

## ARTÍCULOS

### MICROBIOTA TOXIGÉNICA Y AFLATOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ BLANCO PROVENIENTES DE LOS ESTADOS YARACUY Y GUÁRICO, VENEZUELA

Juan Barroyeta, Marleny Chavarri, Nohants Rumbos, Mario José Garrido y Claudio Mazzani.

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Química y Tecnología, Laboratorio de Micotoxicología. Apartado Postal 4579, Maracay 2101-A, estado Aragua, Venezuela.

Recibido: 01 de febrero de 2013

Aceptado: 25 de junio de 2013

#### RESUMEN

Barroyeta, J., Chavarri, M., Rumbos, N., Garrido, M. J. y Mazzani, C. 2013. Micobiota toxigénica y aflatoxinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados Yaracuy y Guárico, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 26:2-6.

Se evaluó la micobiota contaminante y contenido de aflatoxinas en granos de maíz (*Zea mays* L.) blanco de once híbridos destinados al consumo humano provenientes de los estados Guárico y Yaracuy, Venezuela. La cuantificación de especies toxigénicas se realizó por siembra directa de granos enteros y desinfectados con NaClO al 3,27%, en malta sal agar, expresando los resultados como porcentajes de granos colonizados por mohos totales y por especie. El contenido de aflatoxinas se cuantificó por el método inmunoquímico con columnas de inmunofinidad para aflatoxinas B1+B2 (Aflatest® VICAM). Se encontraron diferencias significativas en la incidencia de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., mohos totales y para el contenido de aflatoxinas entre ambos estados. Los mohos identificados fueron *A. flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* sp. y *Eurotium chevalieri*. La mayor incidencia promedio la presentó *A. flavus* (24,22%) y *F. verticillioides* (14,63%), seguida de *Penicillium* sp. (4,41%) en Yaracuy, mientras que, en Guárico fue *Aspergillus* sp. (25,90%) y *F. verticillioides* (16,77%). La concentración promedio de aflatoxinas en Yaracuy fue de 26,51 ng/g, superando los límites permitidos para maíz (20 ng/g), mientras que en Guárico fue de 16,67 ng/g. El híbrido DK357 fue el que presentó menor incidencia fúngica y bajos contenidos de aflatoxinas en ambos estados. Sobre la base de estos resultados, se concluye que la concentración de aflatoxinas puede variar entre híbridos por la presión de inóculo que se genera en el campo, la capacidad aflatoxigénica del moho, susceptibilidad de los híbridos y las condiciones ambientales imperantes en las zonas productoras de maíz.

Palabras clave adicionales: aflatoxina, micobiota, *Zea mays*.

#### ABSTRACT

Barroyeta, J., Chavarri, M., Rumbos, N., Garrido, M.J. and Mazzani, C. 2013. Toxigenic mycobiota and aflatoxin in grains of white corn proceeding from Yaracuy and Guárico States, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 26:2-6.

The Mycobiota contaminated and aflatoxin content in white corn (*Zea mays* L.) was evaluated in eleven hybrids for human consumption from Yaracuy and Guárico states, Venezuela. The quantification of toxigenic species was performed by direct seeding of whole grains and disinfected with 3.27% NaClO in malt salt agar, expressing results as percentages of total molds colonized grains and species. The aflatoxin content was quantified by immunochemical method with immunoaffinity columns for aflatoxins B1 + B2 (Aflatest® VICAM). There were significant differences in the incidence of *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., Total molds and aflatoxins between both states. Molds were identified *A. flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium* sp. and *Eurotium chevalieri*. The highest incidence presented average *A. flavus* (24.22%) and *F. verticillioides* (14.63%), followed by *Penicillium* sp. (4.41%) in Yaracuy, while in Guárico was *Aspergillus* sp. (25.90%) and *F. verticillioides* (16.77%). The average concentration of aflatoxin in Yaracuy was 26.51 ng / g, exceeding the permitted limits for maize (20 ng / g), while in Guárico was 16.67 ng / g. The hybrid DK357 Unit had the lowest incidence of fungal and aflatoxin content low in both states. Based on these results, we conclude that the aflatoxin concentration can vary between hybrids inoculum pressure which is generated in the field aflatoxigenic mold capacity, susceptibility of the hybrids and the prevailing environmental conditions in producing areas corn.

Additional key words: aflatoxin, mycobiota, *Zea mays*.

#### INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es considerado la base de la alimentación de la población en el continente americano. En Venezuela, ocupa el tercer lugar como cultivo estratégico para el sector agrícola nacional, constituyendo la materia prima básica para la producción de almidón, aceite, harina, proteína, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios, hojuelas de maíz, fécula, entre otros (15).

Los granos y semillas de maíz están expuestos a la acción de numerosos factores bióticos y abióticos, entre los cuales se encuentran las aves, roedores, insectos y microorganismos como mohos, levaduras y bacterias, la humedad, temperatura, daños mecánicos, deficiencia durante la cosecha, transporte y almacenamiento. La acción simultánea de estos factores sobre los granos, pueden condicionar un deterioro acelerado

con la consecuente pérdida de su calidad. Los mohos han recibido especial atención, por sus implicaciones tanto en el deterioro de los granos como en la salud pública (12).

El crecimiento de mohos genera alteraciones en el sabor y la calidad de los alimentos. Especies toxigénicas y atoxigénicas producen cambios desfavorables en los granos y semillas que colonizan, alterando su valor nutritivo disminuyendo el contenido de grasas, proteínas y carbohidratos. Además alteran las características organolépticas y ocasionan muerte del embrión con las consecuentes pérdidas económicas que esto conlleva (4).

La invasión del moho en el grano de maíz en el período pre cosecha puede producir una serie de compuestos o metabolitos secundarios, no esenciales para el crecimiento vegetativo, son tóxicos y son conocidos como micotoxinas. Son producidos por diversos mohos que crecen en los granos de

## MATERIALES Y MÉTODOS

cereales, leguminosas y en alimentos que se han formulado con base a los mismos (1). Según Flores *et al.* (6), se conocen entre 300 y 400 micotoxinas, siendo las más importantes por su ocurrencia y toxicidad en especies de producción pecuaria las siguientes: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, citrinina, deoxidivalenol, zearalenona y tricótecenos. Los efectos deletéreos de estos metabolitos pueden observarse a diferentes niveles del metabolismo y fisiología de los animales.

Las aflatoxinas son compuestos del grupo de metabolitos de los bisifuranocumarinas, producidos por la especie *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* y *A. tamarii*, los niveles máximos permitidos de estas toxinas son: 20 ng/g en alimentos concentrados diversos, 10 ng/g en alimentos concentrados para pollos de engorde, 20 ng/g en el consumo humano y 0,5 ng/g en leche (16).

El interés mundial en el conocimiento de los hongos toxigénicos y contenidos de sus toxinas no solo es debido a las importantes pérdidas económicas que acarrearán éstos en el comercio nacional e internacional, sino también por sus efectos sobre la salud de las personas, la salud y productividad de los animales (15, 16). La toxicidad aguda y crónica de las aflatoxinas varía considerablemente según la especie, la edad, el sexo y el estado nutricional, la dosis de aflatoxina aplicada, la duración y repetitividad de la exposición. En la exposición crónica el efecto más drástico se ve en el ADN. Su efecto se puede subdividir en carcinogénico, mutagénico y teratogénico (6).

En el 2004 en Makueni y Kenia fue reportada la muerte de 125 personas por el consumo de maíz contaminado con aflatoxinas (14) y recientemente Dotis *et al.* (5) reportaron desde 1950 hasta el 2005 en el ámbito mundial la muerte del 65,4% de los casos de aflatoxicosis afectando el sistema nervioso central. En África y en China se han evidenciado correlaciones epidemiológicas entre la incidencia del cáncer esofágico en humanos y la presencia de alimentos y piensos contaminados con *Fusarium verticillioides* (20). Asimismo, Carvajal *et al.* (3) encontraron correlaciones positivas y significativas en los niveles de aflatoxinas libre detectadas en hígados con hepatocarcinoma celular en humanos.

Desde hace muchos años, se han planteado diferentes alternativas para prevenir la invasión de mohos en granos y semillas, así como para remover o inactivar las micotoxinas contenidas en los mismos; no obstante, de todas las alternativas propuestas, la selección y el mejoramiento para la resistencia resulta la alternativa más favorable debido a la gran variedad de factores que influyen su deterioro (4). Esto hace que la prevención de su formación sea una estrategia principal que se deba abordar en el campo con una selección adecuada de la metodología a emplear.

Basados en estas premisas y considerando la importancia que refiere el maíz y los mohos toxigénicos y atoxigénicos aislados, la existencia de fallas en el control de los puntos críticos durante la precosecha, cosecha y postcosecha y la necesidad de datos actualizados que permitan conocer la distribución y concentración de estos mohos y sus toxinas en cereales de consumo masivo, ya que podrían ocasionar efectos nocivos en la salud humana y animal, se establece la importancia de evaluar la microbiota contaminante y contenido de aflatoxinas de granos de maíz blanco (*Zea mays* L.) de once híbridos provenientes de los estados Guárico y Yaracuy, Venezuela.

**Muestra.** Durante el ciclo de siembra del año 2010-2011 se recolectaron muestras de granos de doce híbridos experimentales provenientes del Programa de Mejoramiento Genético del Maíz llevado a cabo por la Fundación para la Investigación Agrícola DANAC cultivados en los estados Guárico y Yaracuy (Venezuela).

**Diseño experimental.** El diseño utilizado fue de bloques completos al azar sin repeticiones en parcela experimental de 5 hileras (20 plantas por hilera) con una densidad de plantas de 0,50 x 0,80 m considerando el muestreo al inicio parte media y final de cada línea del híbrido. De la cosecha de las plantas en cada parcela se tomó una muestra representativa de 2 kg. Seguidamente, se acondicionaron a 12 % de humedad y fueron trasladadas al Laboratorio de Micotoxicología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en el estado Aragua para su análisis.

### Análisis micológico

**Desinfección y siembra.** Fueron seleccionados 100 granos sin daños mecánicos ni por insectos de cada muestra. Bajo una campana de flujo laminar, se desinfectaron los granos con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3,27% durante 30 seg; luego, se eliminó el contenido de NaClO de la superficie del mismo, lavándolos tres veces con agua destilada estéril; posteriormente, se dejaron secar en placas de Petri con papel de filtro estéril y fueron sembrados en la superficie del medio agarificado malta-sal-agar (MSA). Se incubaron por un período de ocho días a temperatura de 25±2 °C en alternancia de 12 horas luz/oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se examinaron con una lupa estereoscópica con el fin de determinar el número de granos colonizados totales y por especie. Los resultados fueron expresados como incidencia (%) total de granos colonizados por mohos e incidencia (%) de colonización por especie de la siguiente manera: baja (<15%), intermedia (15-30%) y alta (>30%) (4).

**Identificación y cuantificación de mohos.** Los granos que presentaron colonias esporulantes del moho o al menos un conidióforo emergiendo de la testa se consideró colonizado. Se cuantificaron todos los granos que resultaron colonizados por los diferentes mohos toxigénicos y atoxigénicos (13).

Seguidamente, se reaislaron del grano todas las especies de mohos toxigénicos y atoxigénicos en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a pH 5,8 y se incubaron a temperatura de 25±2 °C por ocho días con alternancia luz/oscuridad. Posteriormente, se determinaron las características macroscópicas siguientes: diámetro y color en la cara superior e inferior de la colonia, micelio inmerso o aéreo, presencia de exudado, entre otras. Posteriormente, se realizaron preparados en láminas por impresión con cinta adhesiva y dilacerado de la colonia para observar las estructuras con valor taxonómico y se compararon con la literatura especializada (18).

**Análisis de aflatoxinas.** Se utilizó el método inmunoquímico Aflatest con columnas de inmunodifusión específicas para aflatoxinas B1+B2, el cual se fundamenta en detectar la aflatoxina B1 + B2 utilizando anticuerpos monoclonales. Este método posee una sensibilidad 0,50 y 500,00 ng/g. Se utilizó un fluorómetro "Tor-bex-Fx-100 (VICAM) serie 4", el cual se calibró antes de cada serie utilizando soluciones patrón de concentraciones conocidas de

la toxina. Posteriormente se introdujo el extracto de la muestra (toxina + metanol puro + revelador) y después de un minuto fue tomada la lectura en ng/g (19).

**Análisis de datos.** Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS Statistics versión 17.0 (17), fueron calculados los estadísticos descriptivos y evaluados los supuestos de la varianza correspondientes. Seguidamente, los datos fueron analizados mediante las pruebas de T de Student y de Kolmogorov-Smirnov para la comparaciones de medias correspondientes, bajo un nivel de significancia de  $p=0,05$ .

## RESULTADOS

Los once híbridos evaluados en este estudio presentaron una alta incidencia fúngica total, la cual fue mayor en los híbridos cultivados en el estado Guárico (68,68%) con respecto a los del estado Yaracuy (45,59%). El análisis de los resultados evidenciaron diferencias estadísticas significativas ( $p=0,04$ ) entre ambos estados. El genotipo D1B-270 en el estado Guárico mostró el mejor comportamiento al contrastar con el resto de los híbridos analizados, ya que éste fue el único que presentó una incidencia intermedia (29%) (Cuadro 1 y 2).

**Especies toxigénicas aisladas.** Tanto en Guárico como en Yaracuy, los mohos toxigénicos aislados estuvieron representados por *A. flavus*, *A. niger*, *E. chevalieri*, *F. verticillioides* y *Penicillium* sp.; *A. terreus*, *A. ochraceus* y *Aspergillus* sp. solamente fueron detectados en el estado Guárico (Cuadro 1 y 2).

En el estado Yaracuy los mohos que presentaron mayor incidencia promedio en las muestras analizadas fueron *A. flavus* (24,22%), *F. verticillioides* (14,63%) y *Penicillium* sp. (4,41%) (Cuadro 1); no obstante, en el estado Guárico la especie de mayor incidencia fue *F. verticillioides* (16,77%) (Cuadro 2). Al comparar el porcentaje de incidencia de especies fúngicas en cada híbrido siguiendo los criterios de clasificación de la incidencia de mohos propuesta por Mazzani *et al.* (11), en el estado Yaracuy la incidencia de *A. flavus* fue intermedia en la mayoría de los casos, mientras que *F. verticillioides* y

Cuadro 1. Especies fúngicas identificadas y concentración de aflatoxinas en granos de híbridos de maíz blanco cosechados en el estado Yaracuy, ciclo de verano 2010-2011.

Híbrido	AF <sup>(1)</sup>	AN <sup>(1)</sup>	FV <sup>(1)</sup>	PSP <sup>(1)</sup>	MT <sup>(1)</sup>	AFLA <sup>(1)</sup>
DK-357	14 <sup>(2)</sup>	1	21	14	59	6,4 <sup>(3)</sup>
D1B-270	14,5	0	22,5	3,5	45	26,25
D1B-683	10,5	0	16,5	3,5	31	19,4
D2B-290	49	1	11	3	63	80
D1B-348	21	0	23	8	55	47
D1B-265	26	0	11	7	44	15
D1B-718	24	1	15	5	44	10
D1B-246	23	0	0	1	31	15
D1B-287	12,5	0	29	1,5	41,5	18,6
D2B-259	39	0	3	1	41	53
D1B-255	34	0	9	1	47	1
Media	24,22	0,27	14,63	4,41	45,59	26,51

<sup>(1)</sup>AF: *A. flavus*; AN: *A. niger*; ECH: *E. chevalieri*; FV: *F. verticillioides*; PSP: *Penicillium* sp.; MT: Mohos totales; AFLA: aflatoxinas. <sup>(2)</sup> Incidencia fúngica (%). <sup>(3)</sup> ng/g.

Cuadro 2. Especies fúngicas identificadas y concentración de aflatoxinas en granos de híbridos de maíz blanco cosechados en el estado Guárico, ciclo de verano 2010-2011.

Híbrido	AF <sup>(1)</sup>	AN <sup>(1)</sup>	FV <sup>(1)</sup>	PSP <sup>(1)</sup>	MT <sup>(1)</sup>	AFLA <sup>(1)</sup>
DK-357	1 <sup>(2)</sup>	0	35,5	8	85	0,94 <sup>(3)</sup>
D1B-287	18	5	19	41	29	0,78
D1B-683	0,5	0	25,5	5,5	56,5	3,75
D1B-265	2	0	18	0	74	69
D1B-246	17	0	2	19	80	0,96
D1B-270	0	0	16	3	50,5	2,3
D1B-718	1,5	0	20,5	2,5	90	9,9
D1B-348	11	0	6	47	89	17
D1B-255	1	1	15	21	85	74
D2B-290	0	2	12	1	69	1,9
D2B-259	3	0,5	15	4	47,5	2,9
Media	5	0,77	16,77	13,82	68,68	16,67

<sup>(1)</sup>AF: *A. flavus*; AN: *A. niger*; FV: *F. verticillioides*; PSP: *Penicillium* sp. MT: Mohos totales, AFLA: Aflatoxina. <sup>(2)</sup> Incidencia fúngica (%). <sup>(3)</sup> ng/g

*Penicillium* sp. presentaron una baja incidencia. Los híbridos que presentaron una alta incidencia de *A. flavus* y a su vez baja de *F. verticillioides* en este estado fueron D1B-255, D2B-259 y D2B-290. De forma contraria, el híbrido D1B-683 presentó baja incidencia de *A. flavus* con una incidencia intermedia de *F. verticillioides* (16,5%) (Cuadro 1).

En el estado Guárico, la incidencia de *A. flavus* los híbridos D1B-265, DK-357, D1B-270, D1B-718 y D2B-259 presentaron incidencias de intermedia a alta para *F. verticillioides* y baja para *A. flavus* (Cuadro 2).

**Contenido de aflatoxinas.** El contenido promedio de aflatoxinas fue mayor en los híbridos cosechados en el estado Yaracuy (26,51 ng/g) al comparar con el estado Guárico (16,67 ng/g) (Cuadro 1 y 2). Los contenidos de aflatoxinas en el estado Yaracuy variaron entre 1,00 y 80 ng/g, cuatro híbridos excedieron el límite de 20 ng/g (D1B-270, D2B290, D1B-348, D2B-259). En Guárico los contenidos de aflatoxinas variaron entre 0,68 y 74 ng/g, excediendo el límite solo dos de los híbridos (D1B-348 y D1B-255).

De todas las muestras evaluadas, el híbrido DK-357 fue el que presentó menor incidencia fúngica y menor contenido de aflatoxinas en los dos estados evaluados.

## DISCUSIÓN

La microbiota encontrada en ambos estados resultó muy variable, coincidiendo con los resultados obtenidos por Mazzani *et al.* (13) y Chavarri *et al.* (4) en siembras extensivas de maíz de seis estados de Venezuela, y en general con una mayor incidencia promedio de mohos toxigénicos; asimismo, fue intermedia para *F. verticillioides* (18,9%) y baja para *A. flavus* (12,8%). No obstante, las frecuencias resultaron altas en ambos casos (96,6% y 80%, respectivamente). Resultados similares han sido encontrados en siembras de maíz, experimentales y comerciales, en Venezuela y Latinoamérica (7,13).

**Incidencia de mohos toxigénicos.** En el estado Yaracuy la incidencia promedio de los mohos toxigénicos de importancia fue intermedia para *A. flavus* (24, 22%) y baja

para *F. verticillioides* (14,63%), contrario al comportamiento de los mismos para el estado Guárico. Resultados similares fueron encontrados en ensayos realizados en muestras de granos de maíz de siembras experimentales y comerciales cosechadas en el mismo estado (10), mientras que Chavarri *et al.* (4) y Luzón *et al.* (7) reportaron incidencias inusualmente bajas de *A. flavus* (0,0 y 4,13%, respectivamente). Diferencias en las poblaciones de una misma especie entre ciclos de cultivo en una misma localidad sugieren el carácter determinante de las condiciones ambientales, en especial la disponibilidad de agua, las poblaciones de insectos y la concentración de inóculo primario sobre el crecimiento de los mohos (12).

Asimismo, al comparar la incidencia de *F. verticillioides* encontrada en este ensayo con investigaciones similares para el mismo estado, se evidencian resultados contrastantes, incidencias desde 4,13% hasta 33,8% (4,13). Esto se puede atribuir a las condiciones ambientales imperantes durante los ciclos de producción, demostrado en investigaciones *in vitro* y en el campo (9).

En el estado Guárico, la incidencia de *F. verticillioides* fue intermedia (16,7%), similar a la encontrada por Chavarri *et al.* (4) en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. No obstante, difiere de lo reportado por Mazzani *et al.* (11,12,13), quienes detectaron una incidencia alta (>30%) en muestras de granos de maíz provenientes de Yaracuy, Guárico y Portuguesa. La incidencia de *F. verticillioides* encontrada en esta investigación se relaciona estrechamente con los factores ambientales de la zona de producción, las diferencias en las prácticas culturales de cultivo y la presencia y asociaciones con otras poblaciones de hongos, presión de inóculo y susceptibilidad de los híbridos, citado por Mazzani *et al.* (13) y Magan (8).

La baja incidencia (promedio) de *A. flavus* encontrada en Guárico (5%) coincide con lo reportado por Mazzani *et al.* (10). Esta tendencia diferencial en la incidencia de *A. flavus* y *F. verticillioides* (de baja a intermedia, respectivamente), también encontrada por Chavarri *et al.* (4) y Mazzani *et al.* (11), quienes señalan que puede deberse a diferencias en la resistencia genética de un mismo híbrido ante diferentes mohos (21).

**Contenido de aflatoxinas.** Los altos contenidos de aflatoxinas en el estado Yaracuy se corresponde con la alta incidencia de *A. flavus*, contrario a los resultados obtenidos en el estado Guárico. La variabilidad detectada en esta toxina en ambos estados, se debe a las diferencias encontradas en contenidos de aflatoxinas con valores bajos y altos, como ha sido reportado por Chavarri *et al.* (4) y Mazzani *et al.* (10), pero difiere de las investigaciones realizadas por Luzón *et al.* (7) quienes al evaluar 21 híbridos experimentales para el mismo estado no encontraron contenidos de toxinas. En investigaciones previas (12,13) se ha evidenciado que la concentración de aflatoxinas puede variar entre híbridos, no solo por la presión de inóculo que se genera en el campo por mohos altamente toxigénicos, sino también por múltiples factores bióticos y abióticos que pueden desencadenar una síntesis de metabolitos secundarios durante la idiofase (fase en la que el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo); es por ello, que la resistencia a la infección y/o síntesis de aflatoxinas continua siendo una estrategia primordial para prevenir su acumulación en granos (2).

En tal sentido, algunos autores han sugerido que los mecanismos genéticos que regulan la biosíntesis de aflatoxinas son diferentes a los que regulan la susceptibilidad a la especie fúngica que la sintetiza (2, 12). Igualmente, estas diferencias entre poblaciones del moho y su capacidad aflatoxigénica para los dos estados en estudio, reflejan el comportamiento de los genotipos ante condiciones ambientales distintas (4).

Por otra parte, en el ámbito nacional e internacional hay mucha información sobre la detección de hongos y aflatoxinas en granos de maíz (15, 20). Por lo tanto, es necesario el monitoreo riguroso y continuo del contenido de aflatoxinas en granos de maíz, ya que este cereal forma parte de la dieta del Venezolano, y si está contaminada con las aflatoxinas, puede ocasionar un riesgo de salud pública. Además, las condiciones imperantes en Venezuela, propias de áreas tropicales, favorecen la proliferación de hongos y la síntesis de ésta toxina en granos de maíz. En estudios recientes en México se han encontrado correlaciones positivas y significativas en los niveles de aflatoxinas libre detectadas en hígados con hepatocarcinoma celular en humanos (3,5).

## LITERATURA CITADA

1. Binder, L., Tan, L., Chin, L., Anld, J. and Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of micotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Sci. Tech.* 137:256-282.
2. Brown, R., Chen, L., Clevenlad, T. and Russin, J. 2001. Advances in the development of host resistance in corn to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 89:113-117.
3. Carvajal, M., Díaz, M., Aristi, G., Espinosa, J., García, A. and Méndez, I. 2010. Presentence of free and adducted aflatoxins and hidroxlated metabolites in human hepatocarcinomas in México. *In: Memorias VI Latin American Congress og Mycotoxicology and II International Symposium on Algal and Fungal Toxins for Industry.* Mérida Yucatan, México. p: 30-31.
4. Chavarri, M., Luzón, O., Mazzani, C., González, C., Alezones, J. y Garrido, M. 2009. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los Estados Yaracuy y portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 22:2-7.
5. Dotis, J., Iosifidis, E. and Roilides, E. 2007. Central nervous system aspergillosis in children: a systematic review of reported cases:Review. *International Journal of Infectious Diseases* 11:38-39.
6. Flores, C., Hernández, L. y Vázquez, J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimentos balanceados y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica pecuaria en México* 44:247-256.
7. Luzón, O., Chavarri, M., Mazzani, C., Barrientos, V. y Alezones, J. 2007. Principales mohos y micotoxinas asociados a granos de maíz en campos de los estados Guárico, Portuguesa y Yaracuy, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 20:25-30.
8. Magan, N. 2000. Ecology and potential control of mycotoxigenic fungi and micotoxins in cereals. En: *Memorias III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología.* Córdoba, Argentina. p. 11.
9. Mazzani, C., Luzón, O., Chavarri, M., Alezones, J. 2009. Metodología rápida para evaluar *in vitro* la respuesta de genotipos de maíz a la acumulación de aflatoxinas, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 19:10-14.
10. Mazzani, C., Borges, O., Luzon, O., Barrientos, V. y Quijada, P. 1999. Incidencia de *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12:9-13.
11. Mazzani, C., Borges, O., Luzon, O., Barrientos, V. y Quijada, P. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 17:185-195.
12. Mazzani, C., Luzón, O., Beomont, P. y Chavarri, M. 2004. Micobiota asociada a granos de maíz en Venezuela y capacidad aflatoxigénica *in vitro* de los aislamientos de *Aspergillus flavus*. *Fitopatol. Venez.* 17: 19-23.

13. Mazzani, C., Luzón, O., Chavarri, M., Fernández, M. y Hernández, N. 2008. *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 21:18-22.
14. Muture, B. and Ogana, G. 2005. Aflatoxin levels in maize and maize products during the 2004 food poisoning outbreak in Eastern Province of Kenya. *East African Medical Journal* 82: 275-279.
15. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. [www.fao.org/docrep/007/y5499s07.htm](http://www.fao.org/docrep/007/y5499s07.htm) [Consultada: Mayo 11, 2013].
16. Peráica, M, Radic, B., Lucic, A. y Pavlovic, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en los seres humanos. *Bulletin of World Health Organization* 77:54-766.
17. Quintín, M. y Cabero, M. 2008. Tratamiento estadístico con SPSS. Thomson, Madrid, España. Pp. 29-50.
18. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. 1995. *Introduction to Food-Borne Fungi*. 4<sup>th</sup> ed. Wageningen, The Netherland. Ponsen and Looyen. 322 pp.
19. Scott, P. and Trucksess, M. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International* 80:941-949.
20. Yoshigawa, T., Yamashita, A. and Chokethaworn, N. 1996. Occurrence of fumonisin and aflatoxin in corn from Thailand. *Food Additives and Contaminants* 13:163-168.
21. Zummo, N. and Scout, G. 1992. Interaction of *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus flavus* on kernels infection and aflatoxin contamination in maize aers. *Plant. Dis.* 76: 771-773.