

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN COLECTA DE MAIZ
TARDIO ALMACENADO CON 27 VARIEDADES.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

P R E S E N T A

Carlos Barrera Palomo

608

2

1

MONTERREY, N. L.

JULIO DE 1979

T

SB608

.M2

B3

C.1



1080060903

7° 627

Depto. de Investigación

040.633

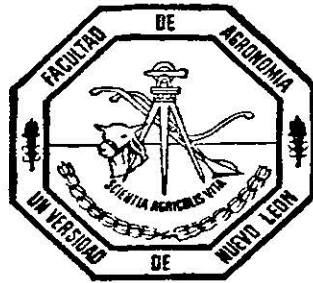
FA.1

1999

C.5

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



DETERMINACION DE AFLATOXINAS EN COLECTA DE MAIZ
TARDIO ALMACENADO CON 27 VARIEDADES.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

P R E S E N T A

Carlos Barrera Palomo


MONTERREY, N. L.

JULIO DE 1979

007088

T
5B608
-M2
B3

040.633
FA1
1979
c.5


Biblioteca Central
Maema Solidaridad
F. Tesis


BU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

A MIS PADRES CON TODO CARINO:

SR. ERASMO BARRERA ALVAREZ (Q.E.P.D.)

SRA. MAXIMA PALOMO VDA. DE BARRERA

*A quienes doy mi eterno agradecimiento
por sus consejos, comprensión y apoyo,
que ayudaron a mi realización con gra-
titud y respeto.*

A MI ESPOSA:

SRA. ELVIRA ALMANZA DE BARRERA

*Por la comprensión y el apoyo
que me dio, con todo mi amor,
carino y respeto.*

A MIS PADRES POLITICOS:

SR. JULIO ALMANZA SANCHEZ

SRA. MARIA DEL CARMEN CAMACHO DE ALMANZA

Con cariño y respeto.

A MIS HERMANOS:

SRITA. ELIZABETH CECILIA BARRERA P.

SR. FRANCISCO ERASMO BARRERA P.

SRITA. MARGARITA IGNACIA BARRERA P.

SRITA. JULIETA BARRERA P.

SR. ERASMO BARRERA R.

SR. JAVIER BARRERA R.

SR. IGNACIO BARRERA R.

SRA. CELIA BARRERA DE GRIMALDO

SR. TOMAS BARRERA R.

SR. FRANCISCO SERVANDO BARRERA R. (Q.E.P.D)

Por su apoyo y cariño.

ESPECIALMENTE A MI ASESOR:

DR. JOSE LUIS DE LA GARZA GONZALEZ

Por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

A MIS FAMILIARES
COMPANEROS
Y AMIGOS

I N D I C E

	PAGINA
R E S U M E N	1
I N T R O D U C C I O N	2
L I T E R A T U R A R E V I S A D A	3
M A T E R I A L E S Y M E T O D O S	10
R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N	14
C O N C L U S I O N E S Y R E C O M E N D A C I O N E S	20
B I B L I O G R A F I A	22

R E S U M E N

En el presente estudio se analizaron por su contenido de aflatoxinas 27 muestras de maíz. Las muestras corresponden al programa de Mejoramiento de Maíz de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Su lugar de colección fue en el Municipio de Tardón, N.L. y su fecha Julio de 1977. Para el análisis y cuantificación de las aflatoxinas, se usó el método de Pons y colaboradores.

Se encontró que un 20% de las muestras contenían aflatoxinas. En el presente estudio se encontró solamente la aflatoxina B₁ en cantidades que varían de 0-5 p.p.b.

En su mayoría, las muestras que se analizaron estaban libres de aflatoxinas aún cuando algunas de ellas mostraban trazas. Se registró un promedio de 3.1 p.p.b. de aflatoxina B₁, con una máxima de 4.1 y una mínima de 1.6 p.p.b.

Las muestras que presentaron una mayor fluorescencia, fueron las muestras 6 y 8 (Pinto Amarillo Grande y Amarillo); estas muestras son del ciclo Tardío Verano. 1976.

I N T R O D U C C I O N

Los granos almacenados estan sujetos al ataque de insectos y hongos, que pueden dîsmînuir la calidad del grano, y en algunos casos causar la pèrdida parcial o total del mismo.

En México, tenemos grandes pèrdidas por hongos que atacan los granos almacenados, es muy frecuente este fenómeno dado que se presenta como mohos en los granos almacenados. En virtud de que las esporas estân ampliamente distribuidas en el ambiente.

El presente estudio tiene como base investigar acerca de las pèrdidas que se producen en granos de maîz, debîdo al ataque de hongos que producen Aflatoxinas y observar si hay diferente producciôn de toxinas en las diferentes variedades.

Tiene algunas limitantes, esperamos que sirva para mejorar las condiciones de almanenaje de los diferentes granos y obtener variedades resistentes al ataque de los hongos que producen las aflatoxinas.

LITERATURA REVISADA

Los hongos causan daños considerables en los granos almacenados. Los hongos Aspergillus flavus Link y A. parasiticus Speare son de la clase Deuteromycetes; o sea, son hongos imperfectos, esta clase incluye varios miles de especies saprófitas; otras son de gran importancia porque causan enfermedades en el hombre, los animales y las plantas, algunos hongos son de importancia industrial (6).

Los microorganismos de ésta clase no poseen o no se les conoce su estado sexual o perfecto, tienen micelio septado bien desarrollado y otras características semejantes a los hongos superiores (1).

La clase Deuteromycetes comprende cuatro órdenes, entre los que están los Moniliales, este es el grupo más numeroso de su clase, pues comprende más de 10,000 especies diferentes. En este orden, se encuentran la mayoría de los hongos que atacan al hombre así como también los hay de importancia industrial como Penicillium spp. y Aspergillus, también los hay fitoparásitos muy importantes como Verticillium, Fusarium, Alternaria (6). Algunas especies de Aspergillus y Penicillium atacan los granos almacenados; y especies del primero producen aflatoxinas. Los daños que hacen estos microorganismos en los granos almacenados consisten en: manchar la semilla. bajar el

poder germinativo y su valor nutritivo; producir calentamiento del grano, y en algunos casos toxinas (1, 6). Dentro de las toxinas producidas comúnmente están las Aflatoxinas.

Cantidades menores de un miligramo de aflatoxina B₁ mezclada con el grano, producen efectos patológicos en animales susceptibles. Las aflatoxinas son los agentes carcinogénicos naturales más potentes que se conocen, por lo que la presencia de estas toxinas hace que el grano sea impropio para el consumo humano y de los animales. [1,10].

La contaminación de los alimentos por mohos es un fenómeno frecuente (7). Los primeros reportes de daños por aflatoxinas fueron hechos en 1960 en Inglaterra, cuando se presentó una gran mortandad de patos y otros animales, según Vaqueira y Morales (17). Estos autores mencionan que este tipo de toxinas son producidas por los hongos Aspergillus flavus y A. parasiticus.

Los primeros antecedentes de ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas se remontan al año 1954. En el que Burnside comprobó que eran tóxicas para cerdos, que ingerieron alimento balanceado derivado de cacahuete contaminado con aflatoxinas. (14).

Los materiales más expuestos al ataque por hongos produc

tores de aflatoxinas, son los granos como maíz, sorgo, trigo, arroz, oleaginosas, como semilla de algodón, cacahuate y soya. (17).

Las distintas especies de Aspergillus que son comunes en granos almacenados, tienen límites de crecimiento que son diferentes en cuanto al contenido de humedad. En maíz, trigo, cebada, arroz y frijol, estos límites son aproximadamente -- los siguientes: A. restrictus, 13.0 a 13.5%; A. repens y A. ruber, 13.5 a 14.0%; A. ochraceus y A. candidus, 15.0 a 15.5%; A. flavus, 18.5%.

Todas estas especies de Aspergillus pueden desarrollarse en contenidos de humedad ligeramente inferiores o superiores a los mencionados, pero crecen más fácilmente y rápidamente si la humedad se halla entre las cifras indicadas. (5).

Temperatura.- Los hongos de granos almacenados crecen -- más rápidamente en una temperatura de 25 a 30°C. su crecimiento es muy lento a 15°C., y casi cesa a una temperatura de -- 10°C. Si se requiere almacenar grano con un contenido de humedad superior a 14 ó 15%, es preferible almacenarlo a temperaturas tan bajas como sea posible. De esta manera el deterioro por hongos será más lento, y el grano se podrá tener por un tiempo más largo en el almacén. (5).

Para que haya producción de la toxina, según Vaqueira y Morales (17), debe haber una humedad relativa al 85% ó más, - pero en un trabajo realizado por Boller y Schroeder (2) reportaron una humedad relativa 70-75%, para que haya una infestación del 15 al 30% de los granos.

En cuanto a la temperatura, Vaqueira y Morales (17) consideraron que una temperatura de 13°C. en adelante, favorece la producción de aflatoxinas; por otra parte, Boller y Schroeder (3) encontraron que la mayor producción de toxinas era a 35°C.

Tiempo de almacenamiento.- Mientras más alto es el contenido de humedad y la temperatura del grano, más corto es el tiempo que el grano puede tenerse almacenado sin el riesgo de ser dañado por los hongos de almacén. Los hongos se empiezan a desarrollar a los 3 ó 4 meses, cuando la humedad de los granos está entre 14 y 15% y a una temperatura de 20 a 25°C. Cuando la humedad está entre 13 y 14% el grano puede almacenarse - por un año sin que haya una pérdida considerable en su calidad; los granos con humedad entre 12 y 13% pueden almacenarse por varios años sin riesgo de que haya daño por hongos en el almacén. (17).

Las primeras investigaciones acerca de contaminación debida a aflatoxinas en Monterrey, N.L., fueron realizadas en la

Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. con alimentos balanceados para aves, conejos y puercos, se encontraron aflatoxinas en más de un 50% de las muestras analizadas. Los niveles encontrados fueron desde trazas hasta muy altos (1111 p.p.b.) la aflatoxina más frecuente fue la B₁ (7).

Una de las primeras investigaciones realizadas en México en cuanto al ataque de aflatoxinas en maíz, fue realizado en el Instituto de Biología de la U.N.A.M. Este trabajo lo realizó la Biol. Martha Zenteno Zebada (18), ella utilizó el método de Pons y colaboradores para poder obtener la toxina y cuantificarla por medio de cromatografía en capa fina.

En reciente trabajo presentado en Septiembre de 1978 - por Mora Cepeda, G.F. (15) es un análisis realizado con una colecta de 25 variedades de maíz. Se encontró que un 25% de las muestras contenían aflatoxinas, en este estudio solamente se encontró la aflatoxina B₁ en cantidades que varían de 0-10 p.p.b. La mayoría de las muestras que se analizaron estaban libres de aflatoxinas, aún cuando algunas de ellas mostraban trazas. Las muestras que presentaron una mayor fluorescencia fueron el olote delgadito. (2)

En estudio reciente que se realizó en Monterrey y su Area metropolitana, sobre una colecta de 20 muestras de maíz de bodegas Conasupo, en tortillerías, pequeños comercios y --

particulares, de Febrero a Mayo de 1978; se hicieron pruebas, encontrándose lo siguiente: daños ligeros al embrión por hongos desde un 7.5% hasta un 54.3% y daños severos desde 0% hasta 46.8%. Se determinó el porcentaje de germinación, que fue desde un 13 hasta un 95. Se vio que conforme aumentan los daños al embrión, disminuye la germinación y viceversa. [9].

La primera parte incluyó granos enteros y la segunda -- granos quebrados y basura, se encontraron tres muestras positivas con 42 p.p.b. de B_1 en granos enteros y 25 p.p.b. en -- granos quebrados y basura la primera; 17 p.p.b. de B_1 en granos quebrados y basura la segunda, y 9 p.p.b de B_1 en granos enteros la tercera. [9].

Diferentes cepas de A. flavus exhibieron una amplia variación en la producción de aflatoxinas en el mismo substrato. Estas producían sólo aflatoxinas B_1 y B_2 . Sin embargo, las -- cepas de A. parasiticus producían consistentemente las 4 aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 . Se puede aclarar por estudios previos, que A. flavus era un contaminante más común en las muestras de maíz, comparado con A. parasiticus que se presenta raramente. -- [9].

Rambo y col, mencionados por Mirocha y Christensen [14] corroboraron la observación de Taubenhaus en el sentido de -- que la infección de los granos era debida a A. flavus y A. --

parasiticus, y a su vez demostraron que la infección del maíz con A. flavus antes de cosechar estaba relacionado con el daño de los granos debido a insectos.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES.- En el presente estudio se utilizaron 27 --colectas de maíz del Programa de Mejoramiento de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. del ciclo Verano, 1977.

Para analizar estas muestras en el laboratorio se usaron materiales y reactivos químicos.

METODOS.- Se utilizó el método de Pons y colaboradores - (15) en el análisis y cuantificación de las aflatoxinas.

El método tiene varias ventajas:

A.-) Preparación de la muestra:

- 1.- Se procedió a hacer una aplicación de insecticidas malathion contra gorgojo.
- 2.- Se molió la muestra primeramente con martillo.
- 3.- Se procedió a moler el grano nuevamente en un molino de Wiley, este se utilizó en un 50% de las muestras.
- 4.- El otro 50% de muestras se molió en un molino de harina de maíz.

B.-) Extracción de la muestra:

- 1.- Pesar 50 grs. de la muestra.
- 2.- Agregar 250 ml. de acetona al 70% en agua.
- 3.- Se agita por 30 minutos.

4.- Se filtra en forma normal y se colectan 150 ml. aproximadamente.

C.-) Purificación del extracto;

Para esto se hizo lo siguiente al extracto obtenido en el paso anterior se le agregó.

1.- Agua destilada y acetato de plomo y se evaporó a 175ml.

2.- Al extracto así obtenido se le agregó celite analítico y se filtró al vacío.

3.- Se procede a hacer 2 separaciones con 50 ml. de cloroformo cada una, en donde se pasa la parte inferior del líquido a un vaso de precipitado.

4.- Se evapora hasta 3 ml.

5.- Se procede a colocar los compuestos del aparato "K" [columna cromatográfica] que son fibra de vidrio, sulfato de sodio anhidro, capa de 2 cms. de gel de sílice y otra delgada de sulfato de sodio anhidro.

6.- A la columna cromatográfica (tubo Butt) se vierte el extracto, se le agrega Éter etílico que se elimina, se le agrega después 150 ml. de cloroformo metanol al 3% recogiendo en un vaso de precipitado y se procede a una nueva evaporación a 5 ml. El extracto está listo para su análisis cuantitativo.

D.-) Análisis cualitativo;

1.- Preparación de las placas para cromatografía.

- 2.- Se utilizan placas de 5 mm. de grosor de 20 x 20 cms. el espesor de la capa fué de 500 micras, con aplicador (Desaga).
- 3.- Utilizamos sílica gel del N° 7.
- 4.- Se activan las placas a 110°C. por una hora,
- 5.- Se deja enfriar a temperatura ambiente.
- 6.- Se aplican muestras de 20 microelts. a cada 1.5 cms. y 1.2 y 5 croelts. del standard (Aldrich Chemical Company Inc.) se aplican con micropipetas de 1.2 a 5 microelts.

Las concentraciones del standard son:

$$B_1 = 10 \text{ mgr./ml.}$$

$$B_2 = 4 \text{ mgr./ml.}$$

$$G_1 = 10 \text{ mgr./ml.}$$

$$G_2 = 3 \text{ mgr./ml.}$$

- 7.- Correr las placas hasta una altura de 2 cms. del tope - - utilizando como eluente cloroformo-acetona al 13%. Poner a -- temperatura ambiente.
- 8.- Observar la flourescencia en el cromato-vue con luz ultra violeta de onda larga (366 nm.)
- 9.- Seleccionar las muestras positivas para análisis cuantita tivo.

E.-) Análisis cuantitativo:

- 1.- Preparar las placas y efectuar el mismo procedimiento que en el método anterior hasta el paso N° 5.
- 2.- Colocar manchas sobre la placa de 20 microelts. del extrac

to de la muestra y 1, 2, 5 microolts. standard con micropipetas de 1, 2, 5 microolts.

3.- Efectuar el mismo procedimiento que se siguió en el análisis cualitativo. Para correr las muestras y observar la fluorescencia (pasos 7 y 8).

4.- Cuantificar por la siguiente fórmula:

$$\text{p.p.b. Aflatoxina } B_1 = \frac{V_s \cdot C_s \cdot S_d \cdot 1000}{W \cdot \underline{X} \cdot 0.6}$$

En donde V_s = Microolts. de standard de aflatoxinas en la cual la mancha B_1 , coincide con la mancha B_1 de la muestra.

C_s = Concentración de aflatoxinas B_1 , en la solución standard (mgrs/ml.)

S_d = Volúmen al cual se diluye el extracto de la muestra para análisis de cromatología en capa fina en microolts.

W = Peso de la muestra en gramos.

X = Microolts. del extracto de muestra usado en las manchas.

En el mismo procedimiento se usa para calcular las aflatoxinas B_2 , G_1 y G_2 .

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro I, aparecen los resultados del análisis para aflatoxinas de las 27 muestras que corresponden al presente estudio. En la Fig. I se presentan las 19 muestras (70.4%) que estaban libres de toxinas.

Tres muestras (11.1%) presentaron trazas; o sea, una cantidad tan pequeña que no pudo ser cuantificada. Las últimas 5 muestras (18.5%) presentaron cantidades mayores de aflatoxina B₁.

En el análisis de cuantificación de aflatoxinas que se utilizó (16) usando en la cuba cloroformo metanol al 3% para desarrollar el cromatograma, el cual da buenos resultados. La Fig. 2 muestra las manchas y el R_f alrededor de .5, y en la Fig. 3 se muestra lo que se encontró en el presente trabajo, la aflatoxina B₁ con una fluorescencia azul.

Al correr la primera placa con 11 muestras y 1 estándar, las muestras son del 1 al 11 (Cuadro 1); se notó que la fluorescencia azul de la aflatoxina B₁ se manifestó en las muestras 04, 05, 06, 08 y 11, mostraban un color mas fuerte que las 6 restantes, solo mostraron trazas y por lo tanto, se separaron las 5 muestras para un segundo análisis y cuantificar.

Al correr la segunda placa con 11 muestras y 1 estándar (Cuadro 1), se manifestó que las muestras 12 a la 22 sólo presentaron pocas trazas, las muestras 17, 19 y 22 se separaron por que su flourescencia estaba algo fuerte de la aflatoxina B₁ para un segundo análisis y cuantificar.

Al correr la tercera placa con las 5 muestras que fal-- taban y 1 estándar de la 23, 24, 32 y 33, no manifestaron -- presencia de aflatoxinas; por lo tanto, se descartaron para -- una segunda prueba.

Se hizo la segunda prueba, pero ahora para analizar las muestras cuantitativamente, o sea, un análisis cuantitativo. De sólo las muestras que presentaron síntomas de la aflatoxi-- na B₁ de flourescencia azul, se colocaron manchas sobre la -- placa de 20 microlitros del extracto de las muestras y 1, 2 y 5 microlitros del estándar con micropipetas de 1, 2 y 5 micro-- litros.

Las muestras que se corrieron en ésta cuarta placa son la 04, 05, 06, 08, 11, 17, 19 y 22 para ver cual de las 8 mues-- tras presentaban los signos más marcados y poder cuantificar de las 8 muestras; solo 5 (04, 05, 06, 08, 11) presentaron la afla-- toxina B₁ de color azul fuerte y éstas son las que se van a -- cuantificar para ver cuantas p.p.b. de aflatoxinas B₁ tenían las muestras, de las otras 3 muestras (17, 19 y 22) sólo pre-

sentaron trazas muy bajas de la aflatoxina, las otras tres -- aflatoxinas (B_2 , G_1 y G_2) no se presentaron en las muestras, su presencia fué casi nula.

Todas las muestras con toxinas tenían aflatoxinas B_1 , - por lo tanto, como ya se investigó por parte de Calvert (4), el hongo que más prosperó en las muestras fué Aspergillus - - flavus.

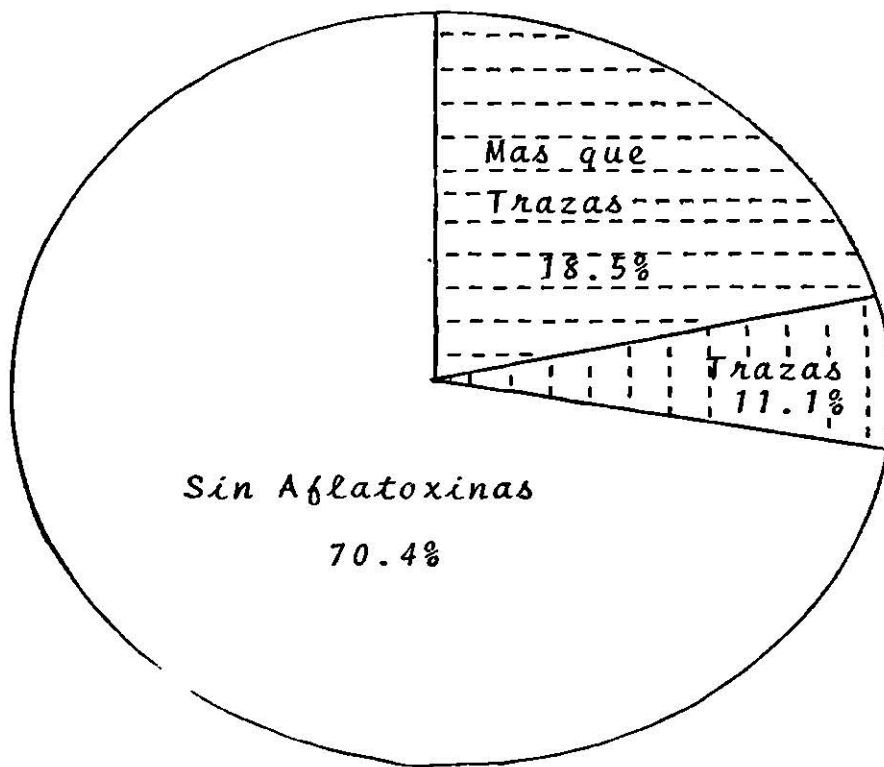
CUADRO N^o 1.- Contenido de Aflatoxinas en Variedades, Líneas y Selecciones de Maíz (*Zea mays* L.) cultivadas en Marín, N.L. 1977.

Muestra N ^o	Nombre	AFLATOXINAS			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
01	Pinto Amarillo	--	--	--	--
02	Pinto Amarillo	--	--	--	--
03	Pinto Amarillo	--	--	--	--
04	Mezclado con blanco	2.5	--	--	--
05	Pinto Amarillo	1.6	--	--	--
06	Pinto Amarillo Gde.	4.1	--	--	--
07	Amarillo	--	--	--	--
08	Amarillo	4.1	--	--	--
09	Pinto Moro	--	--	--	--
10	Grueso	--	--	--	--
11	Grueso	3.3	--	--	--
12	Grueso 4 meses	--	--	--	--
13	Grande ó Grueso	--	--	--	--
14	Grueso Olote Col.	--	--	--	--
15	Olote Colorado	--	--	--	--
16	Olote Col. Chico	--	--	--	--
17	Olote Col. Delgado	*	--	--	--
18	Blanco	--	--	--	--
19	Blanco	*	--	--	--
20	Blanco	--	--	--	--
21	Blanco	--	--	--	--
22	Blanco P. Amarillo	*	--	--	--
23	Breve Padilla	--	--	--	--
24	Breve Padilla	--	--	--	--
30	Blanco Del Llano	--	--	--	--
32	Blanco Grueso	--	--	--	--
33	Olote Colorado	--	--	--	--

* Trazas.

Las muestras 25 al 29 y 31 no fueron obtenidas ni analizadas.

Fig. N° 1.- Determinación de Aflatoxinas en colectas de Maíz Tardío Almacenado con 27 Variedades.



Masaru Manabe y Masahire Nakano. Encontraron que en una solución de Methanol al 3% era lo óptimo ya que el R_f alrededor de 0.5 se presentan las aflatoxinas claramente que son - B_1 , B_2 , G_1 , G_2 ; como lo muestra la figura # 2. (13)

En la figura # 3, muestra las manchas del standar usado en los análisis hechos, Abril de 1979.

FIGURA # 2

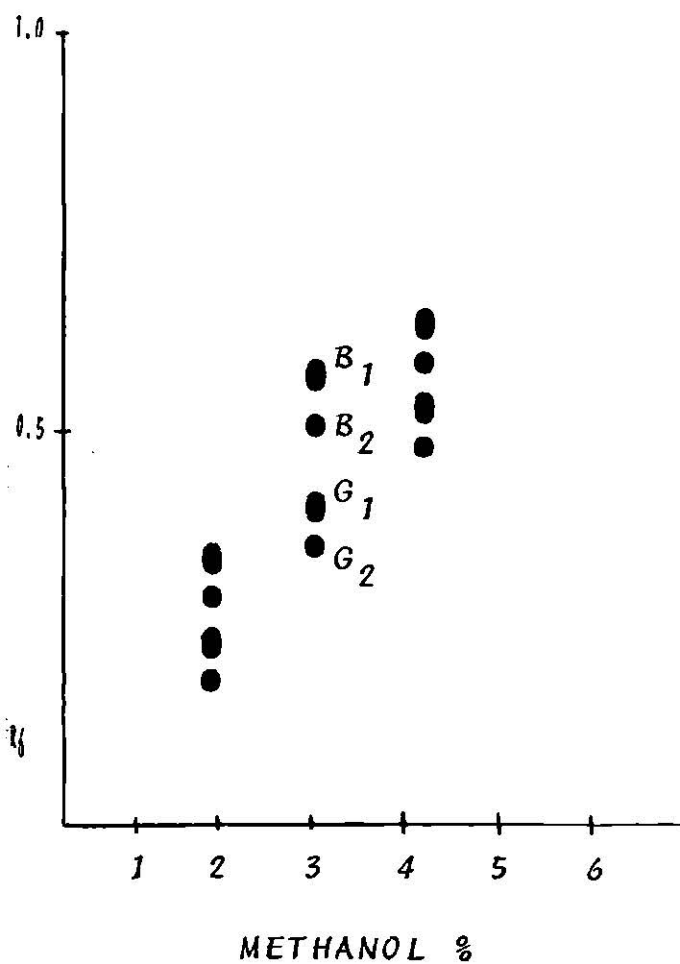
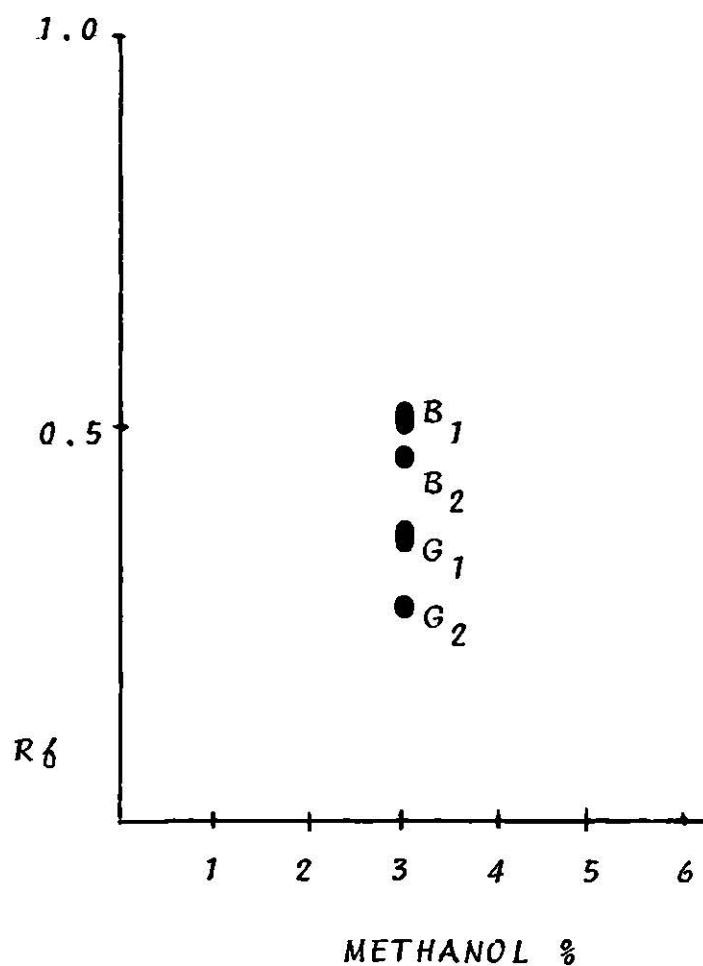


FIGURA # 3



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estudio es pequeño y el número de muestras y observaciones también es reducido.

El trabajo es una continuación de una serie de trabajos que se han realizado en la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. lo que podemos concluir del presente estudio es que el contenido de aflatoxinas es muy bajo, sólo se presentó la aflatoxina B₁ con fluorescencia azul.

Se registró un promedio de 3.1 p.p.b. En las 5 muestras que se encontró la aflatoxina con una máxima de 4.1 p.p.b. -- (Pinto Amarillo) (06) (08) y un mínimo de 1.6 p.p.b. (Pinto - Amarillo) (05).

Hasta la fecha no hay ningún método de control que elimine los hongos una vez que éstos han infectado la semilla.

Se aconseja en primer lugar, almacenar la semilla con una humedad tan baja como sea posible, de tal manera que se prevenga la infección y desarrollo de los hongos de granos almacenados.

Es sumamente importante hacer el almacenamiento bajo condiciones de poca humedad, que ayuden a prevenir el ataque del

grano por Aspergillus y Penicillium, el grano debe de almacenarse con una humedad de alrededor de 12% para no correr ningún riesgo de deterioro por hongos.

Deben evitarse las mezclas de granos con diferentes contenidos de humedad, pues esta práctica de almacenamiento no produce ningún beneficio en la prevención del ataque de hongos del grano.

Debe registrarse frecuentemente la temperatura del grano en diferentes partes del almacén, pues así se puede detectar los lugares en donde la temperatura se está elevando y tomar precauciones.

Es de gran importancia ejercer un control estricto durante la cosecha, almacenamiento y procesos fundamentales en productos tales como cereales y oleaginosas, ya que debido al gran consumo que se hace de ellos, podrían ser vehículos potenciales de este tipo de toxinas.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alexopoulos, C.J. *Introducción a la Micrología*, Editorial Universitario de Buenos Aires, pp. 392-399 y 414, 1970.
- 2.- Boller, R.A. and Schroeder H.W. Influence of Relative Humidity on Production of Aflatoxin in Rice by Aspergillus parasiticus. *Phytopathology* 64: 17-21. 1973.
- 3.- Boller, R.A. and Schroeder H.W. Influence of Temperature on Production of Aflatoxin in Rice by Aspergillus parasiticus *Phytopathology* 64: 283-286. 1974.
- 4.- Calvert, O.F. Lillehoj, E.B., Kwolek F., Zuber M.S. Aflatoxin B₁ and G₁ production in Developing Zea mays Kernels from mixed Inocula of Aspergillus flavus and A. parasiticus *Phytopathology* 68: 506. 1978.
- 5.- Christensen, C.M. y L.C. López. Daños que causan en México los hongos de granos Almacenados. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Folleto Técnico # 44. pp. 8, 20, 25. 1962.
- 6.- De la Garza Gonzz., J.L. Curso de Fitopatología. Departamento de Difusión U.A.N.L. pp. 127-129. 1974.

- 7.- De la Garza Gonzz., J.L., Aguirre Rodz, J.I. y González R.L. Aflatoxinas en alimentos para puercos, conejos y aves en el Area de Monterrey, N.L., Boletín Interno de Parasitología # 3. F.A.U.A.N.L. 1978.
- 8.- De la Garza Gonzz. J.L. y L.S. Garza. Aflatoxinas en productos Agrícolas en el Area de Monterrey, N.L. Rev. Panagfa 5 (39): 6-8. 1977.
- 9.- De la Garza Gonzz, J.L., S.Marmolejo y A. Taméz Cano. Aflatoxinas en Maíz en el Area de Monterrey. VIII Congreso Nacional de Fitopatología, Oaxtepec, Morelos. 1978.
- 10.- Detroy, R.W., E.B. Lillehoj and A. Ciegler. Aflatoxin and Related Compounds in Microbial Toxins. Redactores: A. Ciegler, S. Kadis y S.J. Ajl. Academic Press, New York, Vol. VI, Fungal Toxins Cap. I, pag. 4-178. 1971.
- 11.- Garza Reyes, J.S. Aflatoxinas en Productos Agrícolas de Algodón y Cacahuete en el Area de Monterrey, N.L. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. Tesina. 1976.
- 12.- Macías Narvdez, J.G. Aflatoxinas en alimentos balanceados para conejos en el Area de Coahuila y Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. Tesis. 1978.

- 13.- Masaru Manabe, Shinji Matsuura and Masahiro Nakano. *Toxic Micro-organisms*. Published by the UJNR Joint panels on Toxic micro-organisms and the U.S. Department of the Interior. pp. 23-24. 1968.
- 14.- Mirocha, C.J. y Christensen, C.M. Fungus Metabolites - - Toxic to Animals. *Ann Rev. Phytopathol* 12: 303-330.
- 15.- Mora Cepeda, G.F. Determinación de Aflatoxinas en 25 co--lectas de Maíz (Zea mays) en Marín, N.L. Ciclo Prima vera-Verano 1977. Tesina. Sep. 1978.
- 16.- Pons, W.A. Jr., Cucullu, A.F., Lee, L.S., Robertson, J.A., Franz, A.D., Goldblatt, L.A. Determination of Afla--toxin in Agricultural Products: Use of Aqueous Aceto--ne for Extraction *J. Assoc. Offic. Anal. Chemist* 49: 554-562. 1966.
- 17.- Vaqueira, C. y Morales, J.C. 1975. Aflatoxinas. *Rev. Tecnol Alimentos*. (Méx.) 10: 50-58. 1975.
- 18.- Zenteno Zebada, M. Producción de Aflatoxinas por Cepas de - Aspergillus flavus aisladas de Maíz. *Rev. Lat. Am. Mi--crobiol.* 263-266. 1971.

