eliminar cualquier residuo de agua. El extracto bencénico debe ser claro.

- 6.- Se metió la columna dentro del extracto bencénico, permitiendo que el disolvente ascendiera hasta 1 cm arriba de la capa de alúmina. Se secó la columna por fuera e inmediatamente se puso dentro de un tubo de ensaye que tuviera aproximadamente 5 ml de disolvente desarrollador (CHCl_3 - CH_3CN -2 Propanol). Se dejó desarrollar la columna en dirección ascendente.
- 7.- Se examinó la columna desarrollada inmediatamente bajo luz ultravioleta de onda larga en un cuarto oscuro. La presencia de aflatoxina se evidencia por la banda fluorescente azul o verde aproximadamente 2 cm arriba de la capa de alúmina. La cuantificación se realizó comparando la columna que contenía la muestra con otras que tenían cantidades estandard.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

Se analizaron un total de 100 muestras para DA y AFB1, los cereales fueron: maíz, sorgo, soya y trigo, los cuales tienen origen en distintos estados de la República Mexicana tales como: Tamaulipas, Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Sinaloa, Querétaro, Guanajuato y Puebla (Tabla No. 2 y 3).

Las ocratoxinas han sido objeto de estudio de muchas investigaciones en varios países europeos; en nuestro país no se ha estudiado lo suficiente aunque algunas investigaciones nos muestran que esta toxina se ha encontrado en semillas y cereales de importancia económica.

La ocratoxina A se ha encontrado en un gran variedad de cereales como maíz, trigo, avena, arroz, cebada, mijo, nuez y frijol (Bacon *et al*, 1973 y Purchase, 1974). En el presente trabajo se obtuvo que el 13 % de las muestras contenían DA en niveles que estuvieron entre 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un promedio de 21.15 \pm 12.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

El sorgo fue el cereal que tuvo el mayor número de muestras positivas, 7(14 %) a ocratoxina A en niveles de 10,10,20,30,40,40,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el maíz las muestras contaminadas fueron 5(16.6 %) presentando niveles de 10,10,10,20,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El trigo tuvo una muestra contaminada 1(11.1 %) con 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y por último la soya en la que no se detectó DA (Tabla No.4).

En la tabla No. 5 de resultados se observa que el estado de Tamaulipas presentó el mayor número de muestras contaminadas S(16.1 %) en niveles de 10,10,20,40,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siguiéndole el Estado de México con 3(15.8 %) muestras positivas con niveles de 10,10,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Michoacán tuvo 2(25 %) en donde los niveles fueron de 30 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Hidalgo 1(7.1 %), Querétaro 1(7.1 %) y Guanajuato 1(20 %) consecutivamente los niveles fueron 20, 10 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En los estados de Sinaloa y Puebla no se presentaron muestras con OA. El nivel más alto que fue de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se detectó en sorgo y de los estados en Tamaulipas y Michoacán, sin embargo no rebaza el nivel máximo permitido que es de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Van Egmond 1987)

Otros estudios como el de García et al, 1992 señala que de 496 muestras analizadas de maíz sólo 6 contenían OA con niveles de 6 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, análisis que fueron hechos siguiendo el procedimiento Eppley, otro estudio hecho por Medina 1992 encontró que de 175 muestras de sorgo y 163 de alimento para animales utilizando HPLC, el 25 % de las muestras de sorgo contenía OA en una distribución de 2-82 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo el promedio 15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el alimento para animales el 39.3 % tuvieron de 2-204 $\mu\text{g}/\text{kg}$. el promedio fue de 28.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Como se puede observar los niveles, número de muestras, y promedios son en general bajos si los comparamos con otro tipo de micotoxinas como podría ser aflatoxina, sin embargo dado se que encontró OA en 6 de 8 estados que se tomaron en cuenta para el análisis y en 3 de 4 cereales, nos habla de su amplia distribución y de la necesidad de tomar en cuenta que puede provocar graves daños a animales de importancia comercial como pueden ser cerdos, (Krogh,1973) pollos (Huff, 1975) y directa o indirectamente a la población humana.

El hecho de encontrar niveles detectables de OA aún cuando no rebazan los niveles permitidos y dados los pocos estudios que sobre cuantificación de OA en cereales se encuentran en México, hace necesario llevar a cabo un mayor número de investigaciones donde se analice un tipo de cereal, un origen y un número de muestras que nos permita hacer una evaluación más precisa del problema de ocratoxina A.

TABLA No. 2
RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE OA
EN CEREALES Y SOYA PARA ALIMENTO DE
ANIMALES DE DIFERENTES ESTADOS DE
LA REPUBLICA MEXICANA

	SORGO			MAIZ			TRIGO			SOYA		
	+	-	%	+	-	%	+	-	%	+	-	%
ESTADO DE MEXICO	0	0	0	3	16	15.8	0	0	0	0	0	0
GUANAJUATO	1	4	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HIDALGO	1	6	14.3	0	0	0	0	0	0	0	7	0
MICHOCAN	2	6	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PUEBLA	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
QUERETARO	0	6	0	0	0	0	1	3	25	0	4	0
TAMAULIPAS	3	17	15	2	9	18.2	0	0	0	0	0	0
SINALOA	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+ MUESTRAS POSITIVAS

- MUESTRAS NEGATIVAS

% PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS CON
 RESPECTO AL TOTAL DE LAS ANALIZADAS.

TABLA No. 3
RESULTADOS DE LA CUANTIFICACION DE AFB1
EN CEREALES Y SOYA PARA ALIMENTO DE
ANIMALES DE DIFERENTES ESTADOS DE
LA REPUBLICA MEXICANA

	SORGO			MAIZ			TRIGO			SOYA		
	+	-	%	+	-	%	+	-	%	+	-	%
ESTADO DE MEXICO	8	8	0	4	15	21	0	0	0	0	0	0
GUANAJUATO	1	4	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HIDALGO	1	6	14.3	0	0	0	0	0	0	1	6	14.3
NICHOACAN	2	8	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PUEBLA	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
QUERETARO	1	5	16.7	0	0	0	1	3	25	1	3	25
TAMAULIPAS	5	15	25	3	0	27.3	0	0	0	0	0	0
SINALOA	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+ MUESTRAS POSITIVAS
 - MUESTRAS NEGATIVA
 % PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS CON
 RESPECTO AL TOTAL DE LAS ANALIZADAS.

TABLA No. 4
NIVELES DE OCRATOXINA A EN TRES CEREALES
Y SOYA COLECTADOS EN LA
REPUBLICA MEXICANA

CEREAL	NUMERO DE MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE X	NIVELES DE OCRATOXINA A PPM
SORGO	50	7	14	10, 10, 20, 30, 40, 40, 40.
MAIZ	30	5	16.6	10, 10, 10, 20, 25.
TRIGO	9	1	11.1	10.
SOYA	11	0	0	-----
TOTAL	100	13	X_{W-D.E} = 21.15	4/- 12.6

TABLA No. 5

**NIVELES DE OCHRATOXINA A EN CEREALES Y SOYA
COLECTADOS EN DIFERENTES ESTADOS
DE LA REPUBLICA MEXICANA**

PROCEMENCIA	NUMERO DE MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE X	NIVELES DE OCHRATOXINA A PP/KG
ESTADO DE MEXICO	19	3	15.8	18, 18, 25.
GUANAJUATO	5	1	20	18.
HIDALGO	14	1	7.1	20.
NICHUACAN	8	2	25	38, 40.
PUEBLA	5	0	0	-----
QUERETARO	14	1	7.1	18.
TANAUHIPAS	31	5	16.1	18, 18, 20, 40, 40.
SINALOA	4	0	0	-----
TOTAL	100	13		XV-B-E: 21.6V- 12.6

En el caso de la cuantificación de AFB1 el 20 % de las muestras presentaron esta micotoxina en niveles de 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ con un promedio de $70 \pm 59.73 \mu\text{g}/\text{kg}$. Trece muestras se encuentran fuera de los límites máximos permitidos que ha establecido la Organización Mundial de la Salud 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Scott, 1978).

Como se puede observar en la Tabla No. 6, de los cereales que se analizaron el sorgo tuvo 10(20 %) muestras contaminadas en niveles de 20,30,40,40,60,60,60,150,150,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El maíz también presentó niveles altos pero en este caso 7(23.3 %) muestras positivas a AFB1 y los niveles fueron de 20,20,60,60,80,100,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La soya tuvo 2(18.2 %) muestras con 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y finalmente el trigo con 1(11.1 %) muestra contaminada de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En la Tabla No. 7 de resultados por Estado, tenemos que Tamaulipas tuvo 8(25.8 %) muestras positivas a AFB1 en niveles de 30,60,60,60,100,150,200,200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siguiéndole el Estado de México con 4 (21 %) muestras con niveles de 20,20,60,80 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Querétaro con 3(21.4 %) muestras de 10,20,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Hidalgo con 2 (14.3 %) muestras de 10 y 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Michoacán 2(25 %) muestras con niveles de 30 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y Sinaloa con 1(25 %) muestra contaminada de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En las muestras de los Estados de Guanajuato y Puebla no se detectó AFB1. El nivel más alto de AFB1 que se detectó fue de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en sorgo del Estado de Tamaulipas (Tabla No. 6 y 7).

La presencia de AFB1 en cereales se señala en México en muchos artículos, entre los que se pueden mencionar al de Rosiles y Pérez (1981) que de 634 de alimento para fines pecuarios el 34 % de alimento para aves, el 36 % de muestras de alimento para bovinos y el 19 % de alimento para cerdos contenían aflatoxina. Por otro lado Torreblanca et al (1987) demostraron que el 72 % de las muestras de maíz nixtamalizado provenientes de 50 molinos y tortillerías del Distrito Federal contenían altos niveles de AFB1 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$), García et al (1992) analizaron 496 muestras de maíz de 17 molinos de nixtamal en el D.F. de las cuales encontraron que 8 muestras contenían AFB1 en niveles de 3-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

TABLA No. 6
NIVELES DE AFLATOXINA B1 EN TRES
CEREALES Y SOYA COLECTADOS
EN LA REPUBLICA MEXICANA

CEREALES	NUMERO DE MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE %	NIVELES DE AFB1 $\mu\text{g}/\text{kg}$
SORGO	50	10	20	30, 30, 40, 40, 60, 60, 60, 150, 150, 200.
MAIZ	30	7	23.3	20, 20, 60, 60, 80, 100, 200.
TRIGO	9	1	11.1	10.
SOYA	11	2	18.2	10, 20.
TOTAL	100	20		X$\bar{}$ = 0.6; 70 +/- 59.73

TABLA No. 7

**NIVELES DE AFLATOXINA B1 DE CEREALES Y SOYA
COLECTADOS EN DIFERENTES ESTADOS
DE LA REPUBLICA MEXICANA**

PROCEDENCIA	NUMERO DE MUESTRAS	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE	NIVELES DE AFB1 µg/Kg
ESTADO DE MEXICO	19	4	21	20, 20, 60, 80.
GUANAJUATO	5	0	0	-----
NIDALGO	14	2	14.3	10, 40.
MICHODACAN	0	2	25	30, 150.
PUEBLA	5	0	0	-----
QUERETARO	14	3	21.4	10, 20, 60.
TAMAULIPAS	31	0	25.0	30, 60, 60, 60, 100, 150, 200, 200.
SINALOA	4	1	25	40.
TOTAL	100	20		X²/D.E = 70 +/- 59.73

Es importante puntualizar que las pérdidas de granos durante su almacenamiento por contaminación fúngica y sus metabolitos, llega a ser hasta de 30 % en México (Guarino, 1983), y constituyen una seria amenaza para la salud del hombre y animales que llegaran a consumir dichos alimentos.

En el presente trabajo y lo citado en la literatura evidencia que la contaminación de cereales con AFB1 es grande además de los altos niveles encontrados en México, lo cual hace pensar sobre la importancia y trascendencia que tiene realizar investigación básica y aplicada que permita evitar la contaminación por hongos y la posterior producción de aflatoxinas por estos, o en dado caso de que ya se encuentren contaminados llevar a cabo la detoxificación de los alimentos contaminados que asegure la conservación de la salud en la población consumidora teniendo en cuenta que la AFB1 produce daños hasta el momento a todos los seres vivos susceptibles a AFB1. En animales de importancia comercial como son los cerdos produce hepatoma o cáncer hepático dietas prolongadas y pobres en aflatoxinas, en las aves produce desde la mala absorción de nutrientes, coagulopatía, desarrollo ineficiente, vulnerabilidad a infecciones, etc. Además el consumo humano de productos animales con residuos tóxicos de las aflatoxinas así como de granos contaminados constituyen un peligro para la salud pública (Peña, 1990).

5. CONCLUSIONES.

1.- De las muestras analizadas resultaron positivas el 13 % para OA en niveles de 10 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el 20 % para AFB₁ en niveles de 10 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 13 muestras con AFB₁ rebazaron los límites máximos permitidos.

2.- En 6 de los 8 Estados de la República Mexicana que se consideraron para el análisis presentaron muestras positivas tanto para OA como para AFB₁, lo cual manifiesta la amplia distribución de estas dos micotoxinas.

3.- Dados los escasos estudios que sobre OA se encuentran en México y teniendo presentes estas dos micotoxinas en muestras analizadas, sobre todo si rebazan los niveles permitidos y teniendo en cuenta la grave toxicidad que estas pueden causar tanto a la población humana como animal hace necesario abordar investigaciones más específicas en cuanto al estado, tipo de cereal y número de muestras que permita evaluar la problemática para cada uno de ellos.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bacon C.W., Sweeney J. G., Robbins, J. D. and Burdick D. (1973). Production of penicillic acid and ochratoxin A or poutry feed by *Aspergillus ochraceus* : temperature and mixture experiments. Appl. Microbiol. 26: 155-160.
- 2.- Bacon C.W., Robbins J. D. and Burdick D. (1974). Metabolism of glutamic acid in *Aspergillus ochraceus* during the biosynthesis of ochratoxin A. Appl. Microbiol. 29: 317- 322.
- 3.- Batt T. R., Chen H. H. y Huang C. C. (1980). Sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in V29 cells induced by aflatoxin B₁, B₂ y G₂ with or without metabolic activation. Carcinog. 1: 759-763.
- 4.- Borker E., Insalata N. F., Levi C. P. and Witzeman J. S. (1966) Mycotoxins in feeds and foods. Advan. Appl. Microbiol. 8: 315-351.
- 5.- Brown M., Szczech G.M., and Purmalis B. P. (1976). Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 37: 331-338.
- 6.- Carlton W., Tuite W. and Cadwel R. (1973). *Penicillium viridicatum* toxins nephrosis and mold. J. Am. Assoc. 163: 1265-1297.
- 7.- Choundhury H. and Carlson C. W. (1971). A study of ochratoxin toxicity in hens. Poult. Sci. 50 1855-1859.
- 8.- Christensen C. M., Mirocha C. J. Mirocha and Meronuck R. A. (1977). Molds, Mycotoxins and Mycotoxicoses. Cereal Foods World. 22: 513.

- 9.- Ciegler A. and Fenelli D. J. (1972). Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. Naturwissenschaften. 59: 365- 366.
- 10.- Cole R. J. and Cox R. M. (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press. USA. p. 1,15,16.
- 11.- Derache R. (1989). Toxicología y Seguridad de los alimentos. Ed. Omega. Barcelona. p. 170, 171, 173-175, 177,181,187.
- 12.- Doupnik B. and Peckam J. C. (1970). Mycotoxicity of *Aspergillus ochraceus* to chicks. Appl. Microbiol. 19: 594-597.
- 13.- Dwrakanatt C. T., Sreenivasamurthy V., Parpia H. A. (1968). Aflatoxin in indian peanut oil. J. Food Sci. Technol. 6:1.
- 14.- García A. (1989). Manual de Métodos para el análisis de micotoxinas en granos. UNAM. Departamento de Botánica. Inst. de Biol. México. p. 79-89.
- 15.- García G., Martínez R., Caballero M. and Sánchez L. (1992). Survey for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin in corn tortilla dough from Mexico city. In VIII International, IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. National Anthropology Museum. Mexico: 127(79).
- 16.- Goldblaft C. A. (1972). Implications of mycotoxins. Clin. Toxicol. 5: 453-464.

- 17.- Guarino G. R. (1983). Aspectos sobre el almacenamiento de granos en el medio rural de México. En Memorias del Coloquio Internacional sobre conservación de semillas y granos almacenados . Inst. de Biología UNAM. México: 130- 146.
- 18.- Hsieh D. P. (1979). Basic metabolic effects of aflatoxins en interactions of mycotoxins in animal production. Ed National Academy of Science. USA : 45-53.
- 19.- Huff W. E., Wyatt R. D. and Hamilton P. B. (1975). Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in Broiler chickens. Appl. Microbiol. 30: 48-51.
- 20.- Hult K., Teiling A. and Gatenbeck S. (1976). Degradation of ochratoxin A by Ruminant. Appl. Environ Microbiol. 30: 48-51.
- 21.- Krogh, D. (1977) Ochratoxins. En Mycotoxins in human and health by Pathotoxy Publishers.
- 22.- Krogh D., Hald B., Gjertsen P. and Myken F. (1973). Ocurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxin porcine nephropathy. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 81: 689-695.
- 23.- Krogh P. (1974). Experimental porcine nephropaty changes of renal funtion and structure induced by ochratoxin contaminated feed. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 82: 1-22.
- 24.- Lai M., Semeniuk G. and Hesseltine C. W. (1968). Nutrients effecting ochratoxin A production by Aspergillus sp. Phytopathology. 58: 1056.

- 25.- Lai M., Semeniuk G. and Hesseltine C. W. (1970). Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* sp. species in synthetic medium. Appl. Microbiol. 19: 542-544.
- 26.- Márquez R. (1989). Evaluación genotóxica en ratón de la inactivación química de la aflatoxina B1 contenida en maíz. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. México. p. 44.
- 27.- Medina J. C. and Muñoz J. (1992). Occurrence of ochratoxin A in sorghum and animal feeds in Mexico. En 106 th. Annual AOAC International Meeting. 363: 227.
- 28.- Mico C., Ambruzzi A., Miraglia M., Benelli L. and Corneli S. (1992). Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. En VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. National Anthropology Museum. México: 65.
- 29.- Mico C., Fenelli C., Miraglia M., Brera C. Macri T. and De Dominics R. (1992). A study on the fate on ochratoxin A in cocoa beans processing. En VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. National Anthropology Museum. México: 65.
- 30.- Ong. T.M. (1975). Aflatoxin mutagenesis. Mut. Res. 32:35-53.
- 31.- Peña B and Suárez M (1992). Estudio de Niveles de micotoxinas presentes en semillas oleaginosas. En VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. National Anthropology Museum. México:129.
- 32.- Peña S. and Duran M. (1990). Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. Ciencia y Desarrollo. 94:61-71.

- 33.- Pepeljnjak S. (1972). Effects of ochratoxin A on the membrane bound and lysosomal enzymes in different regions of rat brain. En VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, National Anthropology Museum, México: 65.
- 34.- Pier A. C., Richard J. L. and Cysewski S. J. (1977). Effects of aflatoxin on celular immune system. Ann Nutr Alim. 31:781.
- 35.- Pier A.C., Richard J. L. and y Cysewsky S.J. (1980). Implications of mycotoxins in animal disease. J. Av. Ma. 8:719-724.
- 36.- Prior M. G. and Sisodia C. S. (1977). Ochratoxicosis in white leghorn hens. Poult. Sci. 57: 619-623.
- 37.- Prior m. G. (1976). Mycotoxin determinations on animal feedtuff and tissues in weatern Canada Can. J. Comp. Med. 40:75-79.
- 38.- Ramados C. S. and Shanmugasudaram E. R. (1973). Effect of citrinin on liver metabolism in rabbits. Indian J. Biochem. Biophys. 10: 296-297.
- 39.- Rasmussen G. and Thorup I. (1972). Ochratoxin A in Danish food. En VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. National Anthropology Museum. México: 55.
- 40.- Rodricks J. V., Messeltine C. W. and Mehلمان H. A. (1977). Mycotoxins in human and health. Pathotox Publishers Inc. USA. p. 29-50.

- 41.- Rodríguez N. A. (1977). Comisión Nacional de la Industria del Maíz para consumo humano. La Industria del Maíz. México D. F.; 15-32.
--- -----
- 42.- Rosiles R. M. y Pérez A. (1981) Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimento para animales domésticos durante los años 1977 a 1980. Vet. Mex. 12:229-232.
- 43.- Scott P. M. (1978). Mycotoxina in Feeds and ingredients and their origen. J. Food. Protec. 5:385-388.
- 44.- Shotwell O. L., Hesseltine C. W. and Goulden M. (1969) Ochratoxin A. Occurrence natural contaminant of corn sample. Appl. Microbiol. 17:765-766.
- 45.- Steyn S. (1977). Mycotoxins. Excluding Aflatoxin, Zearalenone and Trichotecenes. En Mycotoxin in human and animal health. Pathotox Publishers INC. USA. p. 38-42.
- 46.- Stoloff.L. (1977). Aflatoxin - An overview. En Mycotoxin in human and animal health. Pathotox Publishers INC. USA. p. 15- 18.
- 47.- Tejeada H. I. (1983). Manual de análisis de ingredientes para alimentación animal. PAIPEME. México D. F.
- 48.- Torreblanca R. A., Bourges H. R. and Morales J. (1987). Aflatoxin in maize and tortillas in Mexico. En Aflatoxin in Mexico. Ed CIMMYT. México. p. 310-316.
- 49.- Turcker, T. L. and Hamilton (1971). The effect of ochratoxin in broilers. Poult. Sci. 50: 1673 Abstr.

- 50.- Van der Merwe K. J., Steyn P. S. and fourie L. (1965).
Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A,
B, C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* . J.
Chem. Soc. p. 7083-7088.
- 51.- Van Egmond, H. P. (1987). Current situation on
regulations for mycotoxins. Overview of tolerances
and status of standard methods of sampling and
analysis. Food Additives and contaminants. 6: 139-188.
- 52.- Vanjy A., Bohm J. and Bata A. (1992). Ocurrence of
Mycotoxins of feedstuffs in Middle-Europe (Hungary and
Austria) En VIII International IUPAC. Symposium on
Mycotoxins and Phycotoxins. National Antropology Museum.
Mexico: 145.
- 53.- Uraguchi. K. (1967). Toxicology, biochemistry and
Pathology of mycotoxins. Halsted. New York. p. 14,
22-23.
- 54.- Van Egmond H. P. (1992). Mycotoxins, quality assurance,
reference materials and control. En VIII
International.IUPAC.Symposium on Mycotoxins and
phycotoxins. National Antropology Museum. México: 64.
- 55.- Van Walbeek W. W. , Scott D. M., Harwing and Laurence
J. W.(1969). *Penicillium urtdicatum* westling: a new
source of ochratoxin A. Can. J. Microbiol. 15:
1281-1285.
- 56.- Wlabeek Van W. (1973). Fungal toxins in foods. Can.
Inst. Food Sci. Tech. J. 6: 96-106.
- 57.- Wogan G. (1968). Aflatoxin risk and control measures.
Fed. Proc. 27: 932-938.

58.- Wogan G. (1977). Mode of action of aflatoxins. En Mycotoxin in human and animal health. Pathotox Publishers Inc. ISA. P. 29-50.