

RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE HIERRO, COBRE Y ZINC Y LA INCIDENCIA DE *ASPERGILLUS FLAVUS*, *FUSARIUM MONILIFORME*, AFLATOXINAS Y FUMONISINAS EN MAÍZ

Rosa Raybaudi¹, Claudio Mazzani², Ibeth Benítez¹, Amaury Martínez¹, Odalis Luzón² y Carlos González³

Universidad Central de Venezuela,¹Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Apartado Postal 47097, Caracas 1041 A; ²Facultad de Agronomía, Instituto de Química y Tecnología, Laboratorio de Micotoxicología, Apartado Postal 4579, Maracay 2101 A; ³Fundación para la Investigación Agrícola DANAC, Apartado Postal 182, San Javier, Venezuela.

Recibido: 10 de junio de 2004

Aceptado: 28 de enero de 2005

RESUMEN

Raybaudi, R., Mazzani, C., Benítez, I., Martínez A., Luzón, O. y González, C. 2005. Relación entre las concentraciones de hierro, cobre y zinc y la incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en maíz. *Fitopatol. Venez.* 18: 15-19.

Se evaluó la concentración de hierro (*Fe*), cobre (*Cu*) y zinc (*Zn*) en muestras de suelo y maíz, y su relación con la incidencia de aflatoxinas y fumonisinas en ensayos en tres localidades de Venezuela. Se determinó la población de *Aspergillus flavus* y *Fusarium moniliforme*, en suelo y maíz, por conteo en placas con el medio DRBC, las micotoxinas por inmunoensayos específicos y la concentración de minerales mediante espectroscopia de absorción atómica de llama. La población de *A. flavus*, en suelo y maíz, no mostró diferencias entre localidades ni épocas de muestreo, siendo mayor en muestras de Sta. Cruz de Turén. La población de *F. moniliforme* mostró diferencias significativas entre localidades, épocas de muestreo y en su interacción en el suelo, y no significativas en maíz, siendo mayor en muestras de Sabana de Parra. El *Fe* presentó la mayor concentración en el suelo y el *Cu* la menor. Los contenidos de *Fe*, *Cu* y *Zn* en el suelo fueron significativamente diferentes entre localidades, así como en maíz el *Cu* y el *Zn*. Las muestras de Sta. Cruz de Turén presentaron la mayor frecuencia e incidencia de aflatoxinas y fumonisinas. Se encontró correlación entre el *Fe* en el suelo y los niveles de aflatoxinas en Sabana de Parra y Sta. Cruz de Turén, y también con el *Cu* en la última localidad. En todos los casos, la correlación fue positiva y significativa entre los tres metales y los contenidos de fumonisinas.

Palabras clave adicionales: metales, micotoxinas, *Zea mays*.

ABSTRACT

Raybaudi, R., Mazzani, C., Benítez, I., Martínez A., Luzón, O. and González, C. 2005. Relationship among iron, copper and zinc concentrations and *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxins and fumonisins incidence in maize. *Fitopatol. Venez.* 18: 15-19.

The iron (*Fe*), copper (*Cu*) and zinc (*Zn*) concentrations were analyzed in soil and maize kernels from three locations of Venezuela to determine its relation with aflatoxin and fumonisins. *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* populations was determined by plate count in the DRBC medium. Mycotoxins were quantified by specific immunoassays. *Fe*, *Cu* and *Zn* concentrations, in soil and maize, were estimated by atomic absorption spectroscopy with flame. *A. flavus* populations in soil and maize not showed differences among locations, neither between soil sampling time. Greater *A. flavus* population was found at Sta. Cruz de Turén. Significant differences among locations, soil sampling time and in the interaction locations x soil sampling time were found for *F. moniliforme* populations in soil and non significant differences were found in maize. Greater *F. moniliforme* population was found at Sabana de Parra. The *Fe* showed the greater concentrations in the three locations while the *Cu* was the lowest. *Fe*, *Cu* and *Zn* concentrations in the soil showed significant differences among locations while *Cu* and *Zn* in maize. Samples from Sta. Cruz de Turén showed the greater frequency and incidence of aflatoxins and fumonisins. Positive correlation between aflatoxins and *Fe* in the soil was found at Sta. Cruz de Turén and Sabana de Parra. Also the *Cu* was correlated with aflatoxins at Sta. Cruz de Turén. Positive significant correlation between fumonisins and *Fe*, *Cu* and *Zn* concentrations in soil and maize kernels was found. Additional key words: metals, mycotoxins, *Zea mays*.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia en Venezuela, forma parte esencial de la dieta del venezolano y es cultivado en la mayoría de los estados del país, siendo los principales productores Portuguesa, Guárico, Barinas, Yaracuy y Bolívar. Es susceptible a la colonización de sus granos por mohos, los cuales producen pérdidas económicas importantes, especialmente en países tropicales como Venezuela, donde la temperatura y la humedad relativa en algunas zonas productoras le son favorables. Además, las deficiencias en las prácticas agronómicas, en el transporte y en las condiciones de almacenamiento acentúan el problema. Los granos de cereales contaminados pueden presentar decoloración y manchado, disminución del valor nutricional, pérdida de peso y contaminación con micotoxinas (9,10).

Las micotoxinas pueden tener efectos adversos en animales y humanos como inmunosupresión, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis. Las más comunes encontradas en cantidades significativas en alimentos y piensos naturalmente contaminados son aflatoxinas, deoxinivalenol (DON), zearalenona y fumonisinas. Pueden estar presentes

en maíz y otros cereales, maní, semillas de algodón y nueces. Las aflatoxinas, identificadas a principios de 1960, son un grupo de micotoxinas estructuralmente relacionadas y son potentemente hepatotóxicas, teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas. Estas micotoxinas son producidas principalmente por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*; las de mayor interés son B₁, B₂, G₁, G₂ y M₁ (8,10). Las fumonisinas, descubiertas en 1988, son micotoxinas producidas fundamentalmente por *Fusarium verticillioides* (syn. *Fusarium moniliforme* estado sexual *Gibberella fujikuroi*), patógeno de distribución mundial del maíz (3,7,17), y por *Fusarium proliferatum* (1,9).

El desarrollo de los mohos y la producción de micotoxinas solo ocurre en ambientes favorables, en presencia de nutrientes y bajo ciertas condiciones necesarias para su metabolismo. Los factores ambientales juegan un papel primordial en la contaminación de los granos con micotoxinas, entre éstos la temperatura, actividad de agua, pH, tipo de sustrato, concentración de gases y competencia microbiana (16). Además, diversos estudios han mostrado que existe relación entre los niveles de ciertos metales en suelo y en los granos de los cereales, y la concentración de micotoxinas en los mismos (2,6,15).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la posible correlación entre las concentraciones de hierro, cobre y zinc en muestras de suelo y de granos, y la incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en maíz de tres localidades de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Se tomaron 72 muestras de suelo (36 durante la siembra y 36 durante la cosecha) y 36 muestras de granos de maíz blanco (12 por localidad) de siembras experimentales en Sabana de Parrra, estado Yaracuy, y Santa Cruz de Turén y Agua Blanca, estado Portuguesa. En el suelo se tomaron muestras compuestas formadas por la mezcla de 5 submuestras colectadas a 5 – 10 cm de profundidad y al azar en distintos puntos de la hilera y a 50 cm de la planta. Las muestras fueron trasladadas al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos para su análisis micotológico y al Instituto de Química para el análisis de metales, ambos Institutos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Las muestras de maíz fueron obtenidas por el desgranado manual de todas las mazorcas cosechadas de cada parcela, de las cuales se separó una submuestra de 1Kg.

Análisis micológico. Se pesaron 11 g de muestra (suelo o maíz molido), se suspendieron en 99 mL de agua peptonada al 0,1 % + tween 80 al 0,01 % (dilución 10^{-1}) y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . Cada dilución (0,1 mL) se sembró por extensión en superficie en placas con dicloran rosa de Bengala cloranfenicol agar (DRBC) por duplicado, las cuales se incubaron a 22 ± 2 °C durante 3 a 5 d. Se realizó el recuento presuntivo macroscópico de *A. flavus* y *F. moniliforme*. La identificación de especies se confirmó sobre la base del estudio características morfológicas con valor taxonómico y su comparación con descripción en publicaciones especializadas (5,18,19).

Determinación de hierro, cobre y zinc. Se realizó, tanto en suelo como en maíz, sobre muestras de 200 g. Cada muestra de suelo fue tratada con 2 mL de HCl al 37% p/p y 8 ml de una mezcla 2:1 de HNO₃ al 65% p/p y H₂SO₄ al 98 % p/p. Se calentó la muestra durante 180 min a ca. 170°C evitando la ebullición de los ácidos; se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se trasvasó cuantitativamente a un balón de 50 mL y se realizó la determinación de los metales en un equipo de espectroscopia de absorción atómica de llama marca GBC modelo AVANTA, con una lámpara de cátodo hueco como fuente generadora de radiación. Cada muestra de maíz se trató con 8 ml de H₂SO₄ al 98% p/p, a una temperatura de ca. 170°C, adicionando lentamente H₂O₂ al 30% v/v hasta aclarar la solución, se enfrió hasta temperatura ambiente y se trasvasó cuantitativamente a un balón de 50 mL para realizar la espectroscopia, de la misma forma como se realizó en muestras de suelo (2,6).

Determinación de aflatoxinas y fumonisinas. El contenido de aflatoxinas B₁+ B₂ y fumonisinas B₁+ B₂ en los granos se cuantificó por métodos inmunoquímicos, Aflatest P y Fumonitest (Vicam Sci. Tech.), respectivamente, los cuales utilizan anticuerpos monoclonales específicos para cada una de esas toxinas.

La extracción de aflatoxinas se realizó en 50 g de muestra y 100 mL de metanol - agua (80:20) + 5 g de NaCl, por licuación a alta revolución durante 1 min. Se filtró a través de papel y 10 mL se diluyeron en 40 mL de agua destilada, se filtró a través de microfibras de vidrio y 10 mL del extracto diluido se pasaron a través de la columna (aflatest) a baja velocidad. Después de 2 lavados con agua destilada, se secó la columna y se extrajeron las aflatoxinas con 1 mL de metanol grado HPLC el cual se recolectó en un tubo de borosilicato. Al extracto se le añadió 1 mL del revelador de aflatoxinas (solución de bromo diluida).

La extracción de fumonisinas se realizó de igual manera que las aflatoxinas, pero el extracto se diluyó con 40 mL de buffer fosfato (PBS) + Tween 20 al 0,1%, se filtró a través de microfibras de vidrio y 10 mL del extracto diluido se pasaron a través de la columna (fumonitest). Se realizaron tres lavados: uno con 10 mL de PBS + Tween 20, otro con 10 ml de PBS y uno con 10 mL de agua destilada. Se secó la columna, se extrajeron las fumonisinas con 1 mL de metanol grado HPLC, el cual se recolectó en un tubo de borosilicato, y se le añadieron los reveladores de fumonisinas (0,5 mL de OPA y 0,5 mL de 2-mercaptoetanol). Para ambas toxinas, se midió la fluorescencia en un fluorómetro marca BBI Source Scientific serie 4 previamente calibrado para cada una (20).

Tratamiento estadístico de los resultados. Se utilizó el programa SAS versión 8.1 para todos los análisis. Los recuentos de *A. flavus* y *F. moniliforme*, así como los contenidos de hierro, cobre y zinc en muestras de suelo se analizaron bajo un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo factorial de tratamientos (3 localidades; 2 épocas de muestreo). Los recuentos de los mohos y los contenidos de aflatoxinas y fumonisinas en las muestras de granos de maíz se analizaron bajo un diseño completamente aleatorizado. En todos los casos se utilizaron 12 observaciones por tratamiento. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y comparaciones de medias por el test de rangos múltiples de Duncan. Los estudios de correlación, entre los niveles de aflatoxinas y de fumonisinas con las concentraciones de hierro, cobre y zinc en el suelo (siembra y cosecha) y en los granos, se realizaron por la prueba de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población de *Aspergillus flavus* y de *Fusarium moniliforme* en suelo y maíz. Los recuentos de *A. flavus* en el suelo variaron desde < 2 hasta 2,4 Log₁₀ ufc/g a la siembra y desde < 2 hasta 2,7 Log₁₀ ufc/g a la cosecha, mientras los de *F. moniliforme* variaron desde < 2 hasta 3,4 Log₁₀ ufc/g y desde < 2 hasta 3,7 Log₁₀ ufc/g a la siembra y a la cosecha, respectivamente (Figs. 1 y 2). El análisis de varianza de los recuentos de *A. flavus* en el suelo no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre localidades, entre épocas de muestreo, ni en la interacción localidad x época de muestreo [Coeficiente de variación (c.v.): 8,03%]. *A. flavus* es una especie común en suelos agrícolas, más en áreas previamente cultivadas con maíz en regiones tropicales, por lo que es usual la consistencia observada en las poblaciones de este moho en el suelo en las tres localidades (Fig. 1). El análisis de varianza de la población de *F. moniliforme* en el suelo arrojó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre

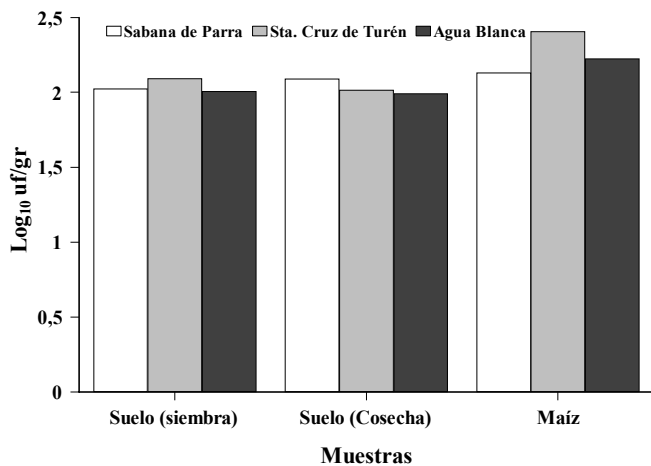


Fig. 1. Recuentos de *Aspergillus flavus* en muestras de suelo y de granos de maíz por localidad y época de muestreo.

épocas de muestreo y localidades, así como en la interacción época de muestreo x localidad (c.v.: 16,5%) observándose la mayor población en Sabana de Parra, estado Yaracuy, en muestras recolectadas a la siembra (Fig.2).

En los granos de maíz, los recuentos de *A. flavus* variaron desde < 2 hasta 3,8 Log₁₀ ufc/g y los de *F. moniliforme* desde < 2 hasta 2,7 Log₁₀ ufc/g (Figs. 1 y 2). El análisis de varianza de los recuentos de *A. flavus* en las muestras de maíz, no mostró diferencias significativas (p = 0,05) entre localidades (c.v.: 18,6%). El mayor número de muestras de granos contaminadas por esta especie provenían de Santa Cruz de Turén, estado Portuguesa. El análisis de varianza de los recuentos de *F. moniliforme* en las muestras de maíz, no mostró diferencias significativas (p = 0,05) entre localidades (c.v.: 9,01%). Esta especie, patógeno primario en maíz, es altamente cosmopolita y un alto grado de colonización por este moho desde el campo es común en Venezuela. También se ha determinado similares niveles de colonización en granos de maíz, tanto por *A. flavus* como por *F. moniliforme*, en investigaciones previas con muestras de los estados Portuguesa y Yaracuy (11,12,13).

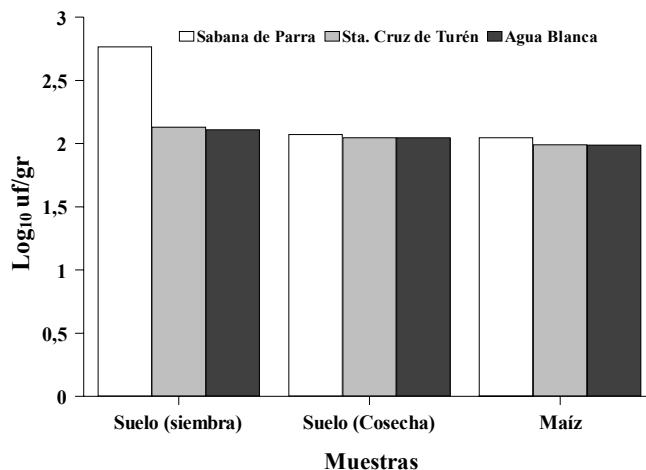


Fig. 2. Recuentos de *Fusarium moniliforme* en muestras de suelo y de granos de maíz por localidad y época de muestreo.

Contenido de cobre, hierro y zinc en el suelo y en los granos de maíz. En la fig. 3 se presentan los contenidos promedio de hierro, cobre y zinc en muestras de suelo y maíz por localidad y por época de muestreo (suelo). El metal encontrado en mayor concentración en las muestras de suelo fue el hierro, mientras que el cobre fue el de menor concentración. Los análisis de varianza mostraron diferencias significativas (p = 0,05) entre localidades para el contenido de hierro, cobre y zinc, mientras que entre épocas de muestreo las diferencias fueron significativas para contenidos de hierro y cobre. Se encontró significación en la interacción localidad x época de muestreo para los tres metales en estudio. Los metales determinados son elementos traza en los suelos y se encuentran en muy bajas concentraciones. No se consideran de importancia agronómica, por lo que su determinación y estudio en los suelos es muy poco frecuente. No se encontró en la literatura consultada publicaciones que permitieran comparar con resultados previos en estas u otras zonas de Venezuela y explicar las diferencias observadas en los niveles de metales entre las tres localidades.

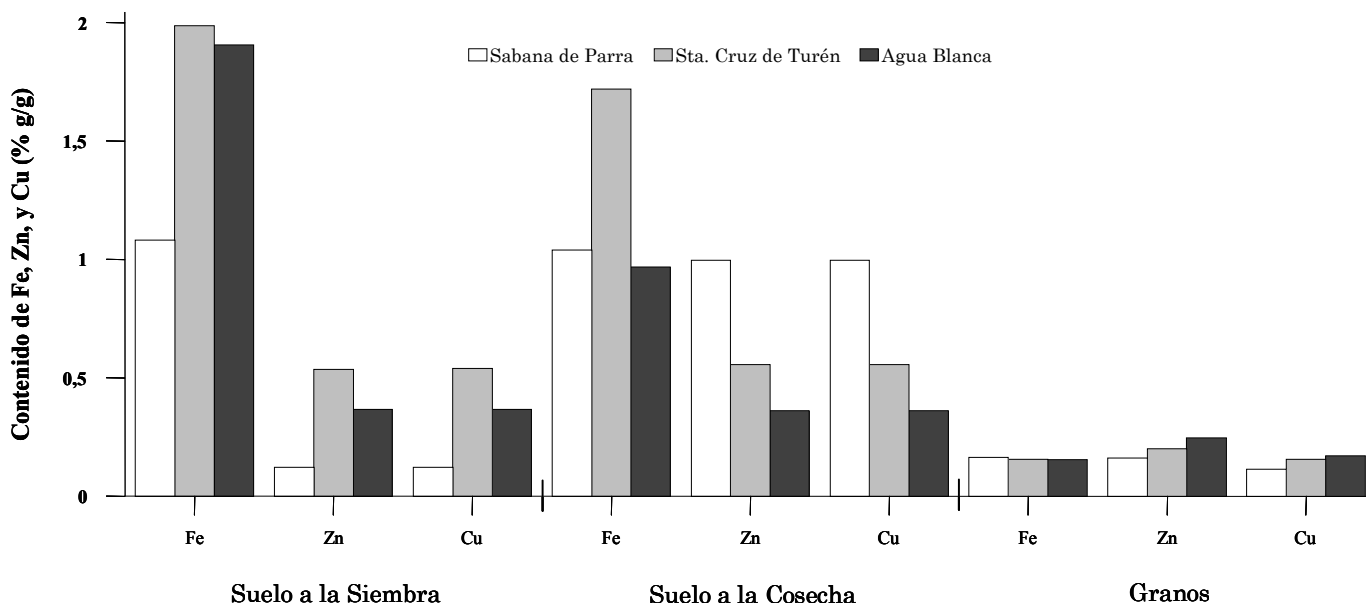


Fig. 3. Contenido de hierro, cobre y zinc en muestras de suelo y de granos de maíz en tres localidades de Venezuela.

Cuadro 1. Frecuencia, rango de incidencia y promedio del contenido de aflatoxinas y fumonisinas en muestras de maíz cosechadas de ensayos en tres localidades de Venezuela.

Localidad	Nº de muestras	Frecuencia n° (%)		Aflatoxinas (µg/g)	Fumonisinas (µg/g)
		Aflatoxinas	Fumonisinas		
Sabana de Parra	12	2 (17)	3 (25)	1,0 - 29,0 3,4	0,31 - 0,44 0,27
Sta. Cruz de Turén	12	10 (83)	5(42)	1,0 - 130,0 31,4	0,0 - 0,93 0,35
Agua Blanca	12	4 (33)	2 (16)	1,0 - 16,0 3,0	0,25 - 0,26 0,24

El metal encontrado en mayores cantidades en las muestras de maíz provenientes de Santa Cruz de Turén y Agua Blanca fue el zinc, mientras que en Sabana de Parra el hierro presentó el nivel más elevado. El cobre fue el que se encontró en menores cantidades. El análisis de varianza determinó diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles de cobre (c.v.: 15,3%) y zinc (c.v.: 14,4%) entre las tres localidades, sin significación en las diferencias encontradas para el hierro (c.v.: 28,7%). Los contenidos similares de hierro en los granos cosechados en las tres localidades no guardan relación aparente con la tendencia observada en los contenidos de este mineral en el suelo sea a la siembra como a la cosecha. Comportamiento similar se observó para el zinc y el cobre. Estos resultados sugieren que el nivel de acumulación de estos minerales en los granos es independiente de su contenido en el suelo. Los contenidos de zinc en muestras de maíz (16, 20 y 25 µg/g en Sabana de Parra, Santa Cruz de Turén y Agua Blanca, respectivamente) fueron considerablemente mayores a contenidos entre 0,25 y 0,56 µg/g encontrados en una investigación previa en Venezuela (15). En otra investigación, también en maíz, se determinó en promedio 17,6 µg/g de zinc, valor que se ubica en el rango de medias entre localidades y 158 µg/g de cobre, valor marcadamente mayor a 1 µg/g en Sabana de Parra, y 2 µg/g Santa Cruz de Turén y Agua Blanca (6).

Contenido de aflatoxinas y fumonisinas en granos de maíz. En el cuadro 1 se presentan los rangos y los promedios de los contenidos de aflatoxinas en las muestras de granos de maíz por localidad. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de aflatoxinas en las muestras de las tres localidades y un elevado coeficiente de variación (c.v.: 96,4%) común en los análisis de aflatoxinas en maíz. En la comparación de medias se encontró que los contenidos de aflatoxinas en las muestras de Sabana de Parra y Agua Blanca difirieron significativamente de los encontrados en las muestras de Santa Cruz de Túren, donde se presentó el mayor porcentaje de muestras positivas (83%), los mayores niveles de aflatoxinas (hasta 130 µg/g) y el 41,6% de las muestras con niveles superiores a 20 µg/g. Sin embargo, tales niveles de aflatoxinas son menores a los encontrados en cultivares de maíz blanco en ensayos y fincas del estado Yaracuy, durante los ciclos de cultivo 1994-95 y 1995-96, donde se determinó contaminación hasta 931,7 µg/g (12,13).

También en Venezuela, en maíz blanco de distintas procedencias de la cosecha 1995-1996, se obtuvo el 28% de

muestras con aflatoxinas desde 1 hasta 10 µg/g y en 71muestras de la cosecha 1998-1999 el 31% de las muestras presentaron aflatoxinas desde 1 hasta 16 ng/g (18). Estos resultados son comparables con la incidencia y niveles observados en muestras de Sabana de Parra y Agua Blanca. Asimismo, resultados similares son reportados del análisis de 41 muestras de maíz blanco, de las cuales alrededor del 15% presentó contaminación superior a 20 µg/g de aflatoxinas (4). Las diferencias obtenidas en la contaminación con aflatoxinas entre las muestras de ambas localidades del estado Portuguesa han sido observadas en investigaciones previas y atribuidas a variaciones ambientales (12,13).

En el análisis de fumonisinas se encontró el mayor porcentaje de muestras positivas (42%) y los mayores niveles (hasta 0,93 µg/g) en Santa Cruz de Turén. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre las tres localidades (c.v.: 19,7%). Estos resultados de incidencia y niveles de contaminación son bajos con relación a otras investigaciones sobre fumonisinas en maíz en Venezuela en las cuales se señala desde 83,8% hasta 100% de muestras positivas con concentraciones de hasta 13 µg/g (4,11,14,21). Sin embargo, otras investigaciones reportan resultados similares tanto de frecuencia como de incidencia de fumonisinas a los determinados en esta investigación (7,17).

El análisis de correlación mostró correlación positiva y significativa entre los contenidos de hierro y cobre en el suelo, tanto a la siembra como a la cosecha, solamente con los contenidos de aflatoxinas en los granos cosechados en Santa Cruz de Turén ($r: 0,57$ a $0,64$; $p < 0,05$). Se encontró correlación positiva y significativa entre los contenidos de hierro y de aflatoxinas en los granos de maíz cosechados en Sabana de Parra. En ningún caso se pudo correlacionar los contenidos de zinc en el suelo y en los granos con el contenido de aflatoxinas, a diferencia de otras investigaciones donde se señala correlación entre la presencia de aflatoxina B₁ y el contenido de zinc en los granos de maíz (15), mas no con su contenido en el suelo. En otro estudio que determinó el efecto del zinc y el cobre sobre el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas, se encontró que el zinc, en concentraciones de 3–5 µg/g, indujo el crecimiento del moho y la producción de aflatoxina B₁, sin observarse efectos favorables detectables del cobre sobre las variables medidas, mientras que, al contrario, redujo el crecimiento de *A. flavus* (2).

El análisis de correlación mostró correlación positiva y significativa entre los contenidos de hierro, cobre y zinc en el suelo, tanto a la siembra como a la cosecha, así como en los granos, con los contenidos de fumonisinas en los granos cosechados en en las tres localidades ($r: 0,78$ a $0,99$; $p < 0,01$).

En un estudio que determinó el efecto del zinc y el cobre sobre el crecimiento de *F. moniliforme* y la producción de fumonisinas se encontró que, al contrario, el y zinc en concentraciones de 3 – 5 mg/g no ejerció ningún efecto sobre el crecimiento del moho ni en la producción de fumonisinas, mientras que el cobre a las mismas concentraciones favoreció tanto el crecimiento como la producción de esas toxinas (2). No se encontró en la literatura revisada alguna investigación que confirme el efecto favorable del hierro sobre el crecimiento de los mohos y la síntesis de micotoxinas.

LITERATURA CITADA

1. Bullerman, L.B. and Tsai, W.J. 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. *Journal of Food Protection* 57: 541-546.
2. Cuero, R. 2000. Interactive action of metal ions, and fertilizer and mycotoxins formation: effects on toxigenic fungal DNA/RNA and growth. *Proceeding X Internacional IUPAC Simposium on Mycotoxins and Phytotoxins*. Sao Paulo, Brasil. pp. 165.
3. Desjardins, A. and Plattner, R. 2000. Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48: 5773-5780.
4. Escobar, E. 2000. Aislamiento, cuantificación e identificación de los principales mohos presentes en el grano de maíz (*Zea mays*) provenientes de los estados Portuguesa, Yaracuy y Bolívar, y determinación de los niveles de aflatoxinas y fumonisinas. Tesis de Grado. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 79 pp.
5. Fassatova, O. 1986. Mould and filamentous fungi in technical microbiology. *Progressing Industrial Microbiology*. Elsevier Publisher. Vol. 22. 74pp.
6. Fuenmayor, M. 1991. Efectos de las trazas metálicas sobre la producción de aflatoxinas. Tesis Mag. Sc. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 59 pp.
7. Hirooka, E., Yamaguchi, M.M., Aoyama, S., Sugiura, Y. and Ueno, Y. 1996. The natural occurrence of fumonisins in brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants* 13: 173-183.
8. Li, F-Q., Takumi, Y., Osamu, K., Luo, X-Y. and Li, Y-W. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49: 4122-4126.
9. Martín, S., Albareda, X., Ramos, A.J. and Sanchis, V. 2001. Impact of environment and interactions of *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum* with *Aspergillus parasiticus* on fumonisin B₁ and aflatoxins on maize grains. *Journal of Science Food Agriculture* 81: 1060-1068.
10. Martínez, A. 1998. Deterioro fúngico de los alimentos e impacto económico de las micotoxinas. *Annales Venezolanas de Nutrición* 11: 37-47.
11. Mazzani, C., Borges, O., Luzón O., Barrientes, V. y Quijada, P. 2001. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in kernels of maize hybrids in Venezuela. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 345-349.
12. Mazzani, C., Borges, O., Luzón O., Barrientes, V. y Quijada, P. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, aflatoxinas, *Fusarium moniliforme* y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 17: 19-23.
13. Mazzani, C., Borges, O., Luzón O., Barrientes, V. y Quijada, P. 1997. *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en granos de cultivares de maíz blanco en fincas del estado Yaracuy (Venezuela). *Memorias II Congreso Latinoamericano de Micotoxicología*. Maracay, Venezuela. pp. 96-97.
14. Medina, M. 1993. Determinación de aflatoxinas y fumonisinas en maíz y evaluación de la amoniación como método de descontaminación. Tesis Mag. Sc. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 224 pp.
15. Monsalve, C. 1987. Incidencia de aflatoxinas en el maíz de uso industrial venezolano y efecto del proceso de extrusión en los niveles de aflatoxinas. Tesis de Grado. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 106 pp.
16. Northolt, M. and Bullerman, L. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection* 45: 921-924.
17. Pittet, A., Parisod, V. and Schellenberg, M. 1992. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn-based products from the Swiss market. *Journal Agricultural Food Chemistry* 40: 1352-1354.
18. Raybaudi, R. 1999. Evaluación de diferentes métodos y medios micológicos para la recuperación de mohos micotoxigénicos y determinación de aflatoxinas y fumonisinas. Trabajo de Ascenso. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 171 pp.
19. Samson, R., Hoekstra, R., Frisvad, J. and Filtenborg, O. 1995. Introduction to food-borne fungi. 4th ed. Wageningen, The Netherlands. Ponsen and Looyen. 322 pp.
20. Trucksess, M. and Koeltzow, D. 1995. Evaluation and application of immunochemical methods for mycotoxins in food. *In* *Immunoanalysis of Agrochemicals: emerging technologies*. J. Nelson, A. Karu and R. Wong (eds.). Washington, DC. American Chemical Society. pp. 327-334.
21. Velásquez, I. 1999. Aislamiento, cuantificación e identificación de los principales mohos presentes en el maíz (*Zea mays* L.) del estado Portuguesa y del estado Bolívar y su relación con los niveles de aflatoxinas y fumonisinas. Tesis de Grado. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 74 pp.