# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

*"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"*

# DISTRIBUCIÓN AMBIENTAL DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN UN SISTEMA MAÍZ-SUELO, Y SU PROPUESTA DE CONTROL

Tesis para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES**


Presenta:

**KAREN CRISTINA SAEZ GOMEZ**

Director de tesis:

**D.C. Ricardo Munguía Pérez**

Asesores de Tesis:

| | |
|---|---|
| Co-director | D.C. Raúl Ávila Sosa Sánchez |
| Integrante Comité Tutoral | D.C. Esperanza Duarte Escalante |
| Integrante Comité Tutoral | D.C. Dolores Castañeda Antonio |
| Integrante Comité Tutoral | D.C. Alía Méndez Albores |
| Integrante Comité Tutoral | D.C. María Elena Ramos Cassellis |
| Integrante Comité Tutoral | D.C. María Del Rayo Santellan Olea |


Octubre 2023

**Mtro. Alfredo Avendaño Arenaza**
Director General de Bibliotecas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Presente

A través de este medio me dirijo a Usted para informarle que la tesis con título **DISTRIBUCIÓN AMBIENTAL DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN EL SISTEMA MAÍZ-SUELO, Y SU PROPUESTA DE CONTROL.,** ha sido avalada bajo los preceptos de integridad académica; por tanto, se autoriza la impresión de tesis del estudiante:

Nombre del alumno: **Saez Gomez Karen Cristina**
Matricula: **219570454**
Programa educativo: **Doctorado**
Posgrado en: **Ciencias Ambientales**

**A T E N T A M E N T E**
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z; 10 de octubre de 2023

**Dra. Carolina Morán Raya**
Directora
Instituto de Ciencias

**Dr. Ricardo Munguía Pérez**
Director de Tesis

# AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por concederme la beca para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al posgrado en Ciencias Ambientales por darme la formación académica en Ciencias Ambientales.

Al D.C. Ricardo Munguía Pérez por la dirección de esta tesis y por contribuir a mi crecimiento profesional.

A los integrantes del Comité Tutorial, por sus valiosas aportaciones en la realización del presente trabajo de tesis.

Al D.C. Raúl Ávila Sosa y la D.C. Esperanza Duarte Escalante por su tiempo y orientación al transmitirme su experiencia en la redacción científica.

Al Laboratorio de Micología Molecular, Depto. Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, dirigido por la D.C. María del Rocío Reyes Montes por su apoyo en la caracterización molecular.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente en el contexto social como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

# DEDICATORIAS

A mi papá Norberto por siempre creer en mí, por su apoyo y amor infinito. A mi mamá Celia por ser ese ángel tan hermoso que aún sigue siendo esa luz que me llena de amor y me guía. Gracias por sus consejos que han sido fundamentales a lo largo de mi vida para cumplir mis objetivos. Los amo, admiro y valoro demasiado.

Gracias a mi esposo Christian por el apoyo y ánimos que me brinda día con día para alcanzar mis metas profesionales y personales. Gracias por su amor incondicional.

Gracias a mis hermanos Norberto, Ángel y Víctor, por las vivencias compartidas y su apoyo.

Gracias a mi familia y las personas que he conocido a lo largo de la vida, las cuales son importantes para mí, debido a su apoyo y cariño.

# CONTENIDO


**1. INTRODUCCIÓN** ..... 1

**2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** ..... 4

**3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN** ..... 6

**4. HIPÓTESIS** ..... 7

**5. OBJETIVOS** ..... 8

**5.1 Objetivo general** ..... 8

**5.2 Objetivos particulares** ..... 8

**6. JUSTIFICACIÓN** ..... 9

**7. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES** ..... 11

**7.1 Análisis de redes de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos** ..... 11

**7.2 Sistema maíz-suelo** ..... 16

**7.3 Maíz importancia y generalidades** ..... 17

**7.4 Influencia del cambio climático en hongos micotoxigénicos y micotoxinas** ..... 18

**7.5 Hongos micotoxigénicos y sus metabolitos** ..... 20

**7.5.1. *Aspergillus flavus* y aflatoxinas** ..... 22

**7.5.2. *Fusarium Verticillioides* y fumonisinas** ..... 30

**7.5.3 *Penicillium verrucosum* y ocratoxinas** ..... 33

**7.6 Control y prevención de hongos micotoxigénicos** ..... 35

**7.7 *Rhododendron* spp. (azalea)** ..... 38

**8. DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN** ..... 41

**8.1 Sitios de muestreo** ..... 41

**8.2 Aislamiento de hongos potencialmente micotoxigénicos** ..... 46

**8.3 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas** ..... 47

**8.4 Extracto *Rhododendron* spp. por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS)** ..... 50

**8.5 Evaluación antifúngica del extracto *Rhododendron* spp.** ..... 52

**9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 54

**9.1 Muestreo** ..... 54

**9.2 Aislamiento de hongos potencialmente micotoxigénicos** ..... 55

**9.3 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas** ..... 58

**9.4 Obtención del extracto *Rhododendron* spp. por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS)** ..... 72

**9.5 Evaluación antifúngica del extracto *Rhododendron* spp** ..... 86
**10 CONCLUSIONES** ..... 91
**11 PERSPECTIVAS** ..... 93
**12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 94

## 1. INTRODUCCIÓN

El calentamiento global ha generado cambios ambientales debido a actividades antropogénicas. Estos cambios provocan perturbaciones ambientales que modifican la estructura de las comunidades microbianas y por ende alteran el funcionamiento del ecosistema (Kaisermann et al., 2015; Perrone et al., 2020). Así también, la seguridad alimentaria se ve afectada por alteraciones generadas por el cambio climático ya que, los impactos físicos, químicos y biológicos modifican la producción agrícola (Gitz et al., 2016). El maíz es un cereal importante a nivel mundial en cuento a su producción, este cereal es afectado por las alteraciones en el ambiente debido al calentamiento global. (Gongora et al., 2018). Por lo tanto, garantizar su inocuidad es fundamental para la seguridad alimentaria.

Las micotoxinas son algunas de las sustancias que comprometen la seguridad alimentaria y por ende la inocuidad del maíz. Estas sustancias químicas son producidas de manera natural por ciertas especies fúngicas, y su producción está asociada al estrés ambiental (Majeed et al., 2013; Medina et al., 2017). Las micotoxinas son de mayor importancia en la inocuidad alimentaria, ya que, la Organización Mundial de la Salud las ha categorizado como toxinas naturales peligrosas para la salud humana y animal, por sus propiedades nefrotóxicas, hepatotóxicas, teratogénicas, neurotóxicas, estrogénicas y cancerígenas. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la contaminación por micotoxinas afecta al 25% de los cultivos mundiales. Sin embargo, este porcentaje podría ser del 60 al 80% debido a la sensibilidad de los métodos analíticos y al impacto del cambio climático (Eskola et al., 2019).

Por tal motivo, asegurar la inocuidad de los alimentos es uno de los objetivos que se ha establecido a nivel internacional y nacional. Estos metabolitos son generados principalmente

por especies de los géneros *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* y *Alternaria*; siendo las aflatoxinas (AF), la ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), Fumonisinas (FB) y tricotecenos (TCT) las micotoxinas más relevantes por sus efectos en la salud (Leite et al., 2020). Sin embargo, las aflatoxinas son los metabolitos más estudiados debido a que la aflatoxina B1 (AFB1) se clasifica en el grupo 1 como sustancia cancerígena humana, de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (IARC, 1995)**.** Este metabolito es la sustancia más toxicas generada de manera natural, y es producida principalmente por las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* (Carvajal, 2013)**.** La correcta identificación de estas especies es de suma importancia debido a la aparición de especies crípticas. Para garantizar la correcta identificación de estas especies, los taxónomos recomiendan usar un enfoque polifásico, que incluya la caracterización genotípica idealmente complementado con características fenotípicas y fisiológicas (Arrúa et al., 2012).

En el presente trabajo de investigación, se llevó a cabo el muestreo de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz, así como de granos de maíz híbrido almacenado, para determinar la distribución de los tres principales géneros micotoxigénicos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. Los aislados presuntivos de especies micotoxigénicas fueron previamente caracterizados a través de un enfoque polifásico que incluyó la caracterización fenotípica y genotípica.

Aunado a lo anterior, es importante llevar a cabo el control de estos hongos micotoxigénicos, por lo que, en los últimos años ha habido un interés creciente en el uso de compuestos antimicrobianos como agentes fungicidas con base en extractos de plantas (Gumus et al., 2010). En este trabajo de investigación se evaluará el potencial antifúngico del extracto

natural de azalea (*Rhododendron* spp.) *in vitro* sobre aislados potencialmente micotoxigénicos.

La pertinencia del presente estudio en el Posgrado en Ciencias Ambientales radica en que la contaminación por hongos micotoxigénicos en los cultivos agroalimentarios es de interés mundial. Ya que, factores ambientales influyen en la proliferación de estos hongos y en la producción de sus metabolitos secundarios, con graves efectos sobre la salud humana y animal. Así como, en la economía y el comercio exterior de algunos países. Además, es de suma importancia resaltar que el control de estos hongos y sus metabolitos se lleve a cabo a través de métodos amigables con el ambiente, como por ejemplo la implementación de extractos naturales. Por lo tanto, el monitoreo de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos, contribuye a conocer la distribución de estos con la finalidad de proponer una alternativa de control de hongos micotoxigénicos eficaz.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El maíz es de importancia económica, social y cultural, suministra nutrientes tanto a humanos como animales. Es uno de los cereales con mayor superficie de cultivo a nivel mundial, el cual es destinado a la alimentación humana y animal. Este cereal es susceptible de contaminación por hongos micotoxigénicos y sus metabolitos. Aunado a esto, los hongos productores de estos metabolitos contribuyen a la degradación de los alimentos y por lo tanto afectan el valor nutritivo de los mismos.

El monitoreo de estos metabolitos es importante desde una perspectiva económica por las pérdidas monetarias que se presentan cuando el rendimiento de los cultivos se ve disminuido, o bien por los costes derivados de la prevención o descontaminación (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2004; Organización Mundial de la Salud, 2018). No solo el monitoreo de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos juegan un rol importante en la prevención o diminución de estos en la cadena agroalimentaria. Sino también, es importante reducir el uso de sustancias químicas como medida común para la reducción fúngica en la postcosecha de los cultivos, porque aumenta el riesgo de residuos tóxicos dando lugar a problemas ambientales y de salud (Hua et al., 2014; Kumar et al., 2020). Además, el uso de fungicidas químicos puede llegar a generar resistencia en los hongos. Por lo mencionado, en los últimos años ha habido un interés creciente en el desarrollo de agentes antimicrobianos, con base en extractos de plantas, como un método sustentable para la inhibición del crecimiento de hongos micotoxigénicos (Gumus et al., 2010). El uso del extracto de *Rhododendron* spp. puede ser una alternativa amigable con el ambiente para el control de *A. flavus,* potencialmente micotoxigénico.

Finalmente, es importante destacar que los factores ambientales son determinantes en la proliferación de hongos micotoxigénicos y la producción de micotoxinas, metabolitos que directa o indirectamente pueden afectar la salud tanto humana como animal, y la economía global. Por esto, es necesario llevar a cabo estudios complejos que integren el ambiente y la salud, para proponer soluciones eficaces que contribuyan de una manera sustentable a garantizar el consumo de alimentos con bajas concentraciones de estos metabolitos, y específicamente de aflatoxinas, o en el mejor de los casos libres de estos.

## 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

**Pregunta 1.**

¿Qué influencia tiene el enfoque polifásico en la correcta identificación de hongos micotoxigénicos en un sistema maíz-suelo de diferentes regiones de Puebla y Tlaxcala?

**Pregunta 2.**

¿Cuál es la importancia de conocer la filogenia de los aislados de hongos micotoxigénicos en el sistema maíz-suelo de diferentes regiones de Puebla y Tlaxcala?

**Pregunta 3.**

¿Cuál es la actividad antifúngica del extracto *Rhododendron* spp sobre el crecimiento de hongos micotoxigénicos de diferentes regiones de Puebla y Tlaxcala?

**Pregunta 4.**

¿Cuáles son los compuestos encontrados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS) del extracto etanólico de *Rhododendron* spp (azalea) que inhiben el crecimiento de hongos potencialmente micotoxigénicos?

## 4. HIPÓTESIS

El sistema maíz-suelo se encuentra contaminado por hongos micotoxigénicos pertenecientes a los géneros *Aspergillus, Fusarium* y *Penicillium*. Y, la filogenia de las especies pertenecientes a cada uno de estos géneros refleja su evolución a partir de un ancestro en común. En cuanto a su control, la proliferación de estos hongos micotoxigénicos puede ser inhibida por el extracto etanólico de *Rhododendron* spp (azalea).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la distribución ambiental de hongos micotoxigénicos en un sistema maíz-suelo, a través de la correcta identificación de las especies implicadas mediante un análisis filogenético, de diferentes zonas de Puebla y Tlaxcala. Y, proponer un sistema de control de estos hongos micotoxigénicos mediante el uso del extracto natural de *Rhododendron spp.*

### 5.2 Objetivos particulares

- Obtener aislados de hongos potencialmente micotoxigénicos a partir de muestras de suelo agrícola y maíz almacenado de diferentes regiones de Puebla y Tlaxcala.
- Caracterizar fenotípicamente los aislados de hongos potencialmente micotoxigénicos a partir de muestras de suelo agrícola y maíz almacenado de diferentes regiones de Puebla y Tlaxcala.
- Conocer las relaciones evolutivas de las especies potencialmente micotoxigénicas obtenidas a partir de suelo agrícola y maíz almacenado, a través del análisis filogenético.
- Obtener y caracterizar mediante cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS), un extracto etanólico de *Rhododendron* spp (azalaea).
- Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto *Rhododendron* spp (azalaea) en las diferentes cepas micotoxigénicas aisladas de suelo agrícola y maíz almacenado de diferentes regiones de Puebla y Tlaxcala.

## 6. JUSTIFICACIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) sugirió que, la contaminación por micotoxinas afectaba al 25% de los cultivos mundiales. Sin embargo, esto podría alcanzar del 60 al 80% debido a la sensibilidad de los métodos analíticos y al impacto del cambio climático. Dentro de los cultivos afectados está el del maíz, un cereal de suma importancia por su carácter económico-agrícola, social y cultural. Este cultivo constituye la base de la dieta básica en muchos lugares del mundo, y nuestro país se encuentra dentro de los primeros diez con mayor producción de maíz en el mundo (FAO, 2022). Por lo que, la FAO y la OMS recomiendan llevar a cabo el monitoreo de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos en alimentos agrícolas, para prevenir y controlar la contaminación por estos metabolitos en cereales.

Por lo anterior, es importante conocer el estado de inocuidad del maíz con respecto a la presencia de hongos potencialmente micotoxigénicos, y proponer una medida de control eficaz que al mismo tiempo sea amigable con el ambiente. En este trabajo de investigación se identificó la presencia de hongos potencialmente micotoxigénicos en muestras de suelo agrícola y maíz almacenado, a través de un enfoque polifásico. Lo cual, nos permitio conocer la distribución ambiental en el sistema maíz suelo con respecto a hongos micotoxigénicos. Que, de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) las micotoxinas representan una problemática de salud pública. Particularmente la aflatoxina B1, la cual es la más común y más toxica que induce principalmente cáncer de hígado (Hernández & Navarro-Blasco, 2015; International Agency for Research on Cancer, 2015; Zhang et al., 2020).

La pertinencia de este trabajo de investigación en el área de Ciencias Ambientales radica en que la parte ambiental y social, son temas implicados en la producción de micotoxinas en la

cadena alimentaria. Asimismo, la FAO y la OMS consideran al tema de las micotoxinas de relevancia mundial por sus efectos a la salud y a la economía. Ya que, disminuye el rendimiento de los cultivos y afecta al sector agropecuario, incluso alteran las propiedades organolépticas de los alimentos haciendo que disminuya su valor nutritivo.

Una de las aportaciones más importantes del presente proyecto, es la evaluación de las propiedades inhibitorias del extracto de *Rhododendron* spp sobre aislados potencialmente micotoxigénicos obtenidas de muestras de maíz y suelo agrícola, que podría ser una alternativa amigable con el ambiente.

Cabe mencionar que al no haber suficiente información acerca de este tema tanto en Puebla como en Tlaxcala, este trabajo contribuirá en el aporte de información. Finalmente, al ser un tema de relevancia no solo a nivel nacional sino también a nivel mundial, este trabajo puede ser replicable, de ahí el valor científico del presente proyecto de investigación.

# 7. MARCO CONCEPTUAL Y ANTECEDENTES

## 7.1 Análisis de redes de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos

La importancia y relevancia del presente estudio de investigación radica en que, el sistema agroalimentario se ve afectado por hongos micotoxigénicos y sus metabolitos. Estos afectan tanto la salud humana como animal, además de impactar negativamente en la economía de una región y la economía global, porque disminuye el rendimiento de los cultivos.

A partir de las siguientes palabras clave: mycotoxins, fungi, mycotoxin control, maize y climate changue, se realizó un análisis de redes, con la finalidad de conocer las variables involucradas con el tema de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos en el cambio climático. Se compararon los resultados obtenidos en la base de datos de Web of science y Scopus.

En la matriz se escribieron las palabras clave que describen el trabajo de investigación, posteriormente se colocaron sinónimos de estas palabras clave. La ecuación de búsqueda obtenida fue la siguiente:

*(Mycotoxins OR Aflatoxin OR Deoxynivalenol OR Zearalenona OR Ochratoxin OR "Micotoxigenic fungi") AND (Fungi OR Aspergillus OR Penicillium OR Fusarium) AND ("mycotoxin control" OR "antifungal activity" OR "natural extracts") AND (maize OR corn OR "Food contamination") AND ("climate change" OR environmental).*

Esta ecuación de búsqueda se realizó en la base de datos de Web of Science, obteniendo la siguiente imagen (Treemap) (figura 1).

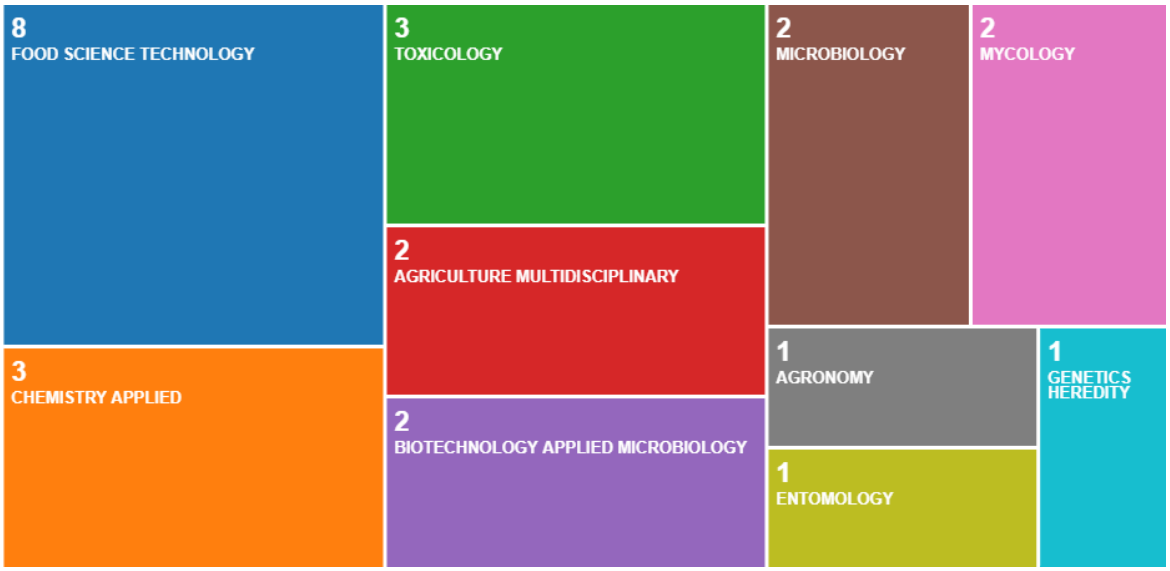



**Figura 1.** Visualización Treemap de los campos de estudio, obtenida en Web of Science

Como se puede observar y de acuerdo con las categorías de esta base de datos, en el campo de la tecnología de la ciencia de los alimentos hay un mayor número de coincidencias con las palabras clave. Además, se obtuvo el Treemap del número de publicaciones por año hasta el año 2020 (figura 2), como se puede observar son pocas las publicaciones en esta base de datos.

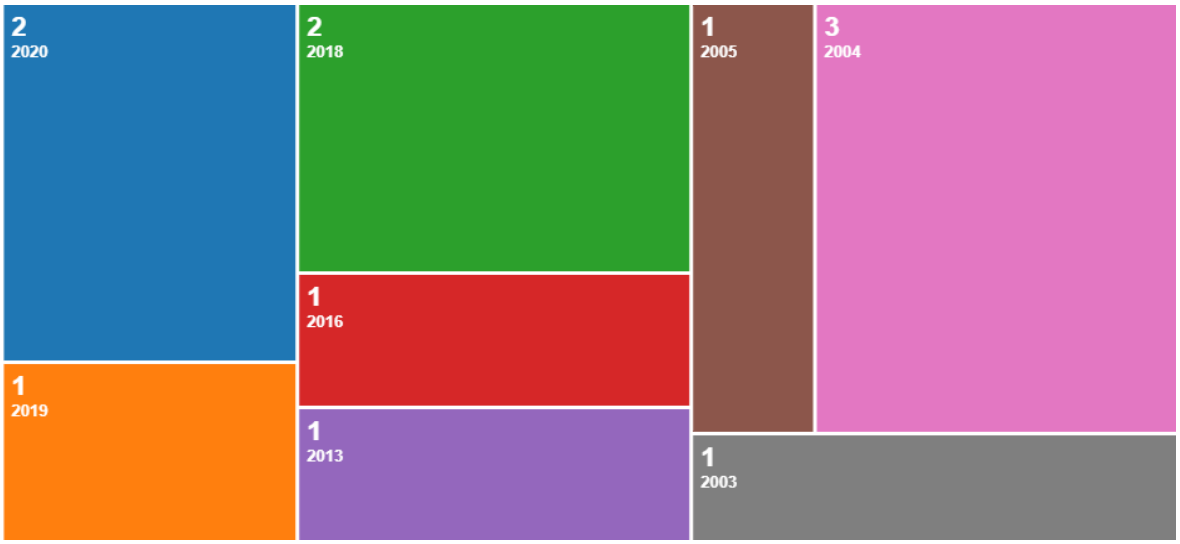



**Figura 2.** Visualización Treemap de las publicaciones por año, obtenida en Web of Science

Así también, en el siguiente Treemap (figura 3) se puede ver que México no aparece en los países donde se llevaron a cabo estas investigaciones, al menos hasta el año 2020.

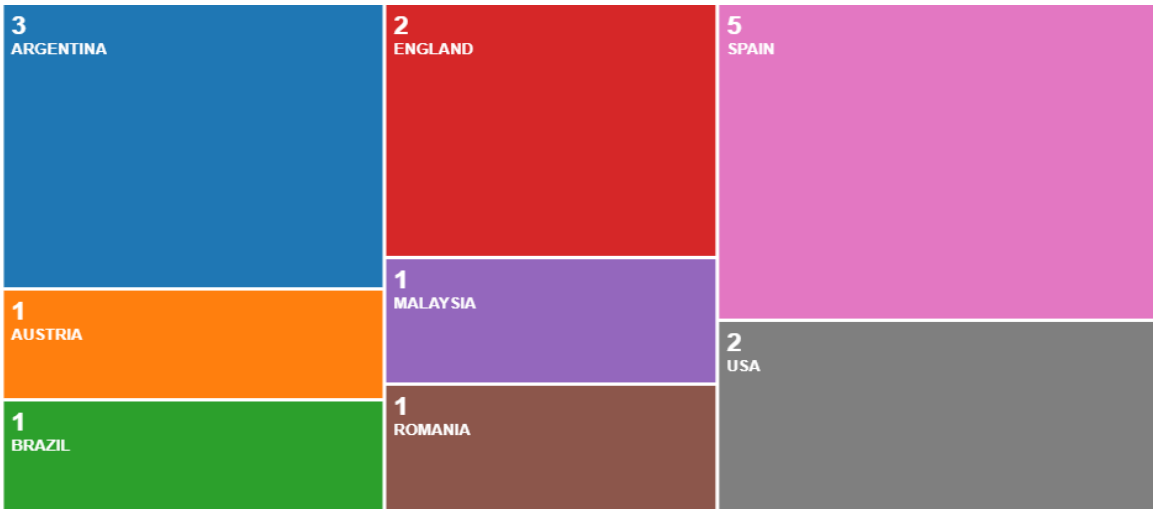



**Figura 3.** Visualización Treemap de los países y regiones donde se llevaron a cabo las investigaciones, obtenida en Web of Science.

Al realizar el análisis en el programa VOSviewer version 1.6.15, obtenemos la siguiente red de datos (figura 4) con la relación entre las palabras más mencionadas en los artículos. En esta figura se pueden visualizar los principales hongos micotoxigénicos, factores ambientales y algunas de las micotoxinas más estudiadas.

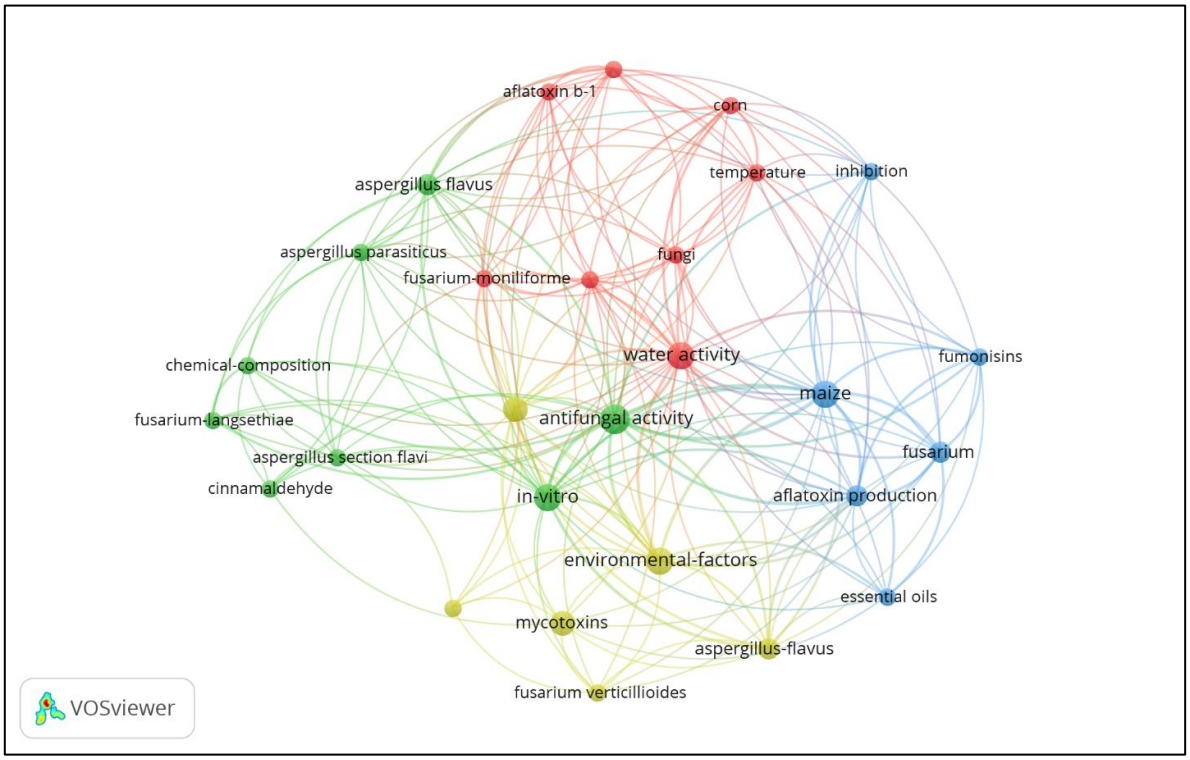



**Figura 4.** Red de datos con las palabras más mencionadas y la relación entre estas, obtenida de Vosviewer

En la base de datos de Scopus, se introdujo la siguiente ecuación de búsqueda debido a que no se pudo introducir toda la ecuación anterior:

*((mycotoxins OR aflatoxin OR deoxynivalenol OR zearalenona OR ochratoxin) AND (fungi OR aspergillus OR penicillium OR fusarium) AND ("mycotoxin control" OR "antifungal activity" OR "natural extracts") AND (maize OR corn))*

*A* pesar de no introducir toda la ecuación que se introdujo en Web of Science, se obtuvieron 113 documentos y la red de datos obtenidas se puede ver en la figura 5. Como podemos observar aparecen hongos de relevacian pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, asi también,los estudios de control y actividad antifungica son temas de relevancia a nivel mundial.

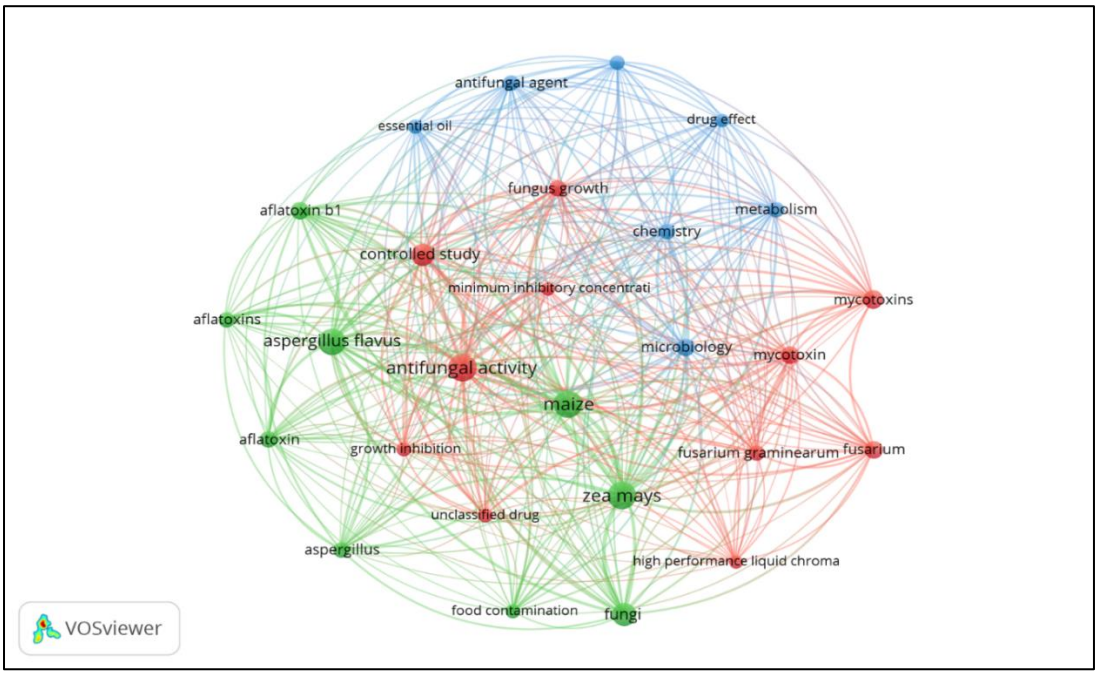



**Figura 5.** Red de datos con las palabras más mencionadas y la relación entre estas, obtenida de Vosviewer

### 7.2 Sistema maíz-suelo

De acuerdo con la Real Academia Española un sistema se define como el "Conjunto de cosas que relacionadas entre sí ordenadamente contribuyen a determinado objeto". Así también, Brandão (2012), menciona que el término "sistema", proviene de griego *synhistanai* que significa "poner junto", que, en un sentido amplio significa "un conjunto o una totalidad de objetos, reales o ideales, recíprocamente articulados e interdependientes, uno en relación con los otros".

Aunado a lo anterior, el sistema maíz-suelo (figura 6), en el presente trabajo de investigación hace referencia a la relación del suelo agrícola y el cultivo de maíz, ya que, en el ciclo de este cultivo uno de los factores importantes en su producción es el suelo. Por lo que, el cultivo de maíz con el suelo agrícola forma un sistema, al estar ambos elementos estrechamente relacionados.

Es así como, para un buen desarrollo en la planta de maíz influyen las condiciones del suelo, tanto sus condiciones fisicoquímicas como las comunidades microbianas presentes. A pesar de que, el maíz se adapta a una amplia variedad de suelos donde puede producir buenas cosechas, se obtiene un mejor desarrollo de la planta en suelos con pH entre 5.5 y 7.8 (Deras, 2020).

Aunado a lo anterior, el cultivo de maíz puede verse afectado por condiciones adversas del clima, lo que puede favorecer la aparición de especies de microrganismos que afectan la producción de este cultivo como lo son: virus, bacterias y hongos, que incluso pueden provocar la perdida completa del cultivo. Estos últimos microorganismos, los hongos, pueden descomponen los granos de maíz, debido a su metabolismo. Ya que, son capaces de producir enzimas descomponedoras de carbohidratos, grasas e incluso de proteínas, tanto del grano

como de la semilla, provocando un deterioro en cuanto a su calidad. Esto sucede porque la acidez de los granos incrementa reduciendo la capacidad germinativa hasta desaparecer. Los principales hongos que pueden aparecer en este sistema maíz-suelo, pertenecen a las especies de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

**Figura 6.** Sistema maíz-suelo

### 7.3 Maíz importancia y generalidades

El sistema agropecuario, específicamente el cultivo de maíz es susceptible a contaminación por hongos micotoxigénicos lo que genera afectaciones severas a los agricultores y ganaderos (Leite et al., 2020). El maíz (*Zea mays* L) es uno de los cereales más antiguos que se conoce, el cual ha ido evolucionando gracias a la intervención de los agricultores. Desde tiempos remotos se ha considerado un alimento básico para los humanos y el ganado. En México no sólo es considerado un cultivo ya que, forma parte de su vida, su historia, sus tradiciones e

incluso es considerado el centro de su identidad. De acuerdo con la FAO este es el segundo cultivo a nivel mundial en cuanto a su producción y el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea (Matthew, 2016; Paliwal, 2001).

Además, la calidad de este cereal así como el rendimiento se ve afectado por factores ambientales entre estos la salinidad y déficit de nutrientes del suelo, las variaciones en la temperatura, sequias, así como, plagas y enfermedades (Martínez et al., 2013). Sin embargo, el estudio de los hongos micotoxigénicos han adquirido relevancia a nivel mundial, estos pueden colonizar los cereales antes o después de la cosecha. Tanto la colonización y proliferación depende de las condiciones ambientales y ecológicas, por lo que, la producción de micotoxinas resultante diferirá (Bryden, 2012). De acuerdo con la FAO y la ONU (2004), alrededor del 25% de los cultivos alimentarios a nivel mundial son afectados por hongos micotoxigénicos, generando pérdidas de alimentos por 1000 millones de toneladas al año.

El maíz aporta aproximadamente el 5% de las calorías de la dieta y el 4% de las proteínas a nivel mundial. En el comercio mundial se importan 107 millones de toneladas con un valor comercial aproximadamente de 26 mil millones (Shiferaw et al., 2013). Se espera que en los próximos cinco años las ganancias globales en el cultivo de maíz se apuntalen y haya una expansión mundial en el uso de maíz (International Grains Council, 2019).

### 7.4 Influencia del cambio climático en hongos micotoxigénicos y micotoxinas

Según la Organización Meteorológica Mundial (OMM), se espera que la temperatura global anual promedio aumente en los próximos cinco años (2020-2024) al menos 1ºC. Sin embargo, existe un 20% de probabilidad de que este aumento supere los 1.5ºC en al menos un año (World Meteorological Organization, 2021). El cambio climático global esperado

incluye un aumento en la temperatura y modificaciones en los regímenes de lluvia que cambian el rango de especies incluso en las regiones actualmente más frías. Por ejemplo, el nivel actual de $CO_2$ ha aumentado de 280 a 400 ppm, lo que ha contribuido a los efectos del calentamiento global (Chourasiya et al., 2021; Nesic et al., 2015). Las comunidades agrícolas locales poseen la experiencia adecuada para producir un grupo particular de cultivos productivos en ese entorno específico. Si el clima cambia a partir de este escenario, entonces se necesitan ajustes a las prácticas actuales para mantener la productividad (Chakraborty et al., 2021).

En última instancia, el cambio de asociaciones adaptadas bajo el cambio climático global modificará el resultado de las interacciones microbios planta-suelo. Las perturbaciones ambientales pueden provocar cambios en las estructuras de las comunidades microbianas, afectando el funcionamiento del ecosistema (Kaisermann et al., 2015). En regiones tropicales y áridas donde las temperaturas atmosféricas están cerca de los valores fisiológicos máximos del cultivo; las temperaturas más elevadas son dañinas más inmediatamente al aumentar el estrés por calor y la pérdida de agua por evaporación (Chakraborty et al., 2021). Además, el clima representa el principal impulsor de los agroecosistemas, siendo la temperatura y la humedad relativa factores ambientales clave en la colonización de hongos micotoxigénicos y la producción de micotoxinas (Mshelia et al., 2020; Perrone et al., 2020; Valencia et al., 2020).

La contaminación por micotoxinas en la cadena alimentaria está condicionada principalmente a la diversidad de cepas fúngicas, la vulnerabilidad fúngica de la planta en el campo, la población microbiana, humedad, temperatura, nutrientes y factores de estrés

(Kalagatur et al., 2020). Se ha informado que la actividad fúngica y la producción de toxinas en otros lugares son óptimas a 25–37 °C (Atongbiik et al., 2017).

El contenido de agua es un factor importante que afecta tanto el grado como la capacidad de almacenamiento de los granos y las legumbres, ya que influye significativamente en el crecimiento microbiano y la producción de toxinas (Okello et al, 2010). Es así como las condiciones ambientales y en particular el cambio climático repercute en la proliferación de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos.

### 7.5 Hongos micotoxigénicos y sus metabolitos

Los hongos requieren metabolitos primarios para poder proliferar, dentro de estas sustancias están las proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. Los metabolitos mencionados están asociados a la fase de crecimiento rápido. Sin embargo, también están aquellos compuestos denominados metabolitos secundarios los cuales no son esenciales en el desarrollo vegetativo, siendo las micotoxinas las más estudiadas por sus efectos sobre la salud y la economía (Atanda S. A, 2011).

Existen dos clasificaciones de hongos micotoxigénicos: hongos de campo (o patógenos de plantas), los cuales van a contaminar los cultivos y generan sus metabolitos antes de la cosecha; y los hongos de almacenamiento (o saprofitos), que pueden incrementar la producción de sus metabolitos si no hay medidas de control adecuadas. Sin embargo, a pesar de que existe esta clasificación la principal fuente de contaminación se origina en el campo (Sathasivam et al., 2019).

Alrededor de 100 especies fungicas, principalmente pertenecientes a especies de *Penicillium, Fusarium* y *Aspergillus* producen micotoxinas. El termino micotoxina deriva de la palabra griega “mikes” que quiere decir hongo y de la palabra latina “toxicum” que significa toxico. Estos metabolitos se producen durante la etapa final y estacionaria de la fase de crecimiento, asociados con la diferenciación y esporulación (González et al., 2006). Existen alrededor de 400 micotoxinas con potencial toxigénicos, producidas por alrededor de 100 hongos (Berthiller et al., 2007; Paterson, & Lima, 2010). Entre las principales micotoxinas identificadas y estudiadas se encuentran las aflatoxinas, la fumonisina, las ocratoxinas, el deoxinivalenol, la zearalenona, los tricotecenos y la patulina, las cuales contaminan significativamente los granos almacenados (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Se espera que el cambio climático global provoque que algunas especies de hongos micotoxigénicos dominen a otras (Bogantes et al., 2004). En la Tabla 1 se muestran algunos de los principales hongos productores de micotoxinas. Se ha informado que si hay temperatura alta o baja la proliferación fúngica y la producción de sus metabolitos secundarios son inevitables. Atanda et al. (2011), observaron que las temperaturas por debajo de 20 °C favorecieron a *Penicillium*, mientras que por encima de 20 °C aumentaron el crecimiento de las especies de *Aspergillus*. También reportaron que los productos alimenticios como los cereales y las legumbres eran más propensos a las especies de *Aspergillus* que cualquier otro hongo productor de toxinas, más aún en el almacenamiento debido a las temperaturas involucradas.

Cuando estos metabolitos son consumidos a través de la dieta generan una amplia gama de trastornos, por lo que es considerado un problema de salud pública en el mundo (Huerta et al., 2016). Se han identificado dos rutas de exposición a estos metabolitos, mediante la

inhalación (frecuentemente esporas) y a través de la dieta, pudiendo generar efectos a la salud tanto humana como del ganado (Berthiller et al., 2007). Los principales efectos son inmunotóxicos, teratogénicos, nefrotóxicos y cancerígenos (Organización Mundial de la Salud, 2018).

**Tabla 1.** Principales hongos productores de micotoxinas

| **Especie de moho** | **Micotoxinas producidas** |
|---|---|
| *Aspergillus flavus* | Aflatoxinas $B_1$ y $B_2$ |
| *Fusarium moniliforme (F. verticillioides)* | Fumonisina $B_1$ |
| *Aspergillus ochraceus* | Ocratoxina A |

Fuente: FAO - ONU, 2004

Los taxónomos recomiendan llevar a cabo una identificación polifásica de especies fúngicas debido a la aparición de especies cripticas. En concepto, las especies crípticas (hermanas) son organismos con apariencia idéntica pero que representan linajes evolutivos distintos. "Las especies crípticas pueden diferir de los taxones de especies convencionales en el tipo de datos, métodos de análisis o diferentes criterios de lo que debería ser una especie" (Brown et al., 2023).

### 7.5.1. *Aspergillus flavus* y aflatoxinas

*Aspergillus flavus* es de las especies más frecuentemente aisladas en la agricultura y tiene una gran importancia como agente causal de diversas patologías en el humano. Esta especie

tiene como reservorio el suelo, así como una amplia gama de cultivos agrícolas del mundo, que incluye numerosos productos alimenticios, incluidos cereales, pistachos, nueces y cacahuetes, especias e higos en climas cálidos donde pueden producir aflatoxinas en diferentes puntos de la cadena alimentaria, como la precosecha, el procesamiento, el transporte o el almacenamiento (Cleveland et al., 2009; Nierman et al., 2015).

La identificación fenotípica de esta especie generalmente se basa en criterios microscópicos y macroscópicos, los cuales consideran las características de conidióforos, fiálides y esporas, y las características coloniales (Samson et al., 2014). En cuanto a las características macromorfologícas de *A. flavus*, este hongo crece en 5 a 7 días en medio ADS (figura 7) o agar Czapek a 25 y 37 $^{0}$C. El color de la colonia es verde amarillento, con textura pulverulenta y surcos radiales, ocasionalmente puede llegar a ser algodonosa en centro o margen de la colonia, mientras que el reverso de la colonia es incoloro (Rangel-Muñoz et al., 2020).

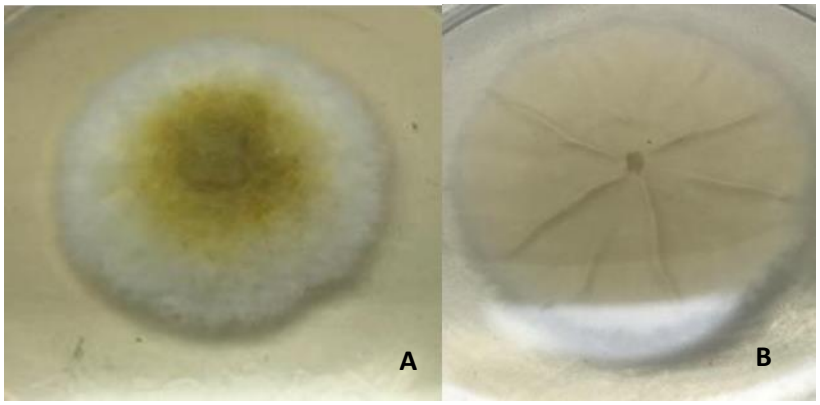



**Figura 7.** Anverso (A) y reverso (B) de la colonia de *Aspergillus flavus.*

Fuente: Propia, 2019

En su micromorfología se observan cabezas conidiales (Figura 8) uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales, sus estripes normalmente son rugosos, hialinos o de color marrón pálido. Las vesículas son esféricas, con métulas ocupando prácticamente toda la superficie de esta (Abarca, 2000).

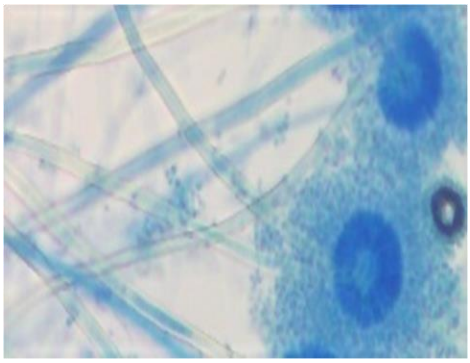


**Figura 8**. Micromorfología de *Aspergillus flavus* a 40X.

Fuente: Propia 2017

Sin embargo, las características micro y macromorfologícas no son suficientes para la correcta identificación en los aislados de *Aspergillus* atípicos, en la cuales se incluyen aquellas cepas que presentan una esporulación lenta, o en presencia de especies de *Aspergillus* crípticas o hermanas. Además, llevar a cabo la identificación solo a través de estos métodos requiere de mucho tiempo y conocimientos técnicos considerables ( Hong et al., 2005; Balajee et al., 2006) . Por tal motivo, existe un interés creciente en creciente en utilizar otras herramientas para su identificación, por lo que se ha propuesto utilizar un enfoque polifásico, que incluya métodos fenotípicos y genotípicos, estos últimos, se realizan

con base en la secuenciación parcial o total del genoma de diferentes dianas genéticas, incluidas las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) de ADNr y genes que codifican proteínas como la calmodulina y la β-tubulina (Nasri et al., 2015).

La importancia de identificar correctamente las especies del género *Aspergillus*, es debido a la importancia de un adecuado tratamiento ya que hay especies que son resistentes a algunos antifúngicos. Y es que, estas especies son el agente causal de un amplio espectro de presentaciones clínicas que van desde la colonización de cavidades preexistentes y aspergilosis broncopulmonar alérgica hasta afectación cutánea, otomicosis y aspergilosis invasiva (IA) (Nasri et al., 2015). A pesar de que *A. fumigatus* es el principal agente causal de la aspergilosis en humanos y otros animales *A. flavus* también es de importancia en esta afección que incluye la aspergilosis alérgica, colonizadora saprofítica y la invasiva (Balajee et al., 2007). La importancia de esta especie es que es el segundo patógeno principal que causa aspergilosis invasiva y no invasiva (Krishnan et al., 2009). Además, *A. flavus* se ha identificado como una de las principales causas de queratitis micótica, una infección de la córnea causada por hongos (Tilak et al., 2010).

Aunado a esto, *A. flavus* es una de las principales especies productoras de aflatoxinas, las cuales son al alrededor de 20 tipos, estos metabolitos son de bajo peso molecular, inodoras, insípidas e incoloras, estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales (Bbosa et al., 2013; Ehrlich et al., 2007; Martínez et al., 2013; Urrego & Díaz, 2006). Los cereales y las legumbres como el mijo, arroz, guinea, frijoles y soya son relativamente menos susceptibles a la toxina en comparación con el maíz y el maní (Sirma et al., 2015). Después de establecer estas fuentes de alimentos como huésped, este hongo produce aflatoxinas, incluida AFB1, que luego contaminan el suministro de alimentos.

La capacidad de este hongo para producir aflatoxinas está en función de su metabolismo, importante en el metabolismo primario de lípidos y enzimas, las cuales van a tener la capacidad de generar aflatoxinas (Martins et al., 2000). Sin embargo, la capacidad de producir aflatoxinas depende de la cepa (Martínez et al., 2013).

Además, las altas temperaturas y la humedad favorecen el crecimiento de estos hongos por lo que, los países que tienen estas condiciones ambientales a menudo experimentan una mayor contaminación (Rushing & Selim, 2019). Aunado a esto, a medida que el cambio climático modifica las temperaturas promedio y la precipitación anual, se espera que regiones adicionales puedan comenzar a experimentar problemas con la contaminación AFB1 y los países con contaminación AFB1 existentes puedan comenzar a ver niveles más altos en los cultivos (Battilani et al., 2016; Liu & Wu, 2010).

El contenido de agua es un determinante clave del desarrollo de aflatoxinas en cultivos alimentarios. Los hongos de almacenamiento como *Aspergillus* requieren aproximadamente 13% de humedad o humedad relativa del 65% (actividad del agua de 0.65) para el crecimiento y la producción de toxinas (Atanda, 2011). Sin embargo, 77% o más es óptimo para el crecimiento y la proliferación (Atongbiik et al., 2017) en la Tabla 2 se muestran las aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus*.

La producción de aflatoxinas ocurre en un amplio rango de temperatura de 12 a 42°C (con un óptimo de 28 y 30°C). Aunque existen alrededor de 20 tipos de aflatoxinas, son seis las más investigadas por su capacidad para afectar una amplia variedad de cultivos agrícolas y por sus efectos en la salud tanto humana como animal (Martínez et al., 2013). Las aflatoxinas más relevantes son AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1 y AFM2 (Figura 9). La letra "B" se

refiere a la fluorescencia azul que generan cuando llega la luz ultravioleta. Mientras que la letra "G" se refiere a la fluorescencia verde y la "M" que se ha identificado en la leche.

**Tabla 2.** Especies productoras de aflatoxinas

| Tipo de aflatoxina | Especies de *Aspergillus* |
|---|---|
| Aflatoxina B1 (AFB1) | *A. flavus, A. arachidicola, A. bombycis, A. minisclerotigenes, A. nomius, A. ochraceoroseus, A. parasiticus,* |
| Aflatoxina M1 (AFM1) | *A. flavus, A. parasiticus;* metabolito de aflatoxina B1 en humanos y animales proveniente de la leche materna |
| Aflatoxina G1 (AFG1) | *A. arachidicola, A. flavus, A. minisclerotigenes, A. nomius, A. Parasiticus* |
| Aflatoxina GM1 (AFG1) | *A. flavus* |
| Parasiticol (P) | *A. flavus* |
| Aflatrem | *A. flavus, A. minisclerotigenes* |

Fuente: Bbosa et al. (2013)

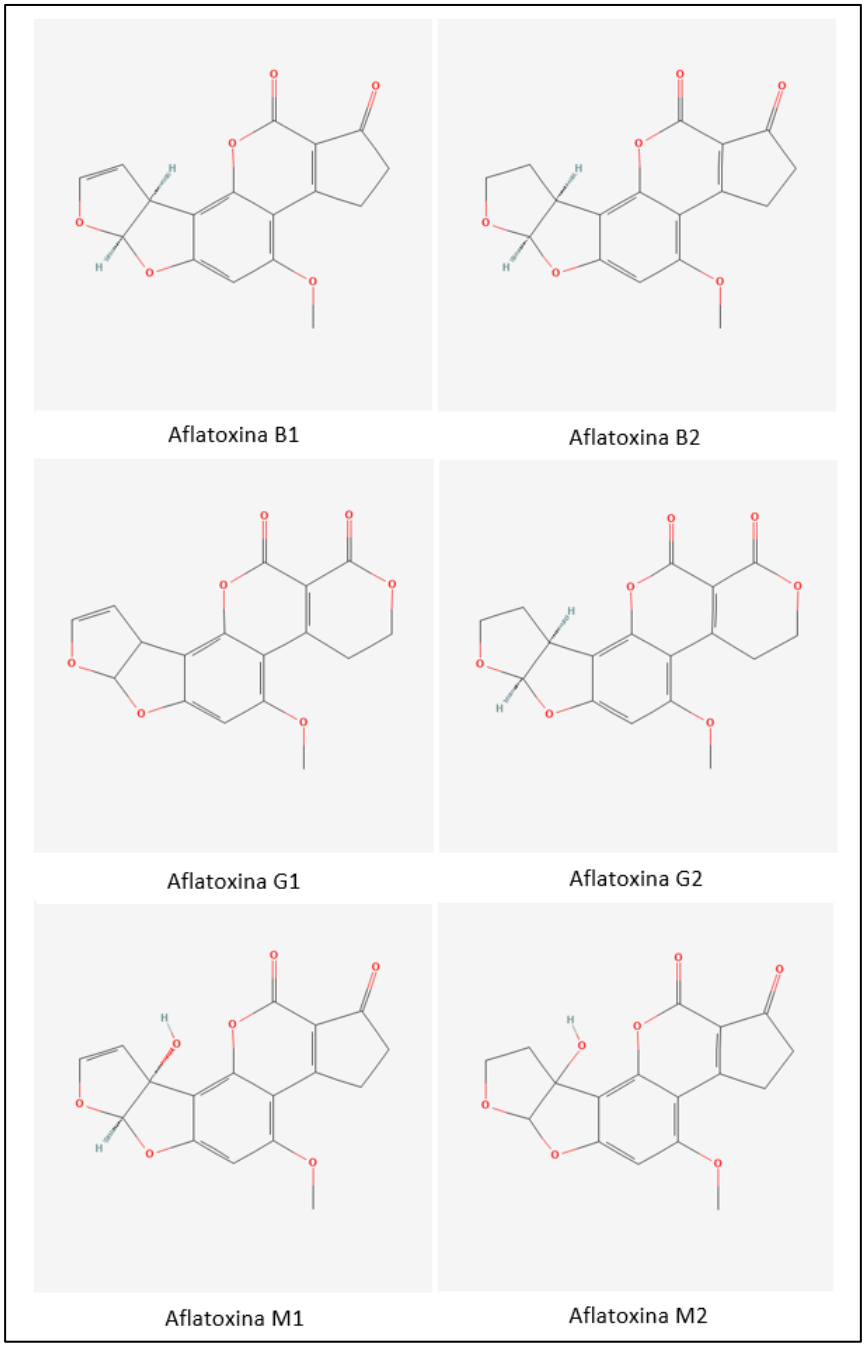



**Figura 9.** Estructura molecular de las principales aflatoxinas.

Fuente: National Center for Biotechnology Information (2023)

Wajih et al. (2020), reportaron la contaminación por aflatoxinas en maíz en Pakistán, en todas las muestras se presentó una contaminación de aflatoxinas con limites superiores a 20 µg/kg. Además, hubo una mayor concentración de AFG1 en todas las variedades de maíz analizadas. Por su parte Park et al. (2005), reportaron la presencia de AFB1 en un rango de 1.8 a 7.3 ng/g en muestras de arroz recolectadas en la República de Corea, mientras que el 17 % de las muestras estaban contaminadas con *A. flavus*.

En otro estudio Majeed et al. (2013), reportan la presencia de AFB1 en muestras de maíz, con un valor de 7.9 µg/kg, mientras que de aflatoxinas totales en una concentración de 12.08 µg/kg. También indican que el 14% de las muestras presentaron contaminación por AFB1, mientras que el 28 % por aflatoxinas totales. Ferri et al. (2017), evaluaron la presencia de aflatoxinas en muestras de suero y orina de trabajadores de fábricas de piensos, ellos reportan que ninguna de las muestras de suero resultó positiva. Mientras que, el 73.3% de las muestras de orina presentó contaminación por AFM1 con una concentración media de 0.035 y 0.027 ng/ml en trabajadores expuestos y no expuestos respectivamente.

Las aflatoxinas pueden producir efectos mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos, y se han relacionado con enfermedades hepáticas crónicas y agudas (Iamanaka et al., 2007; Murphy et al., 2006). La aflatoxina más examinada es AFB1 porque la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) la clasifica en el grupo 1 como carcinógeno humano (IARC, 1995).

Estos metabolitos y en general las micotoxinas son metabolitos capaces de generar enfermedades e incluso la muerte de humanos y animales (Sirot et al., 2013). Son termoestables y su producción depende de la cepa, el sustrato, y las condiciones de temperatura y humedad. Tienen propiedades lipofílicas y son capaces de unirse con proteínas

plasmáticas, estas propiedades les permiten persistir en el organismo cuando hay una exposición crónica o repetida (Sirot et al., 2013). Aunado a lo anterior, al ser *A. flavus* productor de aflatoxinas estos metabolitos pueden causan problemas a la salud humana y de los animales, conocidas como aflatoxicosis. Esta aflatoxicosis es la enfermedad provocada por la intoxicación por aflatoxinas. Y, la ingesta diaria de dosis bajas de aflatoxinas a lo largo del tiempo puede causar aflatoxicosis crónica, lo que da como resultado un consumo de alimentos deficiente, retraso en el crecimiento, inmunosupresión y posible desarrollo de cáncer de hígado (Nasri et al., 2015). En la Tabla 3 se muestran el contenido máximo de aflatoxinas en cereales y productos a base de cereales para consumo humano.

**Tabla 3.** Nivel máximo de aflatoxinas en cereales y sus subproductos para consumo humano

| Micotoxina | Cereales y productos de cereales | Nivel máximo, µg/kg |
|---|---|---|
| Aflatoxina B1 | Cereales y productos derivados de estos | 2.0 |
| Aflatoxinas totales | Cereales y productos derivados de estos | 4.0 |

Fuente: Pinotti et al. (2016)

### 7.5.2. *Fusarium Verticillioides* y fumonisinas

Otro de los hongos potencialmente micotoxigénicos es *Fusarium verticillioides* (*F. verticillioides*), anteriormente conocido como *F. moniliforme* (teleomorfo *Gibberella moniliformis*, también reportado como población de apareamiento A del complejo *G. fujikuroi*), es un hongo contaminante de plantas tales como el maíz, arroz y trigo, importantes

en la dieta alimentaria mundial. Bajo condiciones de estrés ambiental puede provocar daños en plantas maíz, como lo es la pudrición del tallo y de la mazorca (Kant et al., 2017) .

*F. verticillioides* es un hongo patógeno transmitido por el suelo que puede sobrevivir en los residuos de maíz hasta 630 días, tanto en la superficie del suelo como en tallos enterrados a profundidades de 15 o 30 cm (Xu et al., 2023). En cuanto a la macromorfología de *Fusarium verticillioides* en agar PDA (figura 10a) el micelio es blanco al inicio, formando pigmentos que van de gris a violeta. En algunos cultivos conforme va envejeciendo, la hifa produce melanina para formas estructuras llamadas esclerocios (De la Torre-Hernández et al., 2014). Su micromorfología (figura 10b) en estado anamorfo contiene abundantes microconidias ovaladas con base plana y agrupadas en cadenas. Algunas cepas pueden producir macroconidias largas y delgadas con cinco o seis septos. Muestra una célula apical (curva) y otra basal (forma de pie) (de la Torre-Hernández et al., 2014)

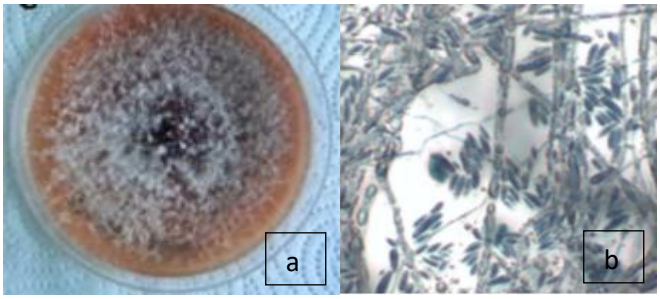



**Figura 10.** Macromorfología (a) y micromorfología (b) de *Fusarium verticillioides*

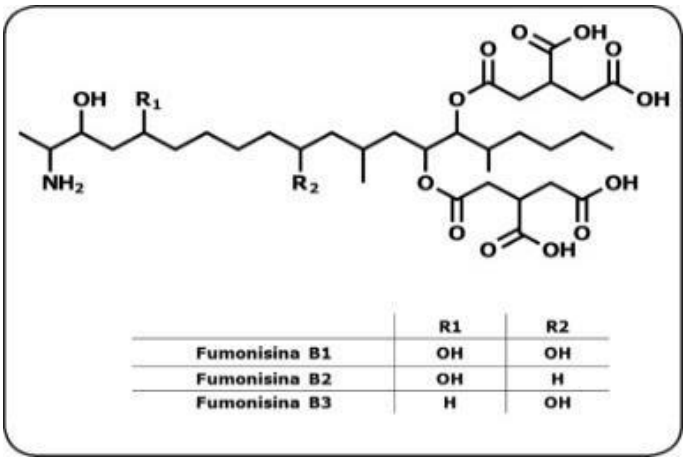
Fuente: De la torre et al., 2014

La importancia de identificar correctamente las especies pertenecientes al género *Fusarium* entre estas a *F. verticilliodes*, radica en que es un género que puede generar fusariosis invasiva (FI) que afecta a pacientes inmunocomprometidos (Tu et al., 2007).

La identificación de *Fusarium* spp. en el laboratorio clínico incluye características macroscópicas y microscópicas, como el color de la colonia, la longitud y forma de los macroconidios, y el número, forma y disposición de los microconidios, Sin embargo, la morfología por sí sola no siempre es suficiente para caracterizar especies crípticas, y la identificación de una cepa de *Fusarium* por su fenotipo puede ser errónea hasta en el 50% de los casos, por lo que es importante llevar a cabo estudios complementarios como lo es la caracterización genotípica (da Rosa et al., 2021).

El género *Fusarium* es el patógeno de plantas más prevalente que invade cultivos agrícolas, y las micotoxinas producidas por especies de este género son las más importantes económicamente (Huang et al., 2017). Dentro del grupo de metabolitos producidos por este género los más importantes por su toxicidad en humanos y animales, son las fumonisinas (FB), zearalenona (ZEA) y tricotecenos (Huang et al., 2019).

Existen alrededor de 15 fumonisinas, pero las más estudiadas son las FB1, FB2 y FB3 (figura 11), de las cuales la más toxica es la FB1, que, de acuerdo con la IARC, se encuentra clasificada dentro del grupo 2B como sustancia posiblemente carcinogénica en humanos, asociada a cáncer hepático y esofágico (Serrano y Cardona, 2015; Luo et al., 2018). Estos metabolitos son producidos principalmente por *Fusarium* el cual se desarrolla en un amplio rango de temperatura que va de 2 a 37 $^{0}$C. En un estudio realizado por Castellari et al. (2015), se reportó la contaminación por fumonisinas en el 100% de las muestras analizadas de maíz almacenado en silos bolsa, con concentraciones máximas de 5.707 mg/kg. Cendoya et al. (2018), reportan una tasa máxima de crecimiento de *F. proliferatum* en trigo cuando hay una alta actividad de agua (aw; 0.995) a 25 $^{0}$C; además a la misma aw, pero a 15 $^{0}$C se producen la mayor concentración de aflatoxinas totales (FB1, FB2 y FB3).




| | R1 | R2 |
|---|---|---|
| Fumonisina B1 | OH | OH |
| Fumonisina B2 | OH | H |
| Fumonisina B3 | H | OH |

**Figura 11.** Estructura química de las fumonisinas B1, B2 y B3.

Fuente: De la Torre et al., 2014.

### 7.5.3 *Penicillium verrucosum* y ocratoxinas

Otro de los hongos productores de micotoxinas que contaminan el sistema agroalimentario es *Penicillium verrucosum.* Este hongo es considerado un patógeno de almacenamiento. Sin embargo, aún existe una falta de conocimiento sobre la ecología de los hongos de almacenamiento antes de la cosecha, lo cual es esencial para mejorar el pronóstico y la prevención de las micotoxinas de *Penicillium* ((Köpke et al., 2007). El crecimiento de las colonias de *P. verrucosum* es lento alcanza de de 15 a 25 mm de diámetro, son de color verde opaco a verde oscuro y es un hongo que se desarrolla aproximadamente de 0 a 30 °C y hasta 0.80 de actividad de agua (Figura 12).

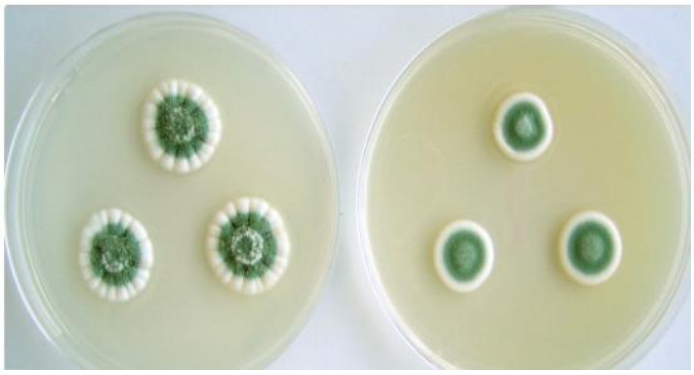


**Figura 12.** Macromorfología de las especies de *Penicillium verrucosum*

Fuente: Köpke et al., (2007)

Las ocratoxinas son metabolitos producidos principalmente por los géneros *Penicilium* y *Aspergillus*, siendo las principales especies productoras *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* y *P. verrucosum*, siendo el maíz uno de los principales cereales contaminados. Hasta el momento se han descrito 5 tipos de ocratoxinas la A, B, C, α y β; pero la más toxica es la ocratoxina A (figura 13), la cual es considerada una sustancia posiblemente carcinogénica, catalogada dentro del grupo 2B de acuerdo con la IARC (Kumar et al., 2020; González, 2010). Esta última micotoxina se encuentra asociada a efectos nefrotóxicos, mutagénicos y cancerígenos; y es sintetizada principalmente por *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*.

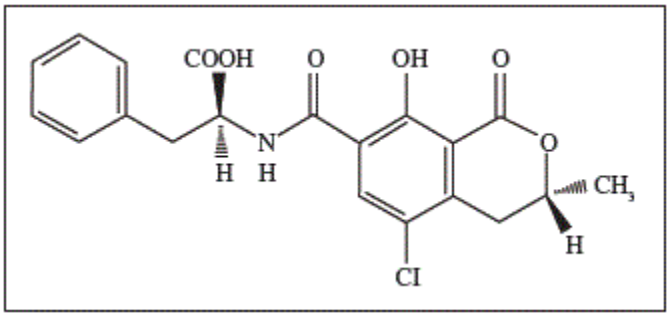


**Figura 13.** Estructura química de la ocratoxina A (OTA).

Fuente: Ravelo et al., 2011

Majeed et al. (2013), reportan la contaminación por ocratoxina A con un valor de 5.29 µg/kg en muestras de maíz en Pakistán. En otro estudio realizado por Ibáñez et al. (2011), se reportó la contaminación por ocratoxina A en el 39% de las muestras analizadas de trigo y arroz, cuyos valores fueron de 0.37 µg/kg.

### 7.6 Control y prevención de hongos micotoxigénicos

Dado que las aflatoxinas pueden causar toxicidad aguda, subaguda y crónica en animales y humanos, se ha puesto mucho énfasis en el control o la eliminación de estos hongos y / o sus metabolitos tóxicos. Varias estrategias de control incluyen control biológico, desarrollo de cultivares resistentes, fungicidas y mantenimiento de relaciones hídricas casi óptimas en el cultivo a través del riego; control de insectos alimentadores de vainas y semillas; momento óptimo de excavación y cosecha; evitar daños mecánicos durante el cultivo, la cosecha y el manejo posterior a la cosecha; secado rápido posterior a la cosecha; además, el mantenimiento de la baja temperatura y la humedad relativa en el almacenamiento han sido ampliamente estudiados durante los últimos años recomendados para prevenir la contaminación por aflatoxinas (Wilson, 1995, Kabak et al., 2006; Jouany, 2007).

El estrés oxidativo está involucrado en el metabolismo secundario de los hongos, los cuales pueden usar especies reactivas de oxígeno que van a actuar como mensajeros inductores o moduladores de la biosíntesis de micotoxinas (Kumar et al., 2020). Por lo que, existe un

interés creciente por el uso de sustancias antioxidantes naturales que inhiban el crecimiento de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos, debido a su no toxicidad y por ser amigable con el ambiente (Dwivedy et al., 2016).

En un estudio realizado por Silva et al. (2012), se evaluó la actividad antifúngica de cuatro aceites esenciales, hinojo (*Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae), jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae), menta (*Mentha piperita* L., Lamiaceae) y tomillo (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae), frente a cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, sus resultados mostraron que los cuatro aceites tienen actividad antifúngica, las concentraciones efectivas para hinojo, jengibre, menta y tomillo fueron 50, 80, 50 y 50% (aceite / DMSO (dimetilsulfóxido); v/v) respectivamente. Asimismo, Kalagatur et al. (2020), evaluaron la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* y *Cymbopogon martini* sobre cepas de *A. ochraceus* y *Penicillium verrucosum*, y evidenciaron una inhibición fúngica del 100% en el crecimiento y producción de OTA, a concentraciones de 1500 y 2500 µg/g en granos de maíz, respectivamente.

También, Gemeda et al. (2014), evaluaron la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Cymbopogon martinii*, *Foeniculum vulgare* y *Trachyspermum ammi* (T. ammi), sobre cepas de *Aspergillus,* sus resultados mostraron una mejor eficacia del aceite de *T. ammi*, al mostrar una inhibición micelial absoluta a 1 µl / mL con el aceite de *T. ammi*, asimismo, inhibió completamente la germinación de las esporas a una concentración de 2 µl / mL. También inhibió totalmente la producción de aflatoxinas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* a 0.5 y 0.75 µl / mL, respectivamente.

De manera que, el uso de aceites esenciales, representan una alternativa importante en el control de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos, que también serían de gran utilidad en

la producción de alimentos, debido a que el uso de agroquímicos representa un problema ambiental y de salud, además los aceites esenciales tienen baja toxicidad, alta volatilidad y son biodegradables (Gemeda et al., 2014).

Por otro lado, se conoce que algunas plantas son una fuente de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, lo que es de gran relevancia, ya que, a partir de éstos, se puede controlar la contaminación por micotoxinas en cultivos (Dikhoba et al., 2019). Los extractos de plantas son una alternativa para control de hongos durante la etapa de postcosecha. Además, en comparación con los antifúngicos químicos, los extractos de plantas son amigables con el ambiente, debido a su baja o nula toxicidad y poca persistencia en el ambiente (Rodriguez-Maturino et al., 2015).

Además, en comparación con los antifúngicos químicos, los extractos de plantas son amigables con el ambiente, debido a su baja o nula toxicidad y poca persistencia en el ambiente (Rodríguez et al., 2015).

En un estudio realizado por Gómez et al. (2020), se evalúo la actividad antifúngica a partir de extractos de semillas de manila, los autores reportan una inhibición del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum brevisporum*, del 100% después de 9 días y una germinación de esporas del 0% después de 20 h, con extracto de semillas de manila a 3 g/L. Andleeb et al. (2020), realizaron un estudio en el que reportan una actividad antifúngica mayor del 50% sobre cepas de *A. fumigatus* y *A niger*, mediante el uso de extractos de flores, bayas y hojas de *Argemone mexicana* L. Asimismo, Rodríguez et al. (2015), realizaron un estudio en el cual reportan una inhibición del 85% sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum* al quinto día de tratamiento, usando extractos fenólicos obtenidos de frutos de chiltepín. Por otro lado, Gómez et al. (2020), reportaron una actividad antifúngica del 100%

sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum brevisporum*, utilizando extracto etanólico de grano de Manila a 3 g/L, ya que se inhibió por completo después de 9 días y una germinación de esporas del 0% después de 20 horas.

### 7.7 *Rhododendron* spp. (azalea)

Se ha mostrado que las plantas son una fuente de moléculas biológicamente activas, las cuales producen metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Davicino Roberto et al., 2007). Por lo que una alternativa para el control de hongos podría ser el extracto de *Rhododendron* spp., una planta conocida como azalea (figura 14) y conformada por 8 subgéneros, su taxonomía se muestra en la Tabla 4 (Quimica.es, 2023). Son un grupo amplio de plantas leñosas, con aproximadamente 1025 especies, las cuales se distribuyen principalmente en el este y sudeste de Asia, así como, en América del Norte y Europa (Chang et al., 2021; Popescu & Kopp, 2013). Etimológicamente, la palabra *Rhododendron* proviene del griego: *rodos*:rosa y *dendron*:árbol, además de ser importantes plantas hortícolas con hermosas flores, muchas especies de *Rododendron* también se han utilizado como medicina popular para el tratamiento de bronquitis, asma, resfriado común, enfermedades de la piel, dolor e inflamación (Zeng et al., 2021).

**Figura 14.** Planta *Rhododendron* spp. (azalea)

Fuente: Propia, 2021

**Tabla 4.** Taxonomía de *Rhododendron*

| | |
|---|---|
| **División** | Magnoliophyta (Spermatophyta) |
| **Clase** | Magnoliopsida (Dicotyledoneae) |
| **Subclase** | Dilleniidae |
| **Orden** | Ericales |
| **Familia** | Ericaceae o Brezal |
| **Genero** | *Rhododendron* |
| **Especie** | spp. |

Fuente: (Quimica.es, 2023)

Las partes vegetativas de las plantas, el néctar y la miel obtenida de especies de *Rhododendron* spp., contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos, principalmente arbutósido, y algunos flavonoides derivados del kanferol y del quercetol (García et al., 2005).

En un estudio realizado por Martínez et al. (2017), se determinó la actividad antifúngica del ácido clorogénico, un metabolito secundario fenólico que se acumula en diversos tejidos

vegetales y se puede encontrar en varios subproductos y desechos agroindustriales, los autores reportan que este metabolito mostró una inhibición del 100% en el crecimiento micelial y en la germinación de esporas de *Aspergillus flavus*. Asimismo, Rodriguez-Maturino et al. (2015), realizaron un estudio en el cual reportan una inhibición del 85% sobre la germinación de conidios de *F. oxysporum* al quinto día de tratamiento, usando extractos fenólicos obtenidos de frutos de chiltepín.

Otros estudios han demostrado que, componentes de las plantas tales como flores, hojas y tallos, pueden ser aprovechados para obtención de extractos que controlen el crecimiento de microorganismos, particularmente de hongos potencialmente aflatoxigénicos. Debido a que, los principales compuestos bioactivos con actividad antioxidante que se obtienen de productos vegetales son ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales presentan actividad antimicrobiana (Castromonte et al., 2020).

Debido a esto, existe un interés creciente en nuevas iniciativas legislativas para restringir el uso de los pesticidas químicos comerciales existentes e incentivar el desarrollo de nuevos plaguicidas fúngicos que sean amigables con el medio ambiente y no generen residuos tóxicos, lo cual da lugar a problemas ambientales y de salud. Por lo tanto, son necesarias medidas sustentables para el control de hongos micotoxigénicos y sus metabolitos.

# 8. DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

## 8.1 Sitios de muestreo

El muestreo de aislados de hongos presuntivamente micotoxigénicos, se llevó a cabo en áreas de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz, así como en sitios de almacenamiento de maíz híbrido, almacenado a la intemperie. Los sitios de muestreo muestreo fueron: Junta Auxiliar la Resurrección (JAR), San Salvador el Seco (SSS), Tlaltepango (TLA) y Nativitas (NAT), los dos primeros sitios pertenecientes al estado de Puebla y los otros dos sitios ubicados en el estado de Tlaxcala (figura 15). La obtención de las muestras se realizó en un muestreo representativo de suelo agrícola con base en los lineamientos de la NOM-021-SEMARNAT-2000 y el muestreo de maíz almacenado se realizó con base en la NOM-188-SSA1-2002. La figura 16, muestra una amplificación de los sitios donde se llevó a cabo el muestreo den los sitios de Puebla (JAR y SSS), en ambos se observar la presencia de zonas urbanizadas. La figura 17 se muestra el mapa del uso de suelo en las zonas de muestreo JAR y SSS, que pertenecen al grupo de vegetación de tipo agricultura de temporal, a pesar de que ambas zonas se encuentran cercanas a zonas urbanizadas. Asímismo, la figura 18 muestra la imagen amplificada de los sitios de muestreo en Tlaxcala (TLA y NAT), donde también se observa la cercanía con zonas urbanizadas, sin embargo el uso de suelo en las zonas de muestreo, tanto de Tlaltepango como de Nativitas, pertenecen al grupo de vegetación de tipo agricultura de temporal (figura 19), al igual que las zonas de muestreo Junta Auxiliar la Resurrección como a San Salvador el Seco, a pesar de que ambas zonas se encuentran cercanas a zonas urbanizadas.

**Figura 15.** Geolocalización de los sitios de muestreo: Junta Auxiliar la Resurrección (N 19° 6' 50.3", O 98° 8' 10.5"), San Salvador el Seco (N 19° 9' 50.5", O 97° 37' 48.5"), Tlaltepango (N 19° 7' 15.047", O 98° 9' 17.704") y Nativitas (N 19° 14' 3.5", O 98° 18' 41.5").

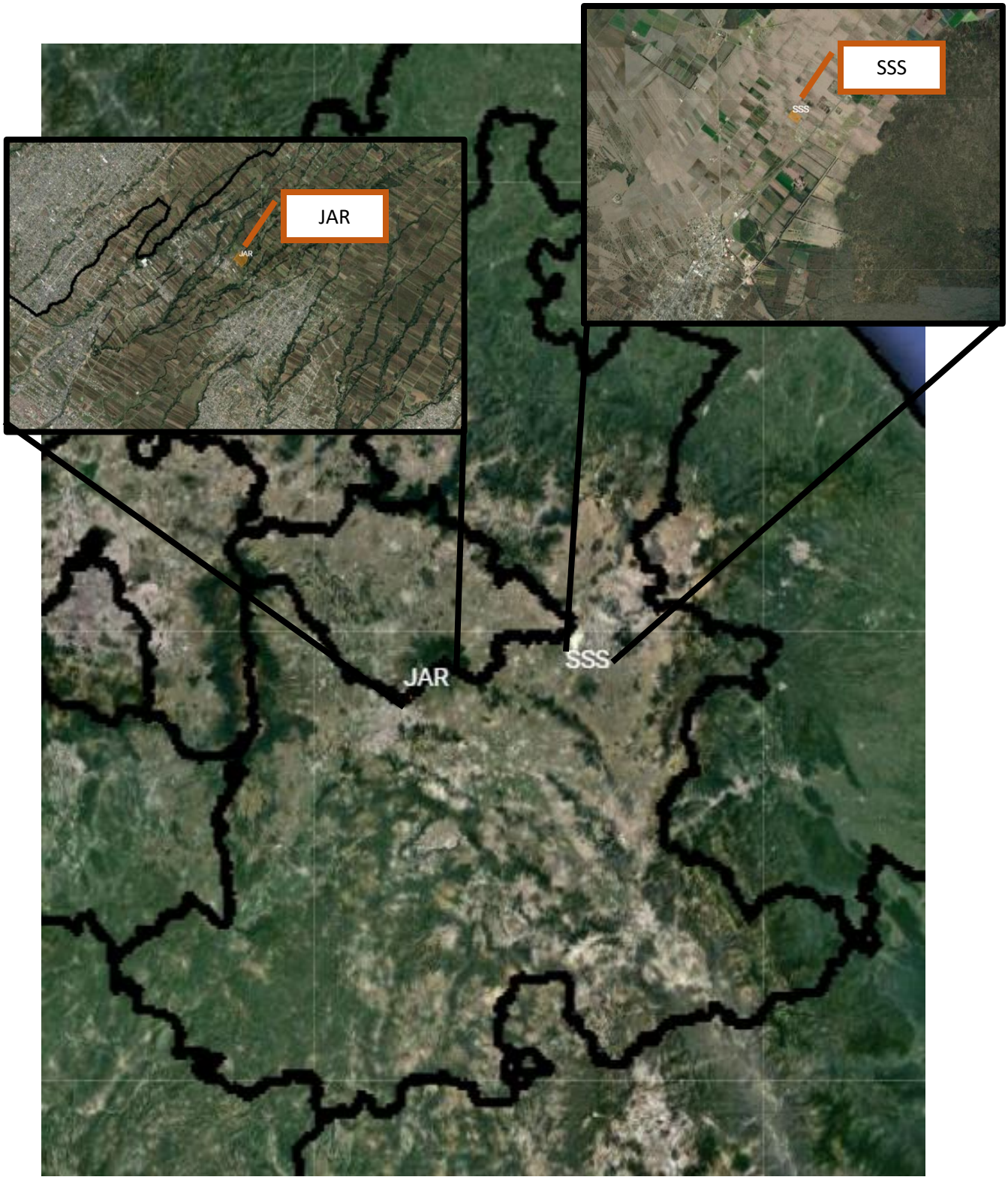



**Figura 16**. Localización de las zonas de muestreo SSS y JAR en el estado de Puebla

Fuente: Sistema de Información Geográfica para la Evaluación del Impacto Ambiental (SIGEIA) (2023)

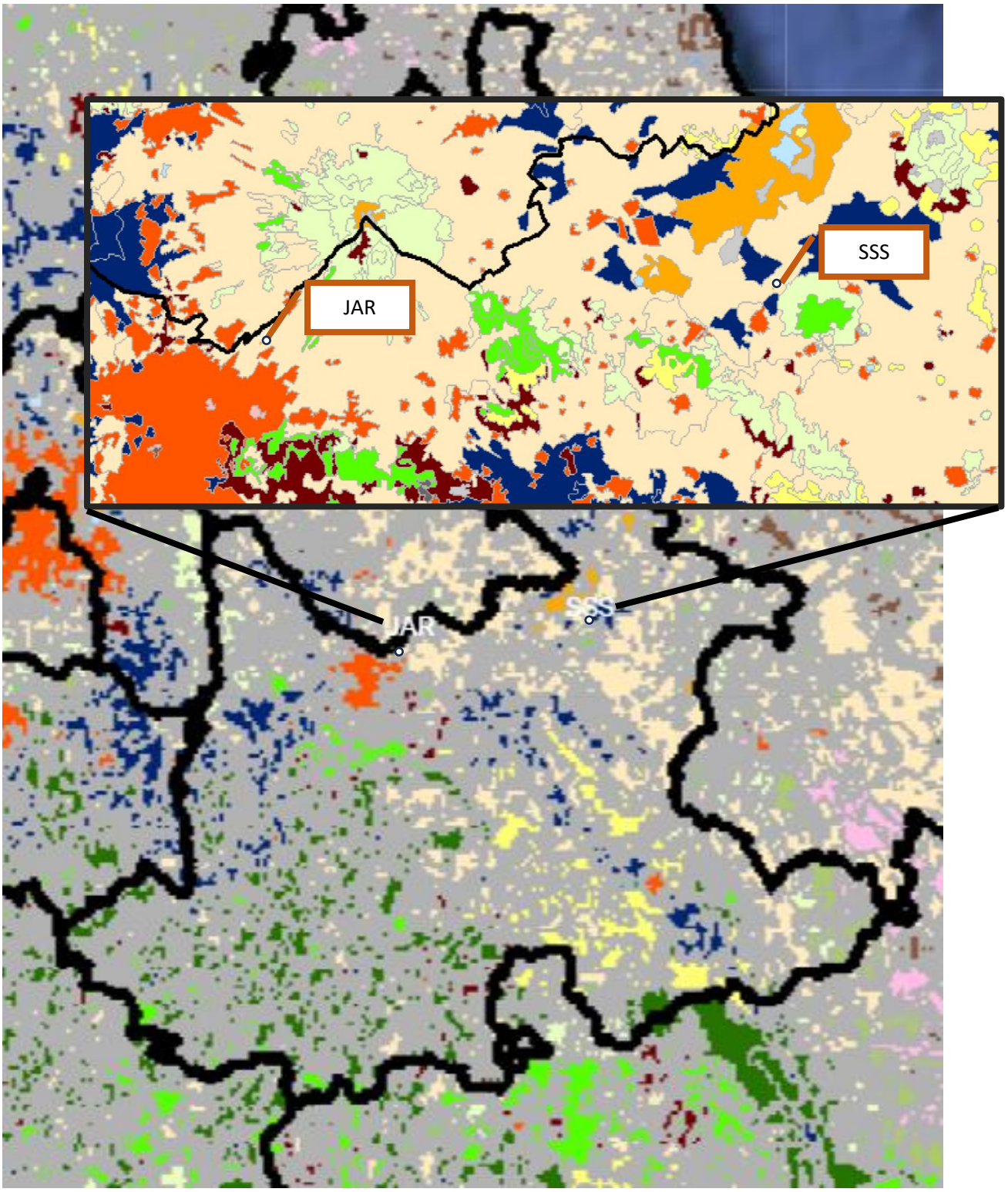



**Figura 17**. Uso de suelo del estado de Puebla, en SSS (San Salvador el Seco) y JAR (Junta Auxiliar la Resurrección)

Fuete: SIGEIA (2023)

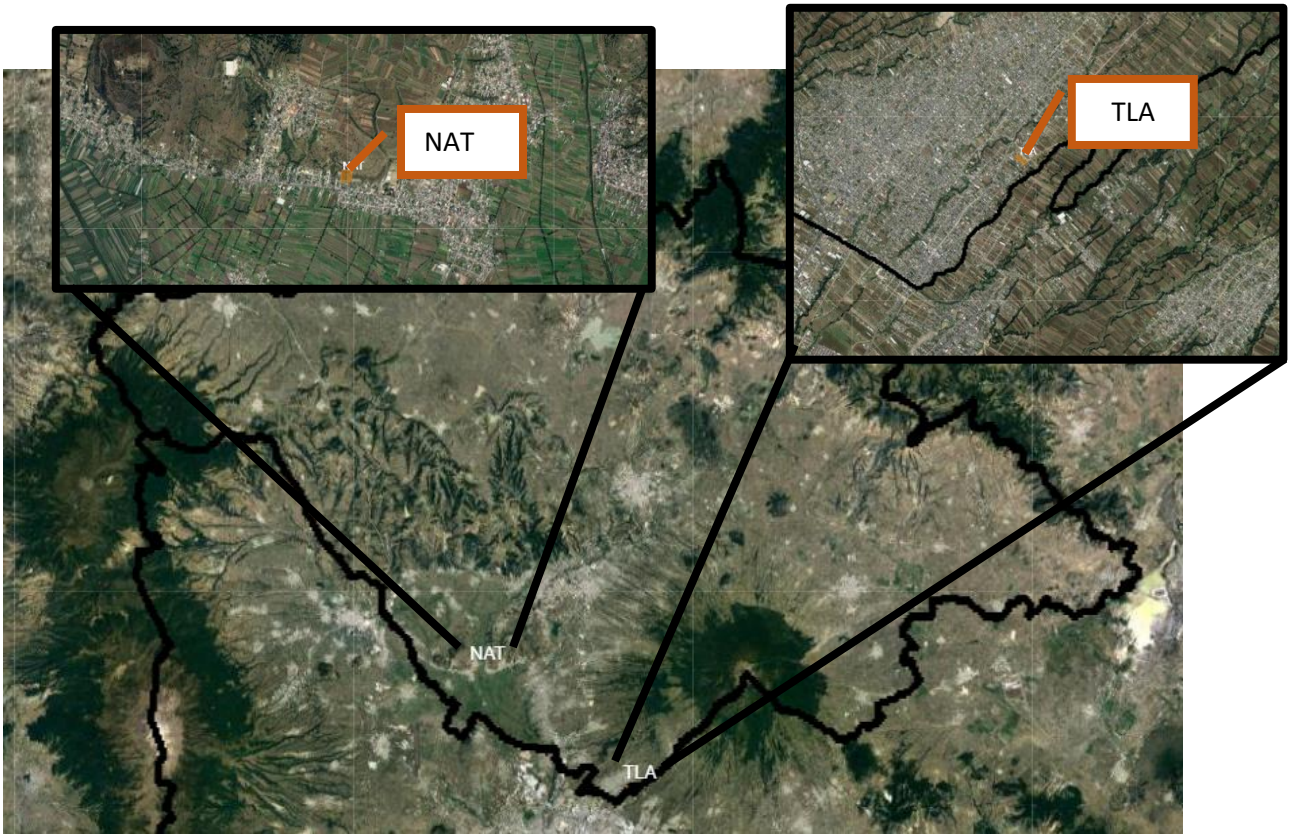



**Figura 18**. Localización de las zonas de muestreo TLA y NAT en el estado de Tlaxcala

Fuente: SIGEIA (2023)

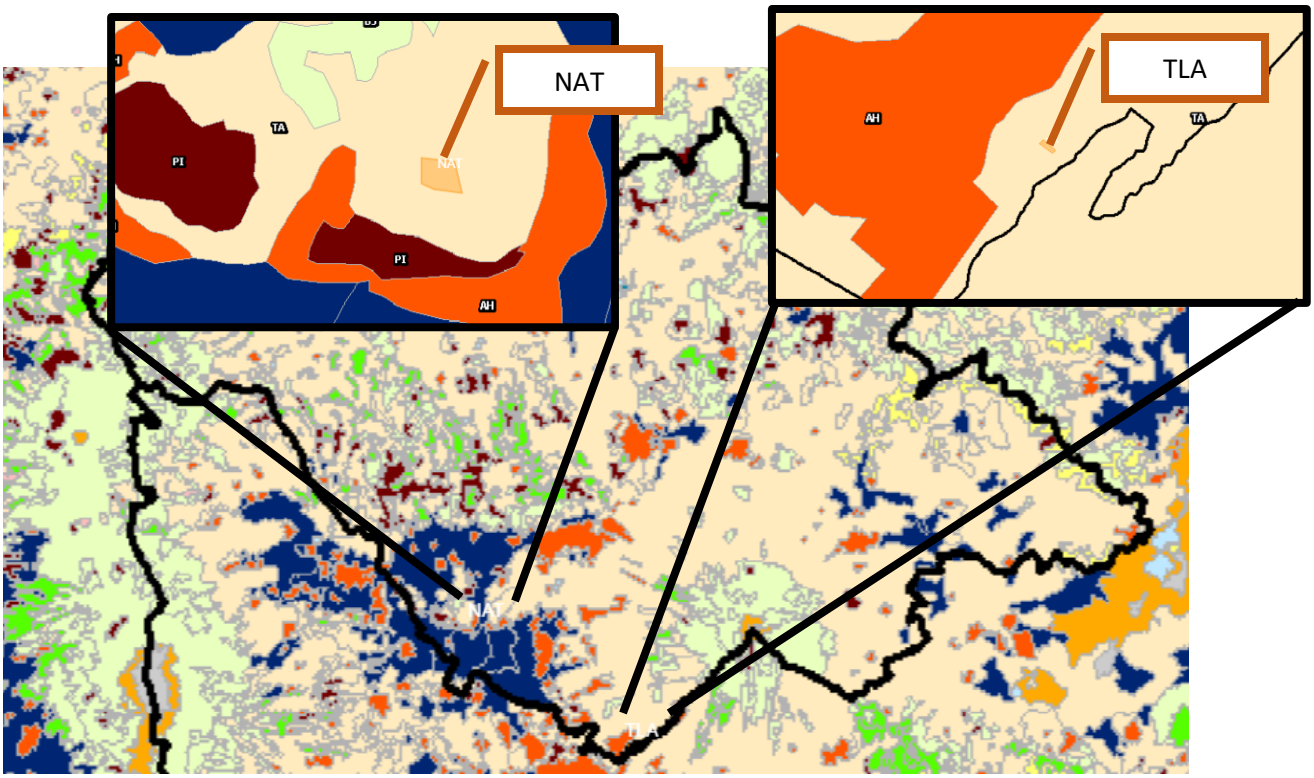



**Figura 19**. Uso de suelo del estado de Tlaxcala, en SSS (San Salvador el Seco) y JAR (Junta Auxiliar la Resurrección)

Fuete: SIGEIA (2023)

### 8.2 Aislamiento de hongos potencialmente micotoxigénicos

Para la recuperación de cepas de hongos potencialmente micotoxigénicos se utilizaron los medios ADS y AFPA. Se realizó un extendido en superficie de las cepas micotoxigénicas, sobre las placas con los medios. Posteriormente, se incubaron a una temperatura de 28 ± 2 $^{0}$C durante un período de 4 a 7 días, con la finalidad de obtener las cepas presuntivas de hongos potencialmente micotoxigénicos. Una vez obtenido el crecimiento de algunas de las cepas, para la obtención de cultivos axénicos las colonias presuntivas se sembraron en tubos con agar dextrosa Sabouraud los cuales fueron incubados a la misma temperatura que se mencionó y durante el mismo período. Una vez obtenidos los cultivos axénicos se les realizó

la técnica de microcultivos, esta técnica permite la correcta identificación microscópica de estructuras fúngicas. Posteriormente, se corroboró la identificación macromorfológica y micromorfológica usando claves taxonómicas especializadas (Rippon & Castañeda, 1992; Cepero et al., 2012; Bonifaz, 2015).

### 8.3 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas

La caracterización molecular de las cepas obtenidas identificadas como potencialmente micotoxigénicas se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Medicina de la UNAM. Para la caracterización molecular de las cepas potencialmente micotoxigénicas, fue necesario realizar cultivos monospóricos de estos aislados (figura 20). La importancia de estos cultivos para la correcta identificación molecular radica en que, estos permiten contar con aislados genéticamente homogéneos, con una mayor estabilidad en todas sus propiedades. Ya que, características como: la germinación, tasa de crecimiento y los factores de virulencia, se ven mejoradas (Ayala-Zermeño et al., 2012). Además, estos cultivos permiten que los resultados puedan ser reproducibles, libres de contaminación; incluso, es un método relativamente sencillo, de bajo costo y eficaz.

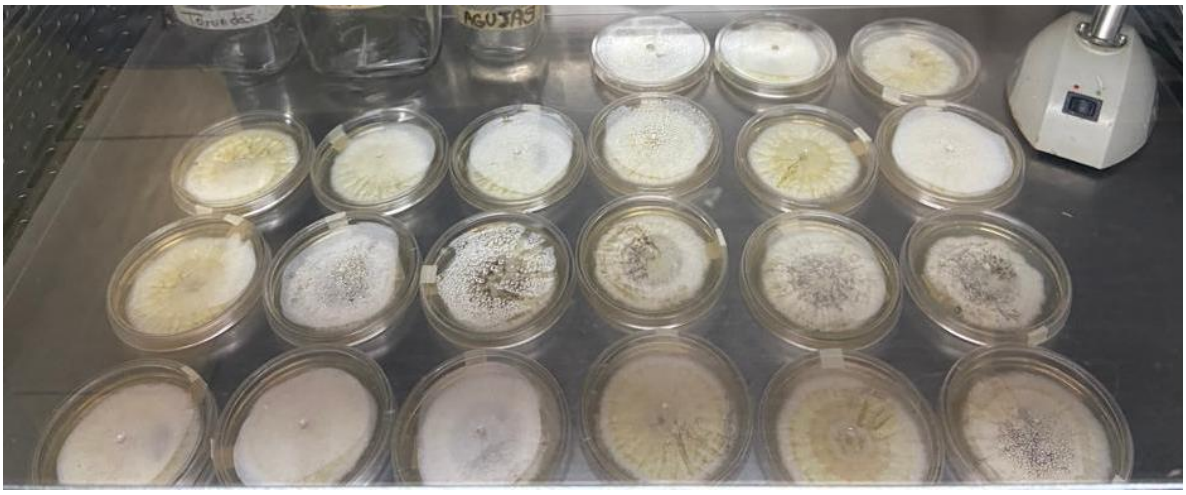


**Figura 20.** Cultivos monospóricos de *Aspergillus flavus* en ADS

De estos cultivos monospóricos se sembró *Aspergillus flavus* en medio YPD, del micelio desarrollado se hizo la extracción de DNA, a partir del cual se hizo la amplificación de la secuencia parcial del gen BenA (beta-tubulina).

Los aislados identificados fenotípicamente como *A. flavus*, se cultivaron en PDA (Bioxón, México D.F., México) durante 3 días a 28°C. A partir de estos cultivos, se obtuvo una suspensión de conidios agregando 1 ml de tampón PBS con Tween® 20 al 0,5% a cada tubo y agitando las soluciones en un vórtex (Daigger Vortex-Genie 2®, Scientific Industries Inc., NY, EE. UU.). Posteriormente, esta suspensión de conidias se sembró en medio líquido YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) y se incubó a 37°C con agitación durante 2 días o hasta que se observó crecimiento micelial. La biomasa micelial de cada aislado se filtró en un embudo Büchner con papel de filtro estéril, se lavó con agua milliQ® y se eliminó el exceso. La extracción de ADN se realizó con un kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, Madison, WI, EE. UU.), según las instrucciones del

fabricante. La biomasa micelial de cada aislado (100 mg) se colocó en microtubos de 1,5 mL que contenían 0,2 g de perlas de vidrio y se agregaron 600 µL de solución de lisis. Los tubos se colocaron en un dispositivo FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, EE. UU.) para alterar el micelio. El ADN total se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se comparó con diferentes concentraciones (10, 30 y 50 ng/µL) del fago λ (Gibco BRL®, San Francisco, CA, EE. UU.), teñido con ácido nucleico GelRed™. gel 10000X (Biotium, EE. UU.). Además, también se cuantificó mediante espectrofotometría UV utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

La amplificación por PCR del gen BenA se realizó según lo descrito por Glass y Donaldson [17] y los oligonucleótidos utilizados fueron Bt2a (5`-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3´) y Bt2b (5´-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3´). Para la mezcla de reacción se utilizó un volumen de 25 µL, con 1,5 mM de MgCl2, 200 µM de cada dNTP, 1U/µL de ADN polimerasa Taq, 10 µM de cada cebador y 5 ng/µL de ADN y 30 pmol de cada uno. oligonucleótido. La amplificación se realizó en un termociclador (Bio-Rad, CA, USA) con las siguientes condiciones: 95°C por 8 min, 35 ciclos de 95°C por 15 s, 55°C por 20 s y 72°C. C durante 1 min, y un ciclo de 72 C durante 5 min. Los productos de PCR fueron enviados para secuenciación en ambas direcciones por Macrogen USA (Rockville, MD, EE. UU.), utilizando el método Sanger.

### 8.4 Extracto *Rhododendron* spp. por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS)

Se llevo a cabo el muestreo de plantas silvestres de *Rhododendron* spp. (azalea) en dos jardineras localizadas en el municipio de Puebla en su etapa madura (figura 21). Se muestrearon hojas, tallo y flor, el análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana y el laboratorio de Micología, ambos de la BUAP. Las muestras recolectadas fueron pesadas, obteniendo un peso de 120g (flores), 45g (hojas) y 30g (tallos).

A las muestras recolectadas se les retiró el polvo y se enjuagaron con agua. Es importante mencionar que las hojas, flores y tallos que presentaron daños provocados por insectos o por algún otro medio, fueron desechados. Seguido de esto, se realizó el secado (figura 22) de las muestras a temperatura ambiente y el tiempo de secado fue menor a 7 días. En el caso de las muestras de flor se realizaron dos tiempos de secado uno fue de 5 días y otro de 7 días, el tiempo de secado puede influir en conservar las propiedades antimicrobianas (Cendrowski et al., 2020). Y, posteriormente se realizó la molienda de las hojas, flores y tallos muestreados, esto por separado.

**Figura 21.** Jardineras muestreadas de *Rhododendron* spp

**Figura 22.** Muestras obtenidas de flor (A), tallo (B), y hoja (C) de *Rhododendron* spp

Para la extracción se utilizó como solvente etanol grado reactivo analítico. Primero se colocarón las moliendas en un frasco de vidrio, previamente esterilizado, posteriormente la molienda se cubrió con el solvente y se tapó el frasco para dejar macerar a temperatura ambiente, esto en un lugar fresco y con poca iluminación durante 5 días. Durante este período el frasco se agitó constantemente con la finalidad de obtener una extracción más eficiente. Al finalizar este tiempo, con ayuda de embudos y lana de vidrio se filtró la mezcla.

Una vez obtenido el extracto, se sometio al proceso de concentración como se describe a continuación: se colocó el matraz conteniendo el volumen total obtenido del extracto, en el rotavapor, a una temperatura de 42 $^{0}$C con vacío de 40-50 mmHg. A partir de este punto hubo dos procesos: 1) con presencia de agua se recuperó el solvente y se llevó a cabo la separación, el extracto turbio se filtró con sulfato de sodio anhidro para posteriormente ser filtrado con

sílica gel y el extracto final que se obtuvo se llevó a 1 ml. 2) sin presencia de agua, el cual consistió en recuperar el solvente, al mismo tiempo de recuperar el extracto, a través del filtrado con sílica gel, para posteriormente llevarlo a 1 ml.

Para analizar los componentes del extracto concentrado y purificado, se inyectó 1 µL de éste en el sistema GC/MS de acuerdo con las siguientes indicaciones:

Cromatografía de gases. Se empleó un equipo HP 6890/columna HP-5MS equipado con una columna HP-5MS de 60x0.25mmx0.25umlD, la columna contó con una longitud de 60m, un flujo constante, una velocidad promedio de 37cm/s y una presión de 7.85psi. La programación de temperatura fue la siguiente: temperatura inicial de 56°C con un incremento de 12°C/min hasta llegar a los 194°C manteniéndose por 1min para continuar con un aumento de temperatura de 10°C/min hasta llegar a 280°C y mantenerse así por 15min. El gas portador fue helio, la inyección se efectuó en modo Splitless a una temperatura de 270°C.

Espectrometría de masas. Se utilizó un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5973 Network el modo de adquisición es Scan (35 u.m.a. a 500 u.m.a.). La identificación se realizó partir del espectro de masas que se generó para cada pico cromatográfico obtenido mediante la biblioteca NIST02.

### 8.5 Evaluación antifúngica del extracto *Rhododendron* spp.

Bajo condiciones de esterilidad, con un asa micológica se realizó un raspado de las esporas en el cultivo monospórico desarrollado en agar dextrosa Sabouraud y se colocó en un tubo con 10 ml de agua. Posteriormente, se evaluó su densidad óptica con la finalidad de obtener una concentración inicial de esporas de aproximadamente $3X10^8$. A través del estándar de

McFarland ya que, una turbidez de 1 en la escala de McFarland tiene la concentración necesaria para este análisis (Centros para el Control y la Prevención de enfermedades & Organización Mundial de la Salud, 2003).

Una vez obtenida la concentración deseada, a partir de esta dilución (1:10) se realizaron las siguientes diluciones seriadas logarítmicas decimales de base 10 (1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000). Posteriormente, en diferentes tubos eppendorf se adicionarán 100 µL de las diluciones 1:10000 y 1:100000, por separado, y en cada uno se adicionó el mismo volumen del extracto de *Rhododendron* spp.. La mezcla se dejó en contacto durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se colocarón 200 µL de la mezcla en agar dextrosa Sabouraud y se realizó un extendido en superficie por triplicado. Como testigo, se usaron 100 µL de la suspensión de conidios (por triplicado). Las placas inoculadas con el agar fueron incubadas a $28^0$C. El periodo de incubación fue de 7 días, transcurrido este tiempo se realizó el conteo de las UFC´s.

# 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 9.1 Muestreo

En el muestreo se obtuvieron 67 muestras de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz y 80 muestras de maíz criollo almacenado a la intempeerie. En San Salvador el Seco (SSS) y la Junta Auxiliar la Resurrección (JAR), se obtuvieron un total de 20 muestras tanto de suelo como de maíz en cada sitio muestreado. Y, en Tlaltepango (TLA) 15 muestras de suelo y en Nativitas (NAT) 12 muestras, mientras que, de maíz en estos últimos dos sitios se recolectaron 20 muestras en cada uno.

Así también, se identificaron las características socioambientales de las zonas de muestreo, con la finalidad de conocer las similitudes o diferencias de estos datos entre los sitios muestreados (Tabla 5). Como se puede observar en la Tabla 5 los cuatro sitios muestreados presentan similitudes entre sus características socioambientales. Sin embargo, en San Salvador el Seco el clima es semiseco templado, a diferencia de los otros tres sitios que presentan un clima templado subhúmedo. Así también, la precipitación puede llegar a ser menor que en los otros tres sitios, con un valor de 300 mm.

**Tabla 5**. Características socioambientales de los sitios muestreados

| Características socio-ambientales | San Salvador el Seco | Junta Auxiliar la Resurrección | Tlaltepango | Nativitas |
|---|---|---|---|---|
| **Tipo de suelo** [1] | Regosol y litosol | Regosol y fluvisol | Regosol, fluvisol y andosol | Regosol, Fluvisol, litosol y andosol |
| **Clima**[2] | Templado subhúmedo | Templado subhúmedo | Templado subhúmedo | Templado subhúmedo |
| **Rango de temperatura**[3] | 13-15 $^0$C | 10-16 $^0$C | 12-16 $^0$C | 14-16 $^0$C |
| **Precipitación**[3] | 300-900 mm | 400-900 mm | 800-1000 mm | 800-1000 mm |
| **Zona**[3] | Urbana | Rural | Urbana | Urbana |
| **Grado de marginación**[4] | Medio | Bajo | Bajo | Bajo |
| **Altitud (msnm)**[5] | 2421 | 2291 | 2450 | 2300 |

Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2023)

### 9.2 Aislamiento de hongos potencialmente micotoxigénicos

En el presente trabajo de investigación se identificaron cepas pertenecientes principalmente a los géneros *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Paecilomyces* spp y *Aspergillus* spp., tal como se puede ver en la figura 23. Sin embargo, de acuerdo con la morfología colonial solo se identificaron cepas presuntivas de especies potencialmente micotoxigénicas pertenecientes a *A. flavus*.

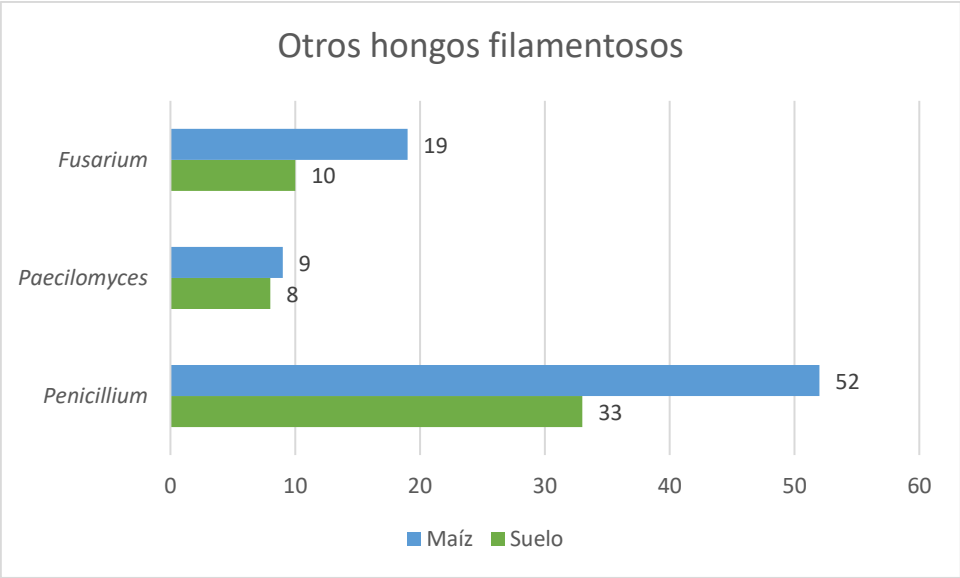



**Figura 23.** Número de aislamientos de otros hongos filamentosos

Se aislaron un total de 34 cepas de *A. flavus*, las cuales fueron conservadas en el cepario del laboratorio de micología del ICUAP-BUAP. De las cepas de *Aspergillus flavus* identificadas, 21 se aislaron de muestras de maíz y 13 de suelo agrícola (figura 24).

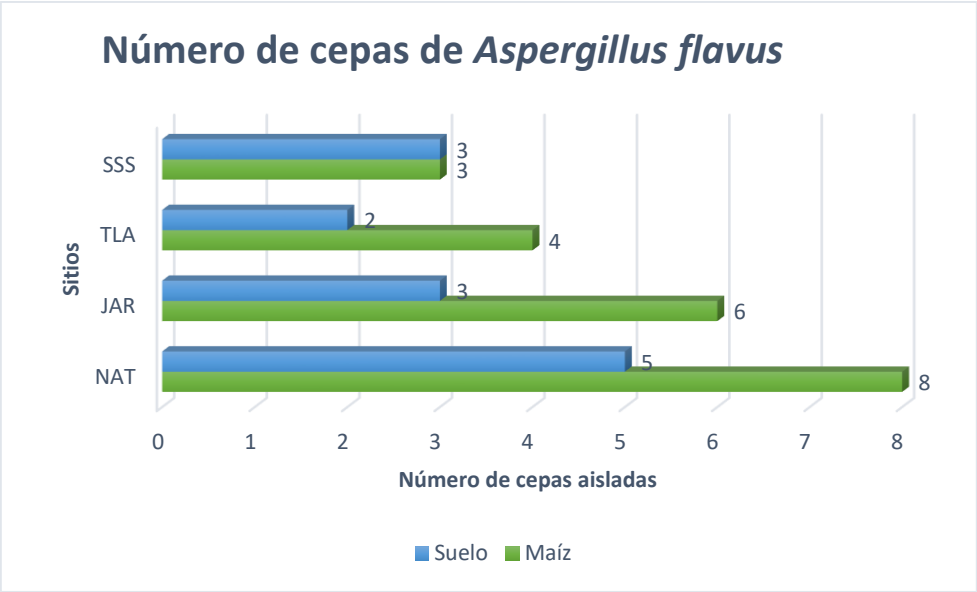



**Figura 24.** Número de aislamientos de *Aspergillus flavus* obtenidas a partir de suelo agrícola y maíz almacenado a la intemperie.

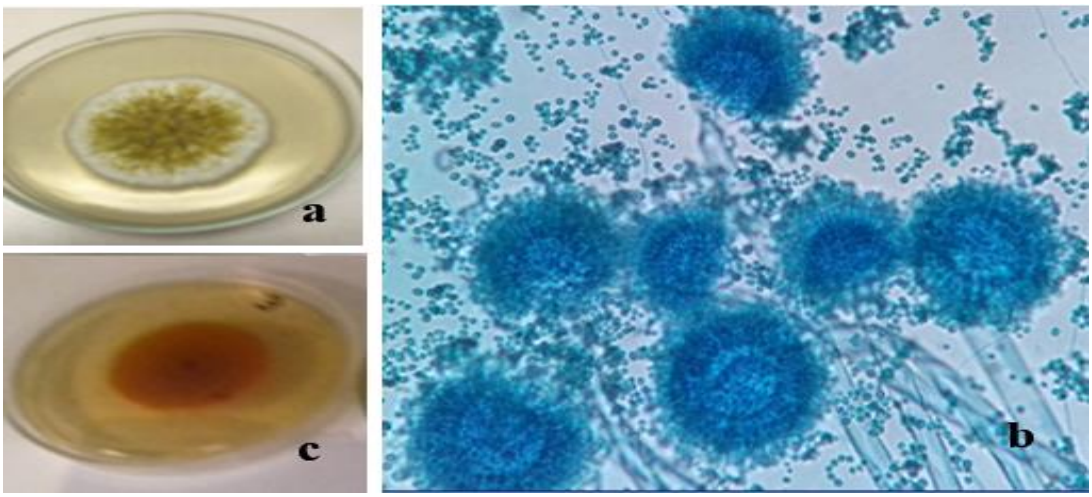



**Figura 25.** Morfologia de *A. flavus*.- a: anverso de la colonia de *A. flavus* en medio ADS, b: micromorfología de *A. flavus*, c: reverso colonial de *A. flavus* en medio diferencial AFPA.

Como se puede observar la morfología colonial mostró un color amarillo verdoso con micelio blanco, con una textura polvorienta y algodonosa con surcos radiales, el reverso era incoloro en medio ADS. Además, en la micromorfología a 40X se observó micelio septado, hialino, ramificado, con conidióforos largos, cenocíticos, vesículas esféricas, con 1 a 2 series de fialides, conidios de forma globosa a elipsoide. La descripción macro y micromorfologica coincide con lo descrito por Pimenta et al. (2020) y Saif et al. (2021) .

Todos los aislados recuperados de *A. flavus* dieron positivo al crecimiento en medio diferencial AFPA. De acuerdo con Corry et al. (2003), este es un medio selectivo para la recuperación en alimentos de los hongos productores de micotoxinas tales como: *A. flavus* y *A. parasiticus*. Además, este medio permite reconocer colonias de estos hongos a las 42-48 h a 30± 2 $^{0}$C. Lo cual coincide con los aislados recuperados de *A. flavus*, ya que como lo menciona Corry et al. (2003), al anverso de las colonias se presentó un pigmento de color amarillo anaranjado (figura 25c). Esta pigmentación es debido a que estos hongos producen ácido aspergílico o ácido noraspergílico, que reaccionan con el citrato de amonio férrico para formar el complejo de color naranja (Hocking, 2014). Cabe mencionar que esta pigmentación no es indicativa de la presencia de aflatoxinas.

### 9.3 Identificación molecular de cepas micotoxigénicas

En la figura 26 se puede observar el corrimiento electroforético de 7 cepas caracterizadas ASP-03, ASP-07, ASP-08, ASP-09, ASP-12, ASP-15 y ASP-17, en la figura 27 se puede observar el corrimiento electroforético de las 27 cepas restantes de las 34 recuperadas de *A. flavus,* todas las cepas de *A. flavus* se amplificaron utilizando el gen beta tubulina. Con esto,

queda demostrado que el gen *BenA* es un marcador de amplificación adecuado para especies de *A. flavus*.

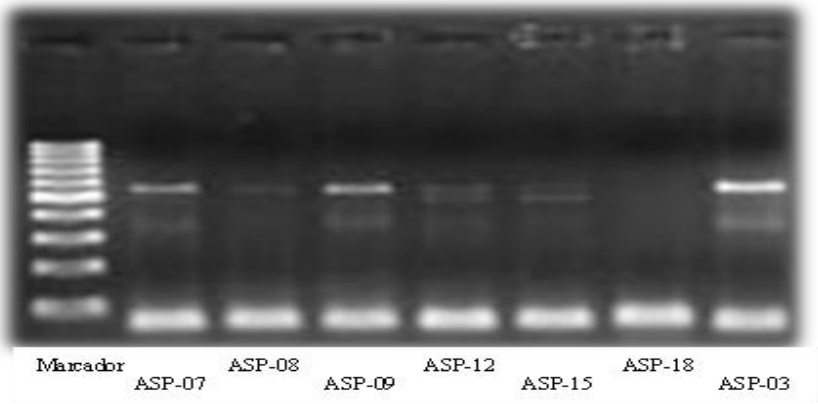



**Figura 25:** Corrimiento electroforético de la Amplificación de la secuencia parcial del gen *BenA* de aislados presuntivos de *A. flavus.*

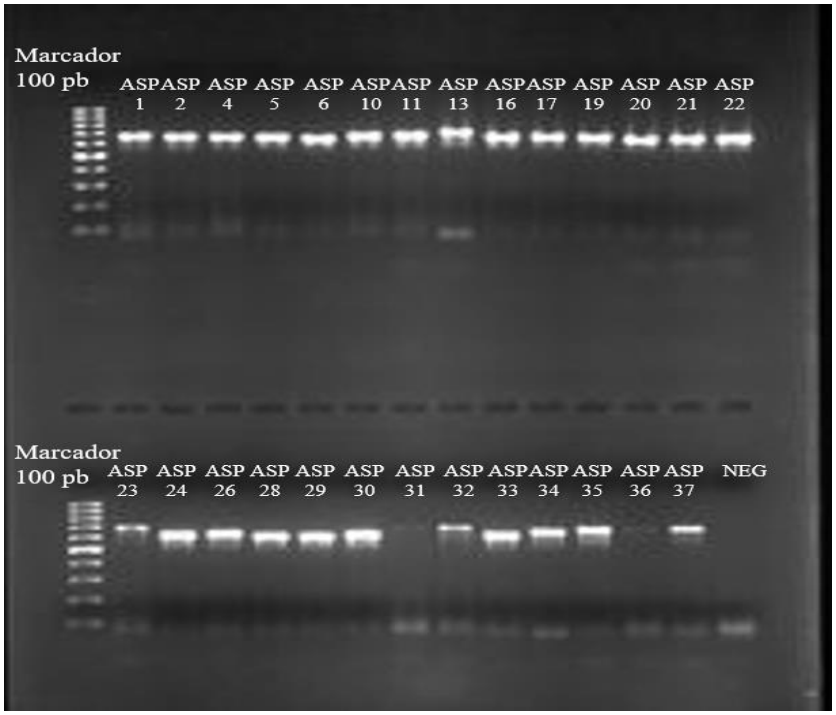


**Figura 26.** Corrimiento electroforético de la amplificación de la secuencia parcial del gene *BenA* de aislados presuntivos de *A. flavus.*

Las secuencias obtenidas una vez que estas se enviaron a secuenciar a Macrogen USA (Rockville, USA), se editaron en la interfaz BioEdit 7.2, que es un editor de alineación de secuencias.

Como resultado de estas ediciones se obtuvieron las secuencias consenso de las cepas ASP-01, ASP- 02, ASP-03, ASP-04, ASP-05, ASP-06, ASP-07, ASP-08, ASP-09, ASP-10, ASP-11, ASP-12, ASP-13, ASP-15, ASP-16, ASP-17, ASP-18, ASP-19, ASP-20, ASP-21, ASP-22, ASP-23, ASP-24, ASP-26, ASP28, ASP-29, ASP-30, ASP-31, ASP-32, ASP-33, ASP-34, ASP-35, ASP-36 y ASP-37 reportadas en la Tabla 6, así también se reporta el número de pares de bases (pb). Estas secuencias consenso se compararon con la secuencia del genoma de *Aspergillus flavus* NRRL 3357 (tubulin beta, putative (AFLA_068620), partial mRNA) depositada en el BLASTN 2.8.0 (programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local).

**Tabla 6.** Secuencias consenso de aislados de *Aspergillus flavus*

| **Secuencias consenso en formato fasta** |
|---|
| >ASP1_CONSENSO_520pb<br>TGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGCATG<br>ATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAG<br>CACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATATGGC<br>ATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGCGTA<br>TGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCCTGA<br>CCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTACCA |

TGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCCGGT
GCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACT

>ASP2_CONSENSO_546pb

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAA
CTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAA
ACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAAC
GACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCT
CCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGC
TTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTT
GAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTT
CGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP3_CONSENSO_535pb

AATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAA
AAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCT
CTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGAC
C
ATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTG
GAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAA
CTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCT
GGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCC
AGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGG

>ASP4_CONSENSO_548pb

TGGTAACCCCAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGSCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGA
ACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCA
AACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAA
CGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAAC
GCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATC
TTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTT
TTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP5_CONSENSO_523pb

CGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGC
ATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGC
GAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATAT
GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACT

>ASP6_CONSENSO_522pb

GGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGC
ATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGC
GAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATAT
GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACT

>ASP07_CONSENSO_538pb

TGTAACCAAATCTGTGCTGCTTTTTGGGGGGGGTTTATTCCTTCCCCCCAAAATAAGCTGGGGGCCAAGG
AATTCTTCTTTGCCAGATTTTGGGAGTCCGGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAA
ACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAAC
GACGACCATATGGCATTAAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTC
CAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCT

TTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTT
GAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTT
TCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTG

>ASP08_CONSENSO_479pb
GGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGC
ATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGG
CGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATA
T
GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
C
GTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCC
TGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTA
CCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTT

>ASP09_CONSENSO_540pb
TAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACT
CCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAA
CCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACG
ACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTC
CAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCT
TTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTT
GAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTT
TCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAG

>ASP10_CONSENSO_547pb
TGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGA
ACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCA
AACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAA
CGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAAC
GCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATC
TTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTT
TTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP11_CONSENSO_549pb
TTGGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGG
AACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGC
AAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA
ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGA
TCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAA
CGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT
CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP12_CONSENSO_548pb
TGGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGG
AACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGG
CAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACG
AACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCG
A
TCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAA
CGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGA
TCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTC
GTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP13_CONSENSO_536pb
TGGTAACCCCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGG
AACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGC

AAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA
ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGA
TCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAA
CGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT
CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAC

>ASP15_CONSENSO_497pb

TGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGA
ACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGC
AAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA
ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGA
T
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAAC
GCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT
CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCG
TTCGGCC

>ASP16_CONSENSO_498pb

TGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGA
ACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCA
AACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAA
CGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAAC
GCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATC
TTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGTGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TCGGCC

>ASP17_CONSENSO_539pb

TGGTAACCCCCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAG
GAACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGG
CAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACG
AACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCG
ATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAA
ACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTG
ATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTC
GTTTTCGGCCAGTCCSGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTC

>ASP18_CONSENSO_535pb

AACCCCCAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAA
CTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCA
AACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAA
CGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGAT
C
TCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACG
CTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATC
TTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTC

>ASP19_CONSENSO_534pb

GGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATRCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGCA
TGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGCG
AGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATATG
GCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAGC
GTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTCC
TGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGTA
CCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTCC
GGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP20_CONSENSO_524pb

CGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGC
ATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGC
GAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATAT
GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTA

>ASP21_CONSENSO_523pb

CGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGC
ATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGC
GAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATAT
GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACT

>ASP22_CONSENSO_535pb

CGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAGC
ATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGGC
GAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATAT
GGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP23_CONSENSO_551pb

TTTGGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAG
GAACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGG
CAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACG
AACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCG
ATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAA
ACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTG
ATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTC
GTTTTCGGCTCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP24_CONSENSO_523pb

CGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCCTCAAAAG
CATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGG
CGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATA
TGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAC

>ASP26_CONSENSO_537pb

TTGGTAACCCCAAATTGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAG
GAACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGG
CAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACG
AACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCG
ATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAA
ACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTG
ATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTC
GTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAA

>ASP28_CONSENSO_523pb

TCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAAAAG
CATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTCTGG
CGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACCATA
TGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTGGAG
CGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAACTC
CTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTGGT
ACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAGTC
CGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAC

>ASP29_CONSENSO_550pb

TTGGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGG
AACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGC
AAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA
ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGA
TCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAA
CGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT
CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP30_CONSENSO_547pb

TGGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGG
AACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGC
AAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA
ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGA
TCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAA
CGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT
CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP31_CONSENSO_546pb

GTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAA
CTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAA
ACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAAC
GACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCT
CCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGC
TTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTT
GAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGYTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTT
CGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACTGAGGGTA

>ASP32_CONSENSO_535

GGTAACCAAAAACGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATAGCTTTGGACCAAGG
AACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGC
AAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGA
ACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGA
TCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAA
CGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGAT
CTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGT
TTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAC

>ASP33_CONSENSO_541pb

GTAACCAAATTGGTGTTGCTTTGGGGTATGTCCCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAAC
TCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAA
CCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACG
ACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTC
CAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCT
TTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTG
AGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCAATCAGCTCTTCTTCGTCCCGCACAACTCTTTT
TTTGAGCCGGGTGGGGGGGGAACAGGGGAACACAGGGGTTATTCTCAT

>ASP34_CONSENSO_526pb

CAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACTCCTCAA
AAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAACCATCTC
TGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACGACGACC
ATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTCCAGCTG
GAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCTTTGCAA
CTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTGAGCCTG
GTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTCGGCCAG
TCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCAT

>ASP35_CONSENSO_533pb
TAACCAAAACGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGAACT
CCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCAAA
CCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAACG
ACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGATCTC
CAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAACGCT
TTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATCTTG
AGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTTTTC
GGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTC

>ASP36_CONSENSO_548pb
GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGGACCAAGGA
ACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAGGCA
AACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAACGAA
CGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCCGAT
CTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAAAAC
GCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTTGATC
TTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCGACAACTTCGTT
TTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTACACCTGAGGGTA

>ASP37_CONSENSO_540pb
TGGTAACCCAAAAACGGTGCTGCTTTCTGGTATGTCTCAATGCCTTCGAGTTAGTATGCTTTGAGACCAA
GGAACTCCTCAAAAGCATGATCTCGGATGTGTCCTGTTATATCTGCCACATGTTTGCTAACAACTTTGCAG
GCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTACAGCCTGTATACACCTCGAAC
GAACGACGACCATATGGCATTAGAAGTTGGAATGGATCTGACGGCAAGGATAGTTACAATGGCTCCTCC
GATCTCCAGCTGGAGCGTATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGCGTACCTCAAAATTTCAGCATCTATGAA
AACGCTTTGCAACTCCTGACCGCTTCTCCAGGCCAGCGGAAACAAGTATGTCCCTCGTGCCGTCCTCGTT
GATCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCCCTTCGGTCAGCTCTTCCGTCCCAGACAAC
TTCGTTTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTA

ASP: *Aspergillus*; pb: pares de bases.

Una vez comparadas en el BLAST las secuencias ASP-1, ASP-2, ASP-4, ASP-5, ASP-6, ASP-10, ASP-17, ASP-19, ASP-20, ASP-21, ASP-22, ASP-23, ASP-24, ASP-28, ASP-35 dieron como resultado 100% en porcentaje de identidad (% Ident) con *A. flavus*. Mientras que, ASP-16 y ASP-33 dieron resultados de 98% y 97% de identidad con *A. flavus,* respectivamente. Y, las cepas ASP-11, ASP-13, ASP-26, ASP-29, ASP-30, ASP-31, ASP-32, ASP-34, ASP-36 y ASP-37 presentaron porcentajes de identidad mayores del 99% tanto

con *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*. Cabe mencionar que las cepas ASP-03, ASP-07, ASP-08, ASP-09, ASP-12, ASP-15 y ASP-18, las cuales fueron previamente secuenciadas, dieron porcentajes de identidad mayores al 95% con *Aspergillus flavus*.

Se sabe que *A. flavus* y *A. oryzae* son especies de *Aspergillus* sección *Flavi*, importantes a nivel industrial, de salud; así como, en la biotecnología y alimentos (Abastabar et al., 2022). Una de las características que va a diferenciar estos hongos es su crecimiento, ya que, *A. oryzae* produce colonias color amarillo mostaza, mientras que *A. flavus* de color verde olivo en medio YES (extracto de levadura sacarosa) (Suleiman, 2023). Sin embargo, al ser especies estrechamente relacionadas en la evolución filogenética, con estos resultados queda demostrado que es necesario llevar a cabo una correcta identificación de *A. flavus*, a través de un enfoque polifásico. Porque, este hongo puede llegar a confundirse con *A. parasiticus* y *A. oryzae.* Pero, *A. flavus* es de relevancia mundial por ser el principal productor de aflatoxina B1, sustancia clasificada en el grupo 1 como cancerígena, de acuerdo con la IARC. Mientras que, *A. oryzae* generalmente es considerado como seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos y la Organización Mundial de la Salud, ya que, la mayoría de las cepas pertenecientes a esta especie no pueden producir aflatoxinas (Niu et al., 2023).

En un estudio realizado por (Nasri et al., 2015), reportan que, el PCR-RFLP del gen de la beta tubulina es una herramienta económica con la cual se pueden diferenciar especies de *A. flavus,* de una manera confiable y rápida.

Las 34 secuencias obtenidas de los aislamientos de *A. flavus* se depositaron en la base de datos GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabla 7), y se utilizaron para realizar el análisis filogenético mediante el Método de máxima verosimilitud. Los resultados mostraron un árbol en el que los aislamientos se agruparon en dos grupos. El Grupo I se subdividió en

siete subgrupos y el Grupo II se subdividió en dos subgrupos. El grupo Ia incluyó los aislamientos ASP-29, ASP-30, ASP-28, ASP26, ASP-24, ASP-23, ASP-22, ASP-21, ASP-20, ASP-19, ASP-18, ASP-17 , ASP-16, ASP-15, ASP-13, ASP-12, ASP11, ASP-10, ASP-09, ASP-08, ASP-06, ASP-05, ASP-04, ASP-01, ASP-02 , ASP-03, ASP-31, ASP-33, ASP-32, ASP-34, ASP-35, ASP-36 y ASP-37, y se asociaron con las secuencias de referencia de *A. flavus* (MG991316.1, MN148857.1, MN148875.1, MN148880.1, MN148881.1, MN148839.1, MN148878.1, MN148876.1, MN148858.1, MT009229.1, MN148836.1, KJ482654.1, JX51654.1 61.61MG.1 , con un bootstrap del 99 %. El grupo Ib incluyó las cepas de referencia de *A. aflatoxiformans* (MT261362.1, MT261361.1 y MT261356.1) y *A. austwickii* (MG517712.1, MG517702.1 y MG517704.1), con un bootstrap de 91 %. El grupo Ic agrupó el aislado ASP-07 y las secuencias de referencia de *A. arachidicola* (KX621174.1), *A. novoparasiticus* (KY924673.1), *A. parasiticus* var. *globosus* (EF203158.1), *A. sojae* (KX943523.1, KX943522.1 y KX943520.1). El ID de grupo incluía la secuencia de referencia de *A. mottae* (MG517687.1). El grupo Ie incluía la secuencia de referencia de *A. subflavus* (MG517773.1). El grupo If incluyó las secuencias de referencia de *A. caelatus* (MG517640.1, EF203127.1 y MG517738.1). El grupo Ig compuesto por las secuencias de referencia de *A. luteovirescens* (MG517625.1), *A. nomius* (MG517657.1, MG517762.1) y *A. pseudonomius* (MG517758.1 y MG517731.1). El grupo IIa incluía la secuencia de referencia de *A. togoensis* (FJ491477.1), con un bootstrap del 99% con el grupo IIb. Finalmente, el grupo IIb incluyó las secuencias de referencia de *A. lanosus* (FJ491479.1 y MG517633.1), *A. alliaceus* (MG517790.1, MG517787.1 y MG517791.1) y *A. neoalliaceus* (MG517613.1, MG517768 .1, MG517765.1 y MG517766.1) con un arranque del 99 % (Figura 27).

La correcta identificación de cepas de *A. flavus*, a través de un enfoque polifásico es de suma importancia, debido a la aparición de especies cripticas, ya que estos estudios nos permiten tener certeza de las especies implicadas.

**Tabla 7.** Número de acceso de Genbank de los aislamientos incluidos en este estudio.

| Isolate | Key GenBank | Access Number |
|---|---|---|
| ASP-01 | Seq1 | OQ560583 |
| ASP-02 | Seq2 | OQ560584 |
| ASP-03 | Seq3 | OQ560585 |
| ASP-04 | Seq4 | OQ560586 |
| ASP-05 | Seq5 | OQ560587 |
| ASP-06 | Seq6 | OQ560588 |
| ASP-07 | Seq7 | OQ560589 |
| ASP-08 | Seq8 | OQ560590 |
| ASP-09 | Seq9 | OQ560591 |
| ASP-10 | Seq10 | OQ560592 |
| ASP-11 | Seq11 | OQ560593 |
| ASP-12 | Seq12 | OQ560594 |
| ASP-13 | Seq13 | OQ560595 |
| ASP-15 | Seq14 | OQ560596 |
| ASP-16 | Seq15 | OQ560597 |
| ASP-17 | Seq16 | OQ560598 |
| ASP-18 | Seq17 | OQ560599 |
| ASP-19 | Seq18 | OQ560600 |
| ASP-20 | Seq19 | OQ560601 |
| ASP-21 | Seq20 | OQ560602 |
| ASP-22 | Seq21 | OQ560603 |
| ASP-23 | Seq22 | OQ560604 |
| ASP-24 | Seq23 | OQ560605 |
| ASP-26 | Seq24 | OQ560606 |
| ASP-28 | Seq25 | OQ560607 |
| ASP-29 | Seq26 | OQ560608 |
| ASP-30 | Seq27 | OQ560609 |
| ASP-31 | Seq28 | OQ560610 |
| ASP-32 | Seq29 | OQ560611 |
| ASP-33 | Seq30 | OQ560612 |
| ASP-34 | Seq31 | OQ560613 |
| ASP-35 | Seq32 | OQ560614 |
| ASP-36 | Seq33 | OQ560615 |
| ASP-37 | Seq34 | OQ560616 |

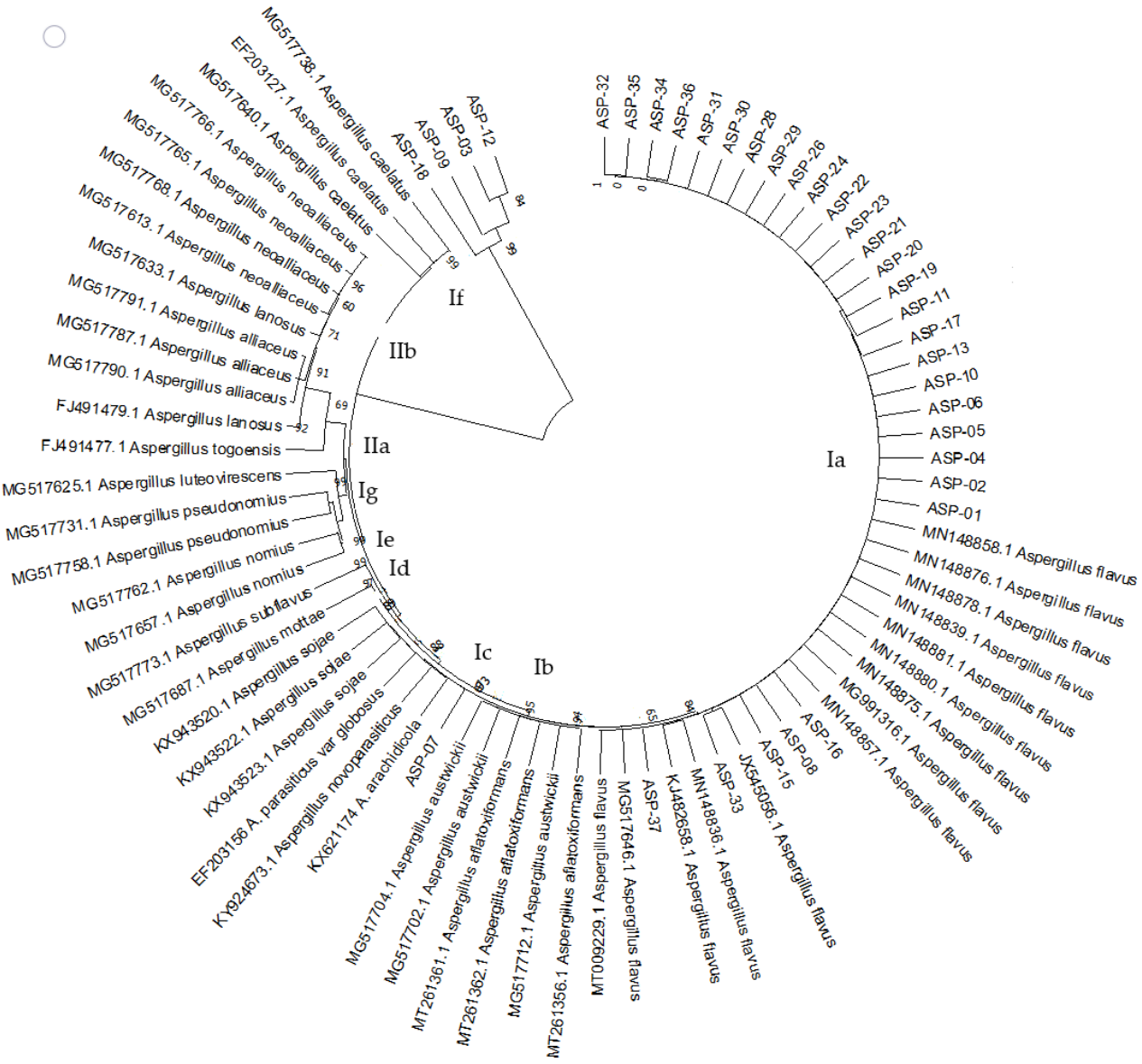



**Figura 27.** Análisis filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud de secuencias amplificadas con el gen benA. La significación de los nodos de los grupos formados se determinó con 1000 repeticiones (bootstrap).

El maíz y sus derivados son susceptibles a la contaminación por micotoxinas producidas por *Aspergillus* spp, lo que puede tener importantes repercusiones económicas; por la pérdida de

cultivos o daños a la salud humana por la ingestión de productos derivados del maíz contaminado. En México es común que los pequeños productores de maíz mantengan sus cultivos en condiciones no ideales para evitar la contaminación por hongos. Entre otras causas, como la precariedad económica, el riesgo de contaminación está latente. Asimismo, la identificación de los agentes causales representa un desafío. Ya que la aparición de especies crípticas hace necesario recurrir a métodos de identificación efectivos que permitan tener certeza de las especies involucradas. Este estudio evidenció la incidencia y toxigenicidad de aislados identificados como *A. flavus*, obtenidos de granos de maíz almacenados y muestras de suelo de comunidades agrícolas de Puebla y Tlaxcala, México.

Además, con este estudio se evidencia el riesgo latente de no garantizar alimentos seguros. Incluso, la precariedad en el almacenamiento del maíz puede conllevar a la contaminación de este grano y productos alimenticios derivados de este, debido a cepas de *Aspergillus flavus.* Es importante mencionar que, la presencia de estos hongos en un cereal de alto consumo en nuestro país y a nivel mundial, puede conllevar a la producción de aflatoxinas, lo que pone en riesgo latente tanto la salud de las personas como la de los animales.

Incluso, las características socioambientales de los sitios analizados (Tabla 5) muestran que los sitios muestreados en los estados de Tlaxcala y Puebla comparten el mismo clima. Asimismo, los rangos de temperatura y precipitación no son tan diferentes, además; están cerca de las zonas urbanas. Es fundamental señalar que la altitud juega un papel importante; porque puede favorecer la presencia y distribución de hongos aflatoxigénicos, ya que la altitud está íntimamente relacionada con la humedad. La atmósfera se vuelve más seca, la concentración de oxígeno en el aire es menor y la humedad se evapora rápidamente (Tejeda et al., 2018).

Este tipo de estudio también se ha informado en otras partes del mundo. Rashid et al. (2019) documentaron la incidencia y toxigenicidad de aislamientos de *Aspergillus* sección *Flavi* en granos de maíz en la provincia de Guangxi, China. Se encontraron cuatro especies de la sección *Flavi* incluyendo *A. flavus, A. arachidicola, A. pseudonomius* y *A. novoparasiticus* con diversos perfiles toxigénicos, siendo *A. flavus* la más aislada.

En otro estudio realizado por Barontini et al. (2022), reportaron la incidencia de *Aspergillus flavus* en el 35% de las muestras de maíz hibrido analizadas. En México los estudios realizados para la identificación de *Aspergillus flavus*, frecuentemente son estudios que no consideran un análisis polifásico para la identificación de *Aspergillus flavus*.

Además, Nargesi et al. (2022), realizaron la identificación molecular de 213 aislamientos clínicos de *Aspergillus* pertenecientes a las secciones *Flavi* y *Nigri*. En este estudio también usan el gen *BenA*, los aislamientos más comunes en las secciones *Flavi* y *Nigri* fueron *A. flavus* (110/113, 97,3 %) y *A. tubingensis* (49/100, 49,0 %), respectivamente.

### 9.4 Obtención del extracto *Rhododendron* spp. por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS)

Se realizó la cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC/MS) de los extractos obtenidos de la planta de azalea: flores, hojas y tallos. El extracto obtenido de flores con menos tiempo de secado (5 días) mostró un cromatograma que se observa en la figura 28, asimismo los compuestos encontrados se enlistan en la Tabla 8. En la figura 29 se muestra el cromatograma del extracto obtenido de la flor con mayor tiempo de secado (7 días), así también, en la Tabla 9 se muestran los compuestos identificados en este extracto.

Para el extracto obtenido del tallo, se obtuvo el cromatograma de la figura 30, y los compuestos identificados se enlistan en la Tabla 10. Finalmente, el extracto obtenido de hojas dio como resultado el cromatograma de la figura 331, y los compuestos encontrados se muestran en la Tabla 11.

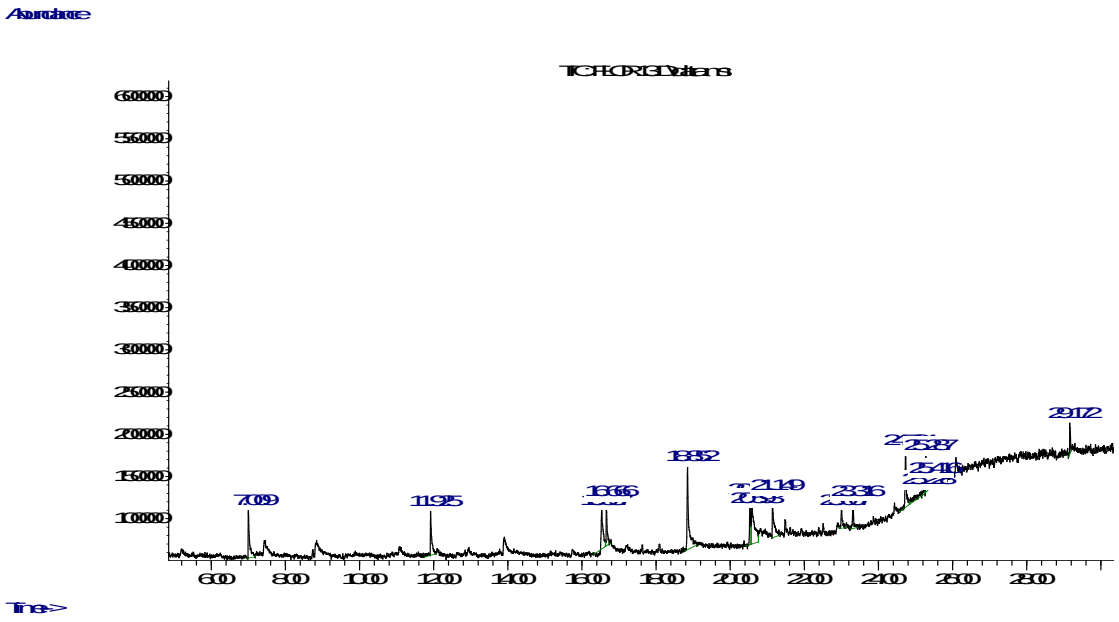



**Figura 28.** Cromatograma obtenido del extracto etanólico obtenido de las flores de *Rhododendron* spp. con 5 días de secado.

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 8**. Compuestos identificados en el extracto etanólico obtenido de las flores de *Rhododendron* spp

| Compuesto | Compuesto reportado | Efecto reportado | Fuente | Concentración % |
|---|---|---|---|---|
| Butanoic acid, 3-amino-2-methyl- | Butanoic acid, 3-amino-2-methyl- | Efecto hidrofóbico y de solvatación en los alcoholes acuosos | Smirnov & Badelin, 2009 | 7.78 |
| Phenethylamine, p | P-Methylamphetamine | Agonistas indirectos de la dopamina | Fan et al., 2021 | 7.34 |
| Benzyl alcohol, a-(1-aminoethyl)-m-hydroxy-, (-)- | Metaraminol | Vasopresor | Sardaneh et al., 2021 | 6.65 |
| dl-Phenylephrine | (±)-3-hydroxy-alpha-[(methylamino)methyl] benzyl alcohol | Tratamiento para la hipotensión | Day et al., 2014 | 5.13 |
| *Propanamide* | Propionamide | Antimicrobiano | Qiu et al., 2018 | 16.69 |
| Benzeneethanamine, N-methyl- | N-Methylphenethylamine | Precursor de alcaloides | Keller, 1980 | 5.02 |
| Phenylephrine | Phenylephrine | Vasoconstrictor periférico | Palanisamy et al., 2022 | 13.87 |
| Amphetamine | D/L-Amphetamine hydrochloride | Potente estimulante central | (Rao et al., 2018) | 7.79 |
| 2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 3.02 |
| Phenethylamine, p,.alpha.-dimethyl | 4-Methylamphetamine | Estimulante anfetamínico | (Power et al., 2013) | 3.91 |
| Benzyl alcohol, .alpha.-(1-aminoethyl)-m-hydroxy-, (-)- | ND | ND | ND | 8.79 |
| Cyclobutanol | Cyclobutanol | Termodinámicamente activos, contribuyen en la síntesis verde y sostenible | Yan et al., 2022 | 3.98 |
| Benzeneethanamine, 3-ethoxy-α-methyl- | β-benzeneethanamines | Antiinflamatorio | Wilkerson et al., 1993 | 6.72 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Acetamide, 2-cyano- | 2-Cyanoacetamide | Antioxidante | Krishnan et al., 2020 | 0.61 |
| Phenethylamine, p-methoxy-.alpha.-methyl-, (.+/-.)- | Methoxyamphetamine | Sustancia alucinógena | Martín-López et al., 2018 | 2.68 |

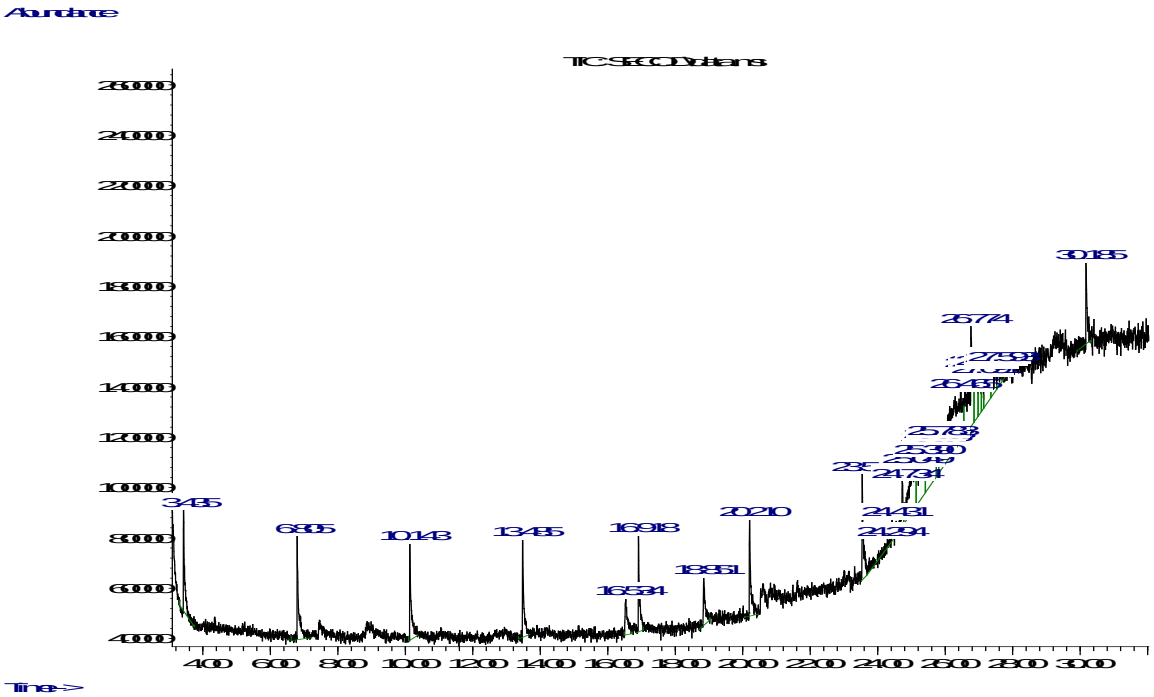



**Figura 29.** Cromatograma del extracto etanólico obtenido a partir de las de flores de *Rhododendron* spp con 7 días de secado.

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 9**. Compuestos identificados en el extracto etanólico obtenido a partir de la flor de *Rhododendron* spp con 7 días de secado

| Compuesto | Compuesto reportado | Efecto reportado | Fuente | Concentración % |
|---|---|---|---|---|
| Amphetamine | Amphetamine | Psicoestimulante | (Guillory et al., 2022) | 3.19 |
| Phenethylamine, p,.alpha.-dimethyl | P-Methylamphetamine | Agonistas indirectos de la dopamina | (Fan et al., 2021) | 4.37 |
| Butanoic acid, 3-amino-2-methyl- | Butanoic acid | Antimicrobiano | (Hanifa, Sirajuddin, Kubicki, & Tiekink, 2022) | 3.55 |
| n-Hexylmethylamine | N-Methylhexylamine | Síntesis de complejos | (David & Brodbelt, 2003) | 3.16 |
| dl-Phenylephrine | (±)-3-hydroxy-alpha-[(methylamino)methyl] benzyl alcohol | Tratamiento para la hipotensión | (Day et al., 2014) | 2.12 |
| 2-Heptanamine, 5-methyl- | 5-Methyl-2-heptanamine | ND | ND | 2.83 |
| 4-Fluorohistamine | 1H-Imidazole-4-ethanamine, 5-fluoro- | Sustancia tóxica | (Cao et al., 2022) | 2.26 |
| Phenethylamine, p,.alpha.-dimethyl | 4-Methylamphetamine | Estimulante anfetamínico | (Power et al., 2013) | 3.49 |
| Amphetamine-3-methyl | 1-(3-methylphenyl)propan-2-amine | Compuesto orgánico volátil | (Layek et al., 2020) | 3.41 |
| Ala-gly, trimethylsilyl ester | Alanylglycine | ND | (National Center for Biotechnology | 1.01 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Information, 2022c) | |
| Benzenemethanol, .alpha.-[(methylamino)methyl]- | DL-Alpha-(methylaminomethyl)benzyl alcohol | Catalíticamente muy activos en la adición de radicales libres | (National Center for Biotechnology Information, 2022c) | 0.76 |
| Benzeneethanamine, N-methyl- | N-Methylphenethylamine | Precursor de alcaloides | (Keller, 1980) | 2.04 |
| Phenethylamine, p-methoxy-.alpha.- | Methoxyamphetamine | Sustancia alucinógena | (Martín-López et al., 2018) | 7.20 |
| 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, tetraethyl ester | 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, 1,3,3,5-tetraethyl ester | ND | | 5.84 |
| Hydroxyurea | Hydroxyurea | Anticancerígeno, mutagénico de hongos | (Li & Zhao, 2021) | 5.45 |
| Nonadecylamine | 1-Aminononadecane | Inhibidor de la corrosión | (Kusch, Knupp, Hergarten, Kozupa, & Majchrzak, 2007) | 7.18 |
| 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, tetraethyl ester | 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, 1,3,3,5-tetraethyl ester | ND | | 1.44 |
| Ethanamine, 2-phenoxy- | 2-Phenoxyethylamine | Antimicrobiano | (Guluma, G, Teju, & | 19.50 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Dekebo, 2020) | |
| Acetamide, 2-fluoro- | Fluoroacetamide | Rodenticida e insecticida | (Chemical Book, 2017a) | 9.18 |
| Ethanone, 1-(4-pyridinyl)-, oxime | 1-(pyridin-4-yl)ethanone oxime | Escinden el DNA | (Andreou et al., 2016) | 2.08 |
| 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, tetraethyl ester | 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, tetraethyl ester | ND | | 1.32 |
| Cystine | L-Cystine | Antioxidante | (Chemical Book, 2017b) | 3.88 |
| Cyclotrisiloxane, 2,4,6-trimethyl-2,4,6-triphenyl- | 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triphenylcyclotrisiloxane | Ayuda en la isomerización catalítica | (Chang, Leung, & Yang, 2004) | 1.78 |
| 2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | (Rao et al., 2018) | 2.96 |

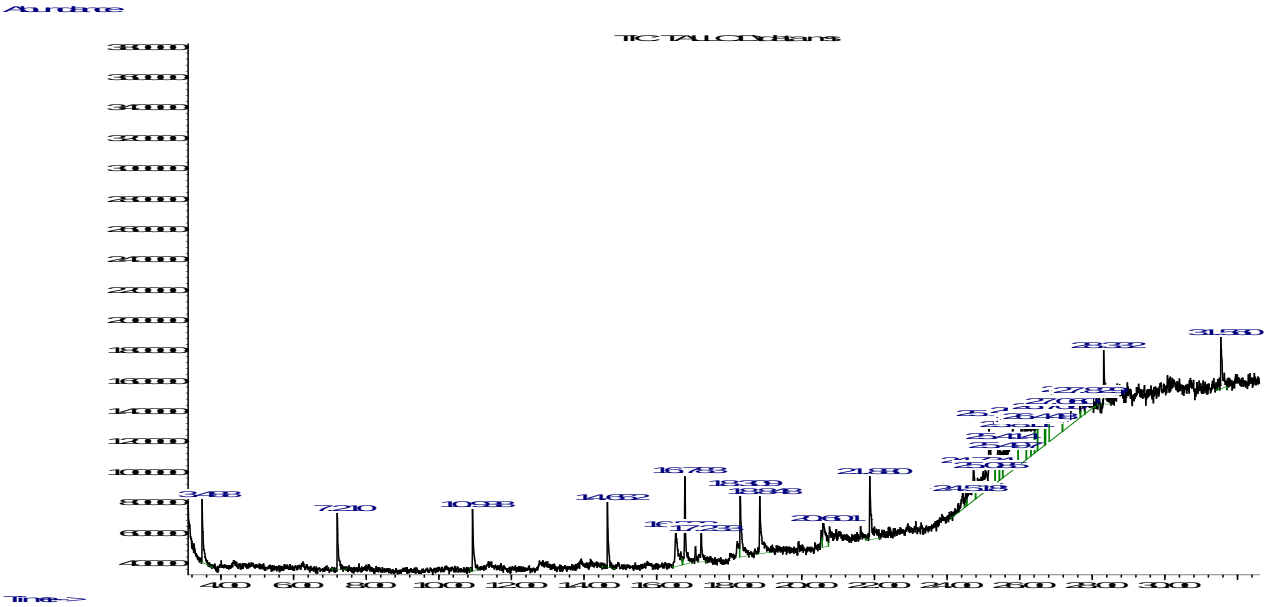



**Figura 30.** Cromatograma del extracto etanólico obtenido a partir de tallo de *Rhododendron* spp.

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 10**. Compuestos identificados en el extracto etanólico del tallo de *Rhododendron* spp

| Compuesto | Compuesto reportado | Efecto reportado | Fuente | Concentración % |
|---|---|---|---|---|
| Benzenemethanol, .alpha.-(1-aminoethyl)-, (R*,S*)-(.+/-.)- | Phenylpropanolamine | Descongestionante nasal, | Chemical Book, 2017 | 0.05 |
| Phenethylamine, p,.alpha.-dimethyl | P-Methylamphetamine | Agonistas indirectos de la dopamina | Fan et al., 2021 | 0.04 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Phenethylamine, p-methoxy-.alpha.-methyl-, (.+/-.)- | Methoxyamphetamine | Sustancia alucinógena | Martín-López et al., 2018 | 0.20 |
| Butanoic acid, 3-amino-2-methyl- | Butanoic acid, 3-amino-2-methyl- | Efecto hidrofóbico y de solvatación en los alcoholes acuosos | Smirnov & Badelin, 2009 | 0.04 |
| 2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 0.07 |
| 1-Methyl-2-phenoxyethylamine | 1-Methyl-2-phenoxyethylamine | Antibacteriana y antifúngica | Guluma et al., 2020 | 0.21 |
| Pregn-5-en-3-ol, 20-amino-, (3.beta.,20S)- | (20S)-20-Aminopregn-5-en-3β-ol | ND | | 0.07 |
| 2-Amino-1-(o-methoxyphenyl)propane | N-desmethylmethoxyphenamine | Actividad broncodilatadora | Thevis et al., 2010 | 0.05 |
| Benzeneethanamine, N-methyl- | N-Methylphenethylamine | Precursor de alcaloides | Keller, 1980 | 0.08 |
| Cyclobutanol | Cyclobutanol | Termodinámicamente activos, contribuyen en la síntesis verde y sostenible | Yan et al., 2022 | 0.04 |
| Phenethylamine, p-methoxy-.alpha.-methyl-, (.+/-.)- | Methoxyamphetamine | Sustancia alucinógena | Martín-López et al., 2018 | 0.01 |
| Acetamide, 2-cyano- | 2-Cyanoacetamide | Antioxidante | Krishnan et al., 2020 | 0.14 |
| Ethanone, 1-(4-pyridinyl)-, oxime | 1-(pyridin-4-yl)ethanone oxime | Escinden el DNA | Andreou et al., 2016 | 0.06 |
| 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, tetraethyl ester | 1,3,3,5-Pentanetetracarboxylic acid, 1,3,3,5-tetraethyl ester | ND | | 0.10 |
| Acetamide, 2-cyano- | 2-Cyanoacetamide | Antioxidante | Krishnan et al., 2020 | 0.23 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Nonadecylamine | 1-Aminononadecane | Inhibidor de la corrosión | Kusch et al., 2007 | 0.18 |
| Hydroxyurea | Hydroxyurea | Anticancerígeno, mutagénico de hongos | (Li & Zhao, 2021) | 0.13 |
| Cyclotrisiloxane, 2,4,6-trimethyl-2,4,6-triphenyl- | 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triphenylcyclotrisiloxane | Ayuda en la isomerización catalítica | National Center for Biotechnology Information, 2023b | 0.11 |
| Cyclotrisiloxane, 2,4,6-trimethyl-2,4,6-triphenyl- | 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triphenylcyclotrisiloxane | Ayuda en la isomerización catalítica | National Center for Biotechnology Information, 2023b | 0.41 |

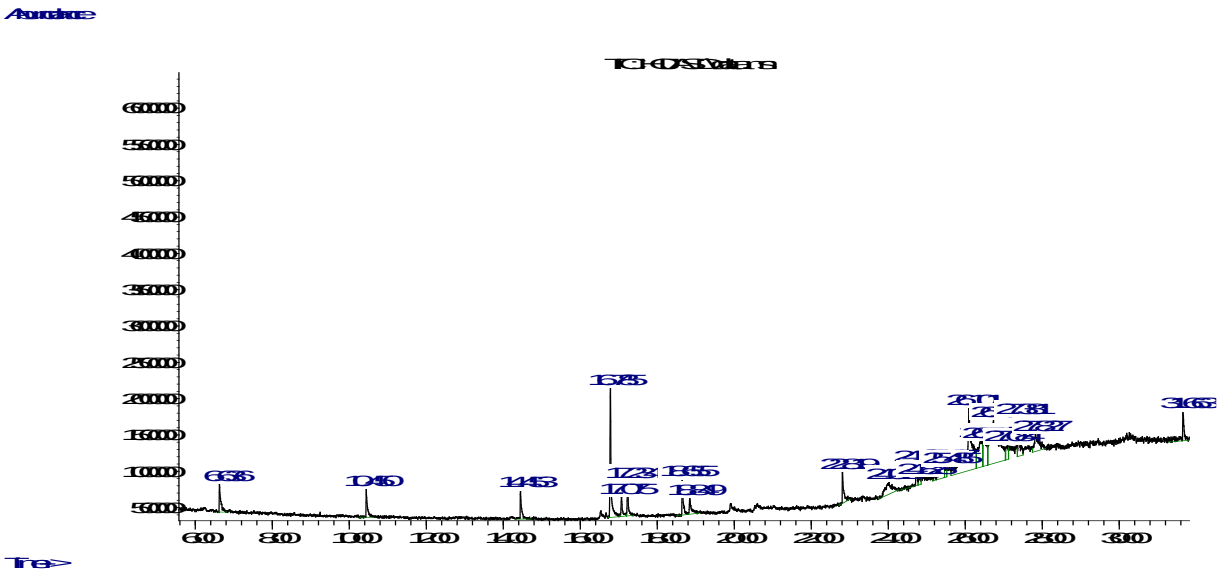


**Figura 31.** Cromatograma del extracto etanólico obtenido de hojas de *Rhododendron* spp.

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 11.** Compuestos identificados en el extracto etanólico de hojas de *Rhododendron* spp

| **Compuesto** | **Compuesto reportado** | **Efecto reportado** | **Fuente** | **Concentración %** |
|---|---|---|---|---|
| Hydrogen chloride | Hydrochloric acid | Desinfectante, sanitizante, virucida, fungicida y microbicida | (National Center for Biotechnology Information, 2022b) | 2.40 |
| 1,2-Benzenediol, 4-[2-(methylamino) ethyl]- | N-2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethylmethylamine | ND | | 2.16 |
| Phenethylamine, p,.alpha.-dimethyl | P-Methylamphetamine | Agonistas indirectos de la dopamina | Fan et al., 2021 | 2.40 |
| 1,4-Eicosadiene | 1,4-Eicosadiene | ND | | 8.30 |
| 2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 5.87 |
| Phenethylamine, p-methoxy-.alpha.-methyl-, (.+/-.)- | Methoxyamphetamine | Sustancia alucinógena | Martín-López et al., 2018 | 5.93 |
| Actinobolin | Actinobolin | Antibiótico | National Center for Biotechnology Information, 2022 | 2.29 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Benzeneethanamine, 2-fluoro-.beta.,5-dihydroxy-N-methyl- | Benzenemethanol, 2-fluoro-5-hydroxy-α-[(methylamino)methyl]- | ND | | 1.87 |
| Amphetamine-3-methyl | 1-(3-methylphenyl)propan-2-amine | Compuesto orgánico volátil | Layek et al., 2020 | 2.55 |
| Benzenemethanol, 3-hydroxy-.alpha-[(methylamino)methyl]-, (R)- | Phenylephrine | Vasoconstrictor periférico | Palanisamy et al., 2022 | 1.73 |
| 2-Amino-1-(o-methoxyphenyl)propane | N-desmethylmethoxyphenamine | Actividad broncodilatadora | Thevis et al., 2010 | 0.78 |
| Ethanone, 1-(4-pyridinyl)-, oxime | 1-(pyridin-4-yl)ethanone oxime | Escinden el DNA | Andreou et al., 2016 | 2.99 |
| Cefaclor | Cefaclor | Antibiótico | Chemical Book, 2022 | 1.00 |
| 14-Hydroxycodeine | Hydroxycodeine | Analgésico, antitusígeno y antagonista de estupefacientes. | National Center for Biotechnology Information, 2023c | 45.11 |
| Cyclotrisiloxane, 2,4,6-trimethyl-2,4,6-triphenyl- | 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triphenylcyclotrisiloxane | Ayuda en la isomerización catalítica | (National Center for Biotechnology Information, 2023b) | 11.17 |
| 7-Chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1,3- | 7-Chloro-5-(2-chlorophenyl)-3-hydroxy-1,3-dihydro- | ND | | 3.46 |

| | |
|---|---|
| dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one;acetate | 1,4-benzodiazepin-2-one;acetate |

A partir de los resultados obtenidos en los cromatogramas se realizó la siguiente Tabla (Tabla 12), la cual enlista los principales componentes antimicrobianos reportados en el extracto de *Rhododendron* spp, así como, las concentraciones encontradas en cada una de las muestras analizadas.

**Tabla 12.** Principales componentes antimicrobianos en el extracto etanólico de *Rhododendron* spp

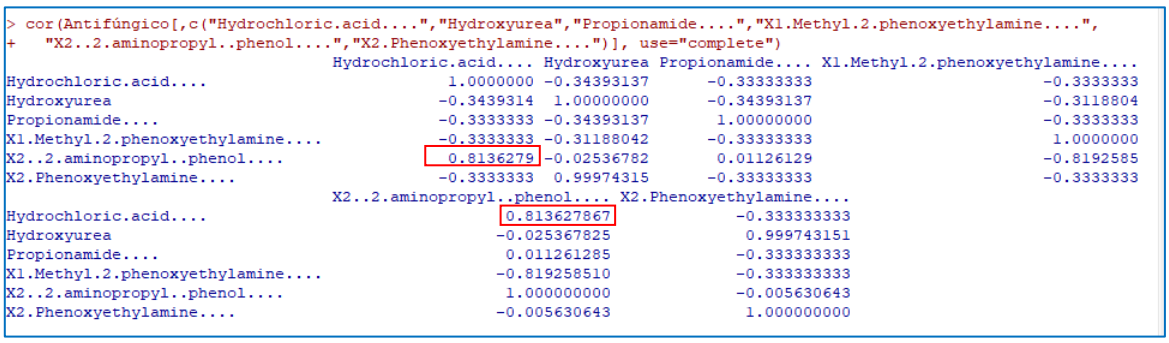
| **Compuesto** | **Compuesto reportado** | **Efecto reportado** | **Fuente** | **Concentración %** | **Extracto** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Propanamide** | Propionamide | Antimicrobiano | Qiu et al., 2018; Wu et al., 2018 | 16.69 | Flor I |
| **2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane** | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 3.02 | Flor I |
| **Ethanamine, 2-phenoxy-** | 2-Phenoxyethylamine | Antimicrobiano | Guluma et al., 2020 | 19.50 | Flor II |
| **2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane** | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 2.96 | Flor II |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Hydroxyurea** | Hydroxyurea | Cancerígeno, mutante de hongos | (Li & Zhao, 2021) | 5.45 | Flor II |
| **1-Methyl-2-phenoxyethylamine** | 1-Methyl-2-phenoxyethylamine | Antibacteriana y antifúngica | Guluma et al., 2020 | 0.21 | Tallo |
| **2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane** | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 0.07 | Tallo |
| **Hydroxyurea** | Hydroxyurea | Cancerígeno, mutante de hongos | (Li & Zhao, 2021) | 0.13 | Tallo |
| **Hydrogen chloride** | Hydrochloric acid | Desinfectante, sanitizante, virucida, fungicida y microbicida | National Center for Biotechnology Information, 2022b | 2.40 | Hoja |
| **2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane** | 2-(2-aminopropyl) phenol | Antioxidante, antimicrobiano | Rao et al., 2018 | 5.87 | Hoja |

Flor I: 5 días de secado; Flor II: 7 días de secado

A partir de los resultados anteriores se realizó una matriz de correlación (figura 32) usando el software R-comander (versión R-4.3.1), que mostró una correlación positiva entre el compuesto 2-(2-aminopropyl) phenol y el Hydrochloric acid, ambos compuestos presentes en las muestras de hojas.

El compuesto 2-(2-aminopropyl) phenol, se encontró en los cuatro tipos de muestra analizadas, sin embargo, el tallo es que presentó un menor porcentaje de concentración el cual solo fue del 0.07%. De acuerdo con Santra & Banerjee (2022), este al igual que otros compuestos obtenidos de agentes naturales cumplen funciones antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas. Por lo que, su uso es ampliamente utilizado en campos como la agricultura, la industria farmacéutica y en los principales sectores biotecnológicos.



```
> cor(Antifúngico[,c("Hydrochloric.acid....","Hydroxyurea","Propionamide....","X1.Methyl.2.phenoxyethylamine....",
+   "X2..2.aminopropyl..phenol....","X2.Phenoxyethylamine....")], use="complete")
                                Hydrochloric.acid.... Hydroxyurea Propionamide.... X1.Methyl.2.phenoxyethylamine....
Hydrochloric.acid....                       1.0000000 -0.34393137      -0.33333333                       -0.3333333
Hydroxyurea                                -0.3439314  1.00000000      -0.34393137                       -0.3118804
Propionamide....                           -0.3333333 -0.34393137       1.00000000                       -0.3333333
X1.Methyl.2.phenoxyethylamine....          -0.3333333 -0.31188042      -0.33333333                        1.0000000
X2..2.aminopropyl..phenol....               0.8136279 -0.02536782       0.01126129                       -0.8192585
X2.Phenoxyethylamine....                   -0.3333333  0.99974315      -0.33333333                       -0.3333333
                                X2..2.aminopropyl..phenol.... X2.Phenoxyethylamine....
Hydrochloric.acid....                        0.813627867             -0.333333333
Hydroxyurea                                 -0.025367825              0.999743151
Propionamide....                             0.011261285             -0.333333333
X1.Methyl.2.phenoxyethylamine....           -0.819258510             -0.333333333
X2..2.aminopropyl..phenol....                1.000000000             -0.005630643
X2.Phenoxyethylamine....                    -0.005630643              1.000000000
```

**Figura 32.** Matriz de correlación entre los compuestos analizados de los cromatogramas de las muestras usando del software R-4.3.1

### 9.5 Evaluación antifúngica del extracto *Rhododendron* spp

Ahora bien, en la siguiente Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos de las concentraciones bajo las cuales se evaluó el efecto antifúngico de los diferentes extractos a diferentes concentraciones 100, 500, 1000 y 1500 ppm.

**Tabla 13**. Efecto antifúngico de *Rhododendron* spp sobre *Aspergillus flavus*

| Concentraciones ppm | Extractos (halos de inhibición cm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Flor I | Flor II | Hoja | Tallo |
| 100 | NP | NP | NP | NP |
| 500 | NP | NP | NP | NP |
| 1000 | NP | NP | 1.5 | NP |
| 1500 | 2.0 | 1.4 | 2.3 | NP |

Flor I: 5 días de secado; Flor II: 7 días de secado; NP: No presento

A partir de los halos de inhibición reportados y los compuestos analizados en los cromatogramas de las diferentes muestras, se obtuvo la siguiente matriz de correlación (figura 33) usando el coeficiente de Pearson mediante el software R-4.3.1.

```
> cor(Antifúngico[,c("Halo.de.inhibición..cm..1500.ppm","Halo.de.inhibición..cm...1000.ppm","Hydrochloric.acid....",
+   "Hydroxyurea","Propionamide....","X1.Methyl.2.phenoxyethylamine....","X2..2.aminopropyl..phenol....",
+   "X2.Phenoxyethylamine....")], use="complete")
                              Halo.de.inhibición..cm..1500.ppm Halo.de.inhibición..cm...1000.ppm
Halo.de.inhibición..cm..1500.ppm                       1.00000000                        0.5713191
Halo.de.inhibición..cm...1000.ppm                      0.57131912                        1.0000000
Hydrochloric.acid....                                  0.57131912                        1.0000000
Hydroxyurea                                           -0.03881598                       -0.3439314
Propionamide....                                       0.37543828                       -0.3333333
X1.Methyl.2.phenoxyethylamine....                     -0.93043400                       -0.3333333
X2..2.aminopropyl..phenol....                          0.92357022                        0.8136279
X2.Phenoxyethylamine....                              -0.01632340                       -0.3333333
```

**Figura 33**. Matriz de correlación de los halos de inhibición bajo las concentraciones 1,000 y 1,500 ppm y los compuestos con mayores concentraciones obtenidos en los cromatogramas

Como se puede observar en la Tabla 13, el tiempo de secado, así como, el tipo de muestra y la concentración del extracto determinan el efecto antifúngico de una planta, en este caso particular de *Rhododendron* spp.. En la tabla anterior podemos ver que la flor con menos tiempo de secado (5 días) obtuvo un mayor efecto antifúngico, en comparación con el extracto de la flor con mayor tiempo de secado (7 días). El tiempo de secado juega un rol importante en la conservación o degradación de las propiedades antimicrobianas de una planta. Además, a 1,500 ppm hay una mayor actividad antifúngica del extracto obtenido de la hoja, en comparación con el mismo extracto a una concentración de 1,000 ppm. También, podemos observar en la Tabla 13, que a las concentraciones de 100 y 500 ppm ningún extracto presento alguna actividad antifúngica. Aunado a lo anterior, en la matriz de correlación se puede observar que existe una correlación positiva (0.9236) entre 2-(2-aminopropyl) phenol y los halos de inhibición formados a las concentraciones 1,500 ppm de los diferentes extractos.

La actividad antifúngica del extracto de la hoja a 1,500 ppm, podría estar relacionada a la cantidad de 2-(2-aminopropyl) phenol (5.87%), ya que, todas las muestras presentaron este compuesto, sin embargo, la concentración en las otras muestras fue menor. Pero, a pesar de que las muestras presentaron una menor concentración si hubo actividad antifúngica. Por esto se realizó el test de correlación entre el 2-(2-aminopropyl) phenol y el halo de inhibición del extracto de la hoja a 1,500 ppm, a través del software R-4.3.1, obteniendo los siguientes resultados (figura 34).

```
        Pearson's product-moment correlation

data:  Halo.de.inhibición..cm..1500.ppm and X2..2.aminopropyl..phenol....
t = 3.4064, df = 2, p-value = 0.07643
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.3338732  0.9984244
sample estimates:
      cor
0.9235702
```

**Imagen 34**. Resultados test de correlación entre el 2-(2-aminopropyl) phenol y el halo de inhibición del extracto de la hoja a 1,500 ppm

La importancia de los compuestos fenólicos en las hojas es de gran importancia, ya que, existen reportes de una buena actividad antimicrobiana sobre *A. flavus* (Borjan et al., 2020). En un estudio realizado por Lyu et al. (2020), se determinó que en el extracto de *Hibiscus acetosella* obtenido de hojas el compuesto fenólico más abundante fue el ácido cafeico con niveles de ácido cafeico entre 14.95 y 42.93 mg/100 g. Los extractos fenólicos de *H. acetosella* mostraron una actividad antibacteriana con halos de inhibición entre 12 y 13 mm sobre *Staphylococcus aureus*, y de 10.67 y 13.33 mm sobre *Pseudomona aeruginosa*.

Así también, en un estudio realizado por (Giordani et al., 2020), se evaluó la actividad antifúngica de extractos obtenidos de 14 plantas en Mongolia, obteniendo como resultado que, el extracto metanólico de *S. scordifolia* L., obtenido a temperatura ambiente, mostró la mejor actividad contra *Candida* spp., *Malassezia furfur* y dermatofitos con valores de 22 µg/mL, 64 µg/mL y 32 µg/mL, respectivamente.

Estos resultados coinciden con lo reportado en el presente trabajo de investigación, ya que la actividad antifúngica evaluada, se atribuye a los compuestos fenólicos encontrados en los diferentes extractos evaluados. Sin embargo, la concentración de estos compuestos es importante para inhibir el crecimiento de hongos y en el caso particular de este estudio sobre *A. flavus*. Ya que, este hongo es importante a nivel económico, agrícola, sanitario y de salud pública, es que existen estudios encaminados a inhibir el crecimiento de este hongo, e indirectamente disminuir o eliminar la producción de sus aflatoxinas. Esto a través de métodos amigables con el medio ambiente como lo es el uso de extractos de plantas.

Es por ello por lo que Di Ciaccio et al. (2020), utilizarón el extracto de *Peltophorum dubium* para medir su actividad antifúngica sobre *A.s flavus*. Ellos reportan que los extractos exhibieron una concentración inhibitoria mínima de 125 µg/mL, y las diferencias entre los tratamientos y el control de inóculo fueron de 11 mm de *P. dubium* A y 10 mm de *P. dubium* F en crecimiento de colonia. Así también Abdelghany et al. (2020), reportan la inhibición de *A. flavus* usando el extracto metanólico del tallo de *Juniperus procera*, en concentraciones de 30, 60 y 90 mg/mL donde la inhibición llegó a 50.86, 51.60 y 52.58 %, respectivamente. Boudjaber et al. (2023), también evaluaron la actividad antifúngica de extractos fenólicos obtenidos de *Chamaerops humilis.* Ellos reportan una concentración mínima inhibitoria de los extractos frente a la cepa toxigénica de *A. flavus* que osciló entre 3 mg/ml y 3.50 mg/ml.

Por lo tanto, los compuestos fenólicos son una alternativa eficaz que puede inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus* y de manera indirecta disminuir o eliminar la producción de aflatoxinas. Aunque, cabe mencionar que no todas las cepas de *A. flavus* producen aflatoxinas, y aunque se elimine el hongo las aflatoxinas pueden persistir.

# 10 CONCLUSIONES

Como se puede observar en el análisis de redes del presente trabajo de investigación, el tema de las micotoxinas es un tema multidisciplinario, el cual involucra diversas áreas. Dentro de las micotoxinas más estudiadas están las aflatoxinas, metabolitos secundarios tóxicos producidos principalmente por cepas de *Aspergillus flavus.* Además, estos metabolitos afectan áreas importantes a nivel mundial como la biotecnología de alimentos y agricultura, ya que, la contaminación por estos metabolitos en alimentos puede comprometer la salud humana y animal.

Este tema de investigación es de relevancia y prioridad a nivel mundial, ya que, cepas de *Aspergillus flavus* pueden llegar a producir Aflatoxina B1, la sustancia más toxica producida de manera natural. Además, este hongo y su metabolito contaminan una gran variedad de cultivos agrícolas y productos derivados de estos. En este trabajo de investigación se evidencio la contaminación por *Aspergillus flavus* en muestras de maíz, que es un cultivo de suma importancia a nivel mundial por su producción. Así también, se evidencio la presencia de este hongo en suelo agrícola siendo su principal reservorio, lo que influye en la contaminación de diversos cultivos agrícolas tal es el caso del cultivo de maíz.

Aunado a lo anterior, se concluye que es importante llevar a cabo la identificación de *Aspergillus flavus* a través de un enfoque polifásico, debido a la aparición de especies crípticas. Tal es el caso de *A. oryzae,* ambas especies están estrechamente relacionadas en la evolución filogenética, pero *Aspergillus flavus* es de mayor relevancia e importancia porque puede llegar a producir aflatoxinas. Mientras que, *A. oryzae* es considerado un hongo seguro por la Administración de Alimentos y Medicamentos y la Organización Mundial de la Salud.

Esta correcta identificación de *Aspergillus flavus* considero la identificación fenotípica, uso del medio diferencial AFPA y la amplificación del gen usando el gen beta-tubulina. Este gen demostró ser un gen confiable para la diferenciación de *Aspergillus flavus* con otras cepas de *Aspergillus,* confirmado los resultados obtenidos en las fases anterior a la caracterización de las cepas obtenidas.

También se reporta que el extracto de *Rhododendron* spp obtenido de las hojas presentó una mayor actividad antifúngica, esto es atribuible a la cantidad de compuestos fenólicos que presentó. Incluso el tiempo de secado juega un papel importante en la conservación de las propiedades de la planta las cuales le atribuyen su actividad antimicrobiana.

En conclusión, la multidisciplinariedad del presente trabajo de investigación permitió llevar a cabo la correcta identificación de *Aspergillus flavus* y contribuir con una propuesta para el control de este hongo aflatoxigénico. La cual, es una propuesta amigable con el medio ambiente y puede contribuir de manera sustentable al control de *Aspergillus flavus*, para disminuir la contaminación de este en diversos cultivos agrícolas, así como en cereales y productos derivados de estos.

# 11 PERSPECTIVAS

- Determinar si las cepas de *Aspergillus flavus* obtenidas en este trabajo de investigación producen aflatoxinas, in vitro.
- Evaluar a través de un análisis molecular si las cepas obtenidas de *Aspergillus flavus* cuentan con algún gen productor de aflatoxinas.
- Realizar un estudio con el cual se proponga un sistema de liberación controlado, in vivo, a partir del extracto de *Rhododendron* spp obtenido de hojas.
- Realizar un análisis del costo-beneficio de implementar ese método de control antifúngico.

## 12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Abarca, M. L. (2000). Taxonomia e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micologia*, *17*, 79–84.

Abastabar, M., Shabanzadeh, S., Valadan, R., Mayahi, S., Haghani, I., Khojasteh, S., Nargesi, S., Seyedmousavi, S., & Hedayati, M. T. (2022). Development of RFLP method for rapid differentiation of Aspergillus flavus and Aspergillus oryzae, two species with high importance in clinical and food microbiology. *Journal of Medical Mycology*, *32*(3), 101274. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2022.101274

Abdelghany, T. M., Hassan, M. M., El-Naggar, M. A., & El-Mongy, M. A. (2020). GC/MS analysis of Juniperus procera extract and its activity with silver nanoparticles against Aspergillus flavus growth and aflatoxins production. *Biotechnology Reports*, *27*, e00496. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00496

Andreou, N. P., Dafnopoulos, K., Tortopidis, C., Koumbis, A. E., Koffa, M., Psomas, G., & Fylaktakidou, K. C. (2016). Alkyl and aryl sulfonyl p-pyridine ethanone oximes are efficient DNA photo-cleavage agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *158*, 30–38. https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIOL.2016.02.017

Arrúa, A., Moreno, E., Quezada, M., Moreno, J., Vázquez, M., & Flores, A. (2012). Aspergillus aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual* Alfatoxigenic Aspergillus: current taxonomic focus. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *3*(5), 1047–1052. https://www.researchgate.net/publication/317476488_Alfatoxigenic_Aspergillus_current_taxonomic_focus

Atanda S. A. (2011). Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*, *5*(25), 4373–4382. https://doi.org/10.5897/ajmr11.487

Atongbiik Achaglinkame, M., Opoku, N., & Amagloh, F. K. (2017). Aflatoxin contamination in cereals and legumes to reconsider usage as complementary food ingredients for Ghanaian infants: A review. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, *10*, 1–7. https://doi.org/10.1016/J.JNIM.2017.09.001

Ayala-Zermeño, M. A., Montesinos-Matías, R., & Berlanga- Padilla, A. (2012). *Cultivos monospóricos de hongos entomopatógenos*.

Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S. B., Yaghuchi, T., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). Aspergillus species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology*, 39–46. https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.05

Balajee, S. A., Nickle, D., Varga, J., & Marr, K. A. (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of Aspergillus fumigatus by morphotyping. *Eukaryotic Cell*, 1705–1712. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/EC.00162-06

Barontini, J. M., Alaniz Zanon, M. S., Druetta, M. A., Ruiz Posse, A. M., Torrico, A. K., Monge, M. del P., Candela, R. E., Chulze, S. N., & Pecci, M. de la P. G. (2022). Differential response of maize hybrids to field infection with Aspergillus flavus and aflatoxin accumulation in the Chaco

Semi-arid region of Argentina. *Crop Protection*, *156*, 105960. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2022.105960

Battilani, P., Toscano, P., Van Der Fels-Klerx, H. J., Moretti, A., Camardo Leggieri, M., Brera, C., Rortais, A., Goumperis, T., & Robinson, & T. (2016). *Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change OPEN*. https://doi.org/10.1038/srep24328

Bbosa, G. S., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W. W., & Kyegombe, D. B. (2013). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. In *Aflatoxins-recent advances and future prospects.* https://doi.org/10.5772/51201

Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, *119*(1–2), 33–37. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.022

Bogantes-Ledezma, P., Bogantes-Ledezma, D., & Bogantes-Ledezma, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta Médica Costarricense*, 174–178. https://www.redalyc.org/pdf/434/43446404.pdf

Bonifaz, J. (2015). *Micología médica básica* (McGraw Hill., Ed.).

Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., & Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules*, *25*(24), 5946. https://doi.org/10.3390/molecules25245946

Boudjaber, K., Ben Miri, Y., Benabdallah, A., Bennia, N., Hamadi, C., Soumati, B., Djenane, D., & Simal-Gandara, J. (2023). Evaluation of Antifungal and anti-aflatoxin B1 efficacy of some crude extracts of Chamaerops humilis L. against Aspergillus flavus isolated from peanuts (Arachis hypogea L.). *Food Control*, *152*, 109858. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109858

Brown, J. K., Paredes-Montero, J. R., & Stocks, I. C. (2023). The Bemisia tabaci cryptic (sibling) species group — imperative for a taxonomic reassessment. *Current Opinion in Insect Science*, *57*, 101032. https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101032

Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, *173*(1–2), 134–158. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014

Cao, Y., Wang, X., Feng, T., Li, Z., Xue, C., & Xu, J. (2022). Ratiometric fluorescent nanosystem based on upconversion nanoparticles for histamine determination in seafood. *Food Chemistry*, *390*, 133194. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133194

Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortiz, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S., & Rojo-Callejas, F. (2019). Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 128–138. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.046

Castromonte, M., Wacyk, J., & Valenzuela, C. (2020). Encapsulación de extractos antioxidantes desde sub-productos agroindustriales: una revisión. *Revista Chilena de Nutrición*, *47*(5), 836–847. https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000500836

Cendrowski, A., Kraśniewska, K., Przybył, J. L., Zielińska, A., & Kalisz, S. (2020). Antibacterial and Antioxidant Activity of Extracts from Rose Fruits (Rosa rugosa). *Molecules*, *25*(6), 1365. https://doi.org/10.3390/molecules25061365

Centros para el Control y la Prevención de enfermedades, & Organización Mundial de la Salud. (2003). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. Https://Www.Medigraphic.Com/Pdfs/Medlab/Myl-2009/Myl093-4d.Pdf.

Cepero, M., Franco, A., & Restrepo, S. (2012). *Biología de hongos* (Universidad de los Andes, Ed.).

Chakraborty, A., Singh, J., & Upadhyay, H. (2021). Fungal Diversity and Ecology: Major Challenges for Crop Production in Present Climate Scenario. In A. N. Yadav (Ed.), *Recent Trends In Mycological Research* (pp. 89–107). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60659-6_4

Chang, C. L., Leung, M. K., & Yang, M. H. (2004). Alkyl and dialkylammonium tetrafluoroborate catalyzed cis–trans isomerization of 1,3,5-trimethyl-1,3,5-triphenylcyclotrisiloxane. *Tetrahedron*, *60*(41), 9205–9212. https://doi.org/10.1016/J.TET.2004.07.074

Chang, Y.-H., Yao, G., Neilsen, J., Liu, D.-T., Zhang, L., & Ma, Y.-P. (2021). Rhododendron kuomeianum (Ericaceae), a new species from northeastern Yunnan (China), based on morphological and genomic data. *Plant Diversity*, *43*(4), 292–298. https://doi.org/10.1016/j.pld.2021.04.003

Chemical Book. (2017a). *FLUOROACETAMIDE*. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB7122765_EN.htm

Chemical Book. (2017b). *L-Cystine*. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB6394079_EN.htm

Chemical Book. (2022). *Cefaclor*. https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB9390436_EN.htm

Chourasiya, D., Gupta, M. M., Sahni, S., Oehl, F., Agnihotri, R., Buade, R., Maheshwari, H. S., Prakash, A., & Sharma, M. P. (2021). Unraveling the AM fungal community for understanding its ecosystem resilience to changed climate in agroecosystems. *Symbiosis*. https://doi.org/10.1007/s13199-021-00761-9

Cleveland, T., Yu, J., Fedorova, N., Bhatnagar, D., Payne, G., Nierman, W., & Bennett, J. (2009). Potential of Aspergillus flavus genomics for applications in biotechnology. *Trends Biotechnol*, 151–157. https://doi.org/doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.008

Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., & Baird, R. M. (2003). Aspergillus flavus and parasiticus agar (AFPA). In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 37, pp. 397–399). https://doi.org/10.1016/S0079-6352(03)80029-2

da Rosa, P. D., Aquino, V., Fuentefria, A. M., & Goldani, L. Z. (2021). Diversity of Fusarium species causing invasive and disseminated infections. *Journal of Medical Mycology*, *31*(3), 101137. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101137

Davicino Roberto, Mattar María Aída, Casali Yolanda Angelina, Correa Silvia Graciela, Pettenati Elisa Margarita, & Micalizzi Blas. (2007). Actividad antifungica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Revista Peruana de Biología* , *14*(2).

David, W. M., & Brodbelt, J. S. (2003). Threshold dissociation energies of protonated amine/polyether complexes in a quadrupole ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *14*(4), 383–392. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00070-9

Day, K. M., Beckman, R. M., Machan, J. T., & Morrissey, P. E. (2014). Efficacy and Safety of Phenylephrine in the Management of Low Systolic Blood Pressure after Renal Transplantation. *Journal of the American College of Surgeons*, *218*(6), 1207–1213. https://doi.org/10.1016/J.JAMCOLLSURG.2014.01.058

de la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisinas –Síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-maíz. *Revista Española En Ciencias Químico-Biológicas*, *17*(1), 77–91. https://doi.org/10.1016/s1405-888x(14)70321-3

Di Ciaccio, L. S., Catalano, A. V., López, P. G., Rojas, D., Cristos, D., Fortunato, R. H., & Salvat, A. E. (2020). In Vitro Antifungal Activity of Peltophorum dubium (Spreng.) Taub. extracts against Aspergillus flavus. *Plants*, *9*(4), 438. https://doi.org/10.3390/plants9040438

Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G., & Cotty, P. J. (2007). Aflatoxin-producing Aspergillus species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, *114*(2), 153–159. https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.08.007

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2019). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(16), 2773–2789. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570

Fan, S. Y., Zang, C. Z., Shih, P. H., Ko, Y. C., Hsu, Y. H., Lin, M. C., Tseng, S. H., & Wang, D. Y. (2021). Simultaneous LC-MS/MS screening for multiple phenethylamine-type conventional drugs and new psychoactive substances in urine. *Forensic Science International*, *325*, 110884. https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2021.110884

FAO. (2022). *Micotoxinas*. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura. https://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/

FAO - ONU. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. *Estudio FAO. Alimentación y Nutrición*, 45.

Ferri, F., Brera, C., De Santis, B., Fedrizzi, G., Bacci, T., Bedogni, L., Capanni, S., Collini, G., Crespi, E., Debegnach, F., Ferdenzi, P., Gargano, A., Gattei, D., Luberto, F., Magnani, I., Magnani, M., Mancuso, P., Menotta, S., Mozzanica, S., … Giorgi Rossi, P. (2017). Survey on Urinary Levels of Aflatoxins in Professionally Exposed Workers. *Toxins*, *9*(4), 117. https://doi.org/10.3390/toxins9040117

García Giménez M.D., Sáenz Rodríguez, M. T., & Silvestre, S. (2005). Plantas tóxicas y medicinales de nuestros jardines: melia azedarach l. *Farmacia Hispalense: Revista Del Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla*, *18*, 40–45.

Giordani, C., Simonetti, G., Natsagdorj, D., Choijamts, G., Ghirga, F., Calcaterra, A., Quaglio, D., De Angelis, G., Toniolo, C., & Pasqua, G. (2020). Antifungal activity of Mongolian medicinal plant extracts. *Natural Product Research*, *34*(4), 449–455. https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1610960

Gitz, Vincent., Meybeck, Alexandre., Lipper, Leslie., Young, Cassandra., & Braatz, Susan. (2016). Climate change and food security: Risks and responses. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1347921

Gongora, I. G., Dunoyer, A. T., & Garcia-Zapateiro, L. A. (2018). Physical, chemical and biological properties of maize variety Fr -28. *Contemporary Engineering Sciences*, *11*(6), 257–268. https://doi.org/10.12988/ces.2018.8114

González Osnaya, L. R., Catalá Gregori, A. I., Soriano Del Castillo, J. M., Moltó Cortés, J. C., & Mañes Vinuesa, J. (2006). Nomenclatural amendments in the mycotoxicology field. *Revista Iberoamericana de Micologia*, *23*(2), 64–66. https://doi.org/10.1016/s1130-1406(06)70015-8

Guillory, A. M., Herrera, S. H., Baker, L. K., Bubula, N., Forneris, J., You, Z.-B., Vezina, P., & Singer, B. F. (2022). Conditioned inhibition of amphetamine sensitization. *Neurobiology of Learning and Memory*, *192*, 107636. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2022.107636

Guluma, T., G, N. B., Teju, E., & Dekebo, A. (2020a). Phytochemical investigation and evaluation of antimicrobial activities of Brucea antidysenterica leaves. *Chemical Data Collections*, *28*, 100433. https://doi.org/10.1016/J.CDC.2020.100433

Guluma, T., G, N. B., Teju, E., & Dekebo, A. (2020b). Phytochemical investigation and evaluation of antimicrobial activities of Brucea antidysenterica leaves. *Chemical Data Collections*, *28*, 100433. https://doi.org/10.1016/J.CDC.2020.100433

Gumus, T., Demirci, A. S., Sagdic, O., & Arici, M. (2010). Inhibition of heat resistant molds: Aspergillus fumigatus and Paecilomyces variotii by some plant essential oils. *Food Science and Biotechnology*, *19*(5), 1241–1244. https://doi.org/10.1007/s10068-010-0177-9

Hanifa, B., Sirajuddin, M., Kubicki, M., & Tiekink, E. R. T. (2022). Three isomeric 4-[(n-bromophenyl)carbamoyl]butanoic acids (n = 2, 3 and 4) as DNA intercalator: Synthesis, physicochemical characterization, antimicrobial activity, antioxidant potential and in silico study. *Journal of Molecular Structure*, *1262*, 133033. https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2022.133033

Hernández-Martínez, R., & Navarro-Blasco, I. (2015). Surveillance of aflatoxin content in dairy cow feedstuff from Navarra (Spain). *Animal Feed Science and Technology*, *200*(1), 35–46. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.002

Hocking, A. D. (2014). FUNGI | Foodborne Fungi. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 68–75). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00133-6

Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of Aspergillus fumigatus and related species. *Mycologia*, 1316-1329. https://doi.org/https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1316

Hua, H., Xing, F., Selvaraj, J. N., Wang, Y., Zhao, Y., Zhou, L., Liu, X., & Liu, Y. (2014). Inhibitory effect of essential oils on Aspergillus ochraceus growth and ochratoxin A production. *PloS One*, e108285. https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108285

Huerta, A., Dávila, J. E., Sánchez, E., Heredia, N., & García, S. (2016). Occurrence of mycotoxins in alfalfa (Medicago sativa L.), sorghum. *Agrociencia*, 826–836. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000700825

Iamanaka, B., de Menezes, H., Vicente, E., Leite, R., & Taniwaki, M. (2007). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*, *18*(5), 454–457.

IARC. (1995). Evaluation of carcinogenic risks to humans: Formaldehyde. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, *62*, 217–362.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2023, May 18). *Consulta de indicadores sociodemográficos y económicos por área geográfica*. Https://Www.Inegi.Org.Mx/.

International Agency for Research on Cancer. (2015). Control De Las Micotoxinas En Los Países De Ingresos Bajos Y Medios. In *IARC. Informes de Grupos de Trabajo N°9*.

International Grains Council. (2019). *Five-year baseline projections of supply and demand for wheat, maize (corn), rice and soyabeans to 2023/24*. *44*(March), 1–32. https://www.igc.int/en/markets/5yeardownload.aspx?mode=download

Kaisermann, A., Maron, P. A., Beaumelle, L., & Lata, J. C. (2015). Fungal communities are more sensitive indicators to non-extreme soil moisture variations than bacterial communities. *Applied Soil Ecology*, *86*, 158–164. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.009

Kalagatur, N. K., Gurunathan, S., Kamasani, J. R., Gunti, L., Kadirvelu, K., Mohan, C. D., Rangappa, S., Prasad, R., Almeida, F., Mudili, V., & Siddaiah, C. (2020). Inhibitory effect of C. zeylanicum, C. longa, O. basilicum, Z. officinale, and C. martini essential oils on growth and ochratoxin A content of A. ochraceous and P. verrucosum in maize grains. *Biotechnology Reports*, *27*, e00490. https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00490

Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., Islam, R., & Pauls, K. P. (2017). Disease Resistance. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 789–805). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09244-X

Keller, W. J. (1980). Biosynthesis of N-methylphenethylamine in Dolichothele sphaerica. *Phytochemistry*, *21*(12), 2851–2852. https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85054-0

Köpke, U., Thiel, B., & Elmholt, S. (2007). Strategies to reduce mycotoxin and fungal alkaloid contamination in organic and conventional cereal production systems. In *Handbook of Organic Food Safety and Quality* (pp. 353–391). Elsevier. https://doi.org/10.1533/9781845693411.3.353

Krishnan, K. G., Kumar, C. U., Lim, W. M., Mai, C. W., Thanikachalam, P. V., & Ramalingan, C. (2020). Novel cyanoacetamide integrated phenothiazines: Synthesis, characterization, computational studies and in vitro antioxidant and anticancer evaluations. *Journal of Molecular Structure*, *1199*, 127037. https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2019.127037

Krishnan, S., Manavathu, E. K., & Chandrasekar, P. H. (2009). Aspergillus flavus: an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance. *Mycoses*, 206–222. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01642.x

Kumar, P., Mahato, D. K., Sharma, B., Borah, R., Haque, S., Mahmud, M. M. C., Shah, A. K., Rawal, D., Bora, H., & Bui, S. (2020). Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon*, *187*(July), 151–162. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.031

Kusch, P., Knupp, G., Hergarten, M., Kozupa, M., & Majchrzak, M. (2007). Identification of corrosion inhibiting long-chain primary alkyl amines by gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, *263*(1), 45–53. https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2006.12.006

Layek, U., Bisui, S., Mondal, R., Das, N., De, S. K., & Karmakar, P. (2020). *Floral traits and chemical cues associated with rock bee (Apis dorsata Fabricius) for the host selection in West Bengal, India*. https://doi.org/10.1080/00173134.2020.1823466

Leite, M., Freitas, A., Silva, A. S., Barbosa, J., & Ramos, F. (2020). Maize (Zea mays L.) and mycotoxins: A review on optimization and validation of analytical methods by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Food Science and Technology*, *99*(March), 542–565. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.023

Li, W., & Zhao, T. (2021). Hydroxyurea anticancer drug adsorption on the pristine and doped C70 fullerene as potential carriers for drug delivery. *Journal of Molecular Liquids*, *340*, 117226. https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.117226

Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, *118*(6), 818–824. https://doi.org/10.1289/ehp.0901388

Lyu, J. Il, Ryu, J., Jin, C. H., Kim, D.-G., Kim, J. M., Seo, K.-S., Kim, J.-B., Kim, S. H., Ahn, J.-W., Kang, S.-Y., & Kwon, S.-J. (2020). Phenolic Compounds in Extracts of Hibiscus acetosella (Cranberry Hibiscus) and Their Antioxidant and Antibacterial Properties. *Molecules*, *25*(18), 4190. https://doi.org/10.3390/molecules25184190

Majeed, S., Iqbal, M., Asi, M. R., & Iqbal, S. Z. (2013). Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*, *58*(3), 446–450. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.09.007

Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Rio, M., Pinedo, M., & de la Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *140*, 30–35. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.012

Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C., & G., V. (2013). El género Aspergillus y sus micotoxinas en maíz en México problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatologa*, *31*(2), 126–146.

Martínez-Padrón, H. Y.; Hernández-Delgado, S.; Reyes-Méndez, C. A.; Vázquez-Carrillo, G. (2013). The Genus Aspergillus and their Mycotoxins in Maize in Mexico: Problems and Perspectives. *Rev. Mex. Fitopatol*, *31*(19), 126–146.

Martín-López, M., Muela, A. T., Cavas, M., & Navarro, J. F. (2018). Effects of para-methoxyamphetamine (PMA) on agonistic encounters between male mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *167*, 9–16. https://doi.org/10.1016/J.PBB.2018.02.002

Martins, H. M., Martins, M. L., & Bernardo, F. A. (2000). Interaction of strains of non-toxigenic Aspergillus flavus with Aspergillus parasiticus on aflatoxin production. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, *37*(6), 0–0. https://doi.org/10.1590/S1413-95962000000600003

Matthew O'Leary. (2016, May 20). *Maíz: De México para el mundo*. Https://Www.Cimmyt.Org/Es/Uncategorized/Maiz-de-Mexico-Para-El-Mundo/.

Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A., Rodriguez, A., & Magan, N. (2017). Climate change, food security and mycotoxins: do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, *31*(3), 143–154.

Mshelia, L., Selamat, J., Putra, N., Rafii, M., Abdul, N., Nordin, N., & Berthiller, F. (2020). Effect of temperature, water activity and carbon dioxide on fungal growth and mycotoxin production of acclimatised isolates of Fusarium verticillioides and F. graminearum. *Toxins*, *12*(478).

Murphy, P., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. (2006). Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, *71*(5), R51–R65.

Nargesi, S., Jafarzadeh, J., Najafzadeh, M. J., Nouripour-Sisakht, S., Haghani, I., Abastabar, M., Ilkit, M., & Hedayati, M. T. (2022). Molecular identification and antifungal susceptibility of clinically relevant and cryptic species of Aspergillus sections Flavi and Nigri. *Journal of Medical Microbiology*, *71*(4). https://doi.org/10.1099/jmm.0.001480

Nasri, T., Hedayati, M. T., Abastabar, M., Pasqualotto, A. C., Armaki, M. T., Hoseinnejad, A., & Nabili, M. (2015). PCR-RFLP on β-tubulin gene for rapid identification of the most clinically important species of Aspergillus. *Journal of Microbiological Methods*, *117*, 144–147. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.007

National Center for Biotechnology Information. (2022a). *PubChem Compound Summary for CID 54688606, Actinobolin*. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Actinobolin.

National Center for Biotechnology Information. (2022b). *PubChem Compound Summary for CID 313, Hydrochloric acid.* https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrochloric-acid.

National Center for Biotechnology Information. (2022c). *PubChem Compound Summary for CID 79094, Alanylglycine*. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alanylglycine.

National Center for Biotechnology Information. (2023a). *Explore Chemistry*. Https://Pubchem.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/.

National Center for Biotechnology Information. (2023b, May 19). *PubChem Compound Summary for CID 18901, Cyclotrisiloxane, 2,4,6-trimethyl-2,4,6-triphenyl-*. Https://Pubchem.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Compound/Cyclotrisiloxane_-2_4_6-Trimethyl-2_4_6-Triphenyl.

National Center for Biotechnology Information. (2023c, May 19). *PubChem Compound Summary for CID 14261327, 14-Hydroxycodeine.* Https://Pubchem.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Compound/14-Hydroxycodeine.

Nesic, K., Milicevic, D., Nesic, V., & Ivanovic, S. (2015). Mycotoxins as one of the foodborne risks most susceptible to climatic change. *Procedia Food Science*, *5*, 207–210.

Nierman, W. C., Yu, J., Fedorova-Abrams, N. D., Losada, L., Cleveland, T. E., Bhatnagar, D., Bennett, J. W., Dean, R., & Payne, G. A. (2015). Genome Sequence of Aspergillus flavus NRRL 3357, a Strain That Causes Aflatoxin Contamination of Food and Feed. *Genome Announcements*, *3*(2), e00168-15. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/genomeA.00168-15

Niu, C., Xing, X., Yang, X., Zheng, F., Liu, C., Wang, J., & Li, Q. (2023). Isolation, identification and application of Aspergillus oryzae BL18 with high protease activity as starter culture in doubanjiang (broad bean paste) fermentation. *Food Bioscience*, *51*, 102225. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102225

Okello, D. K., Kaaya, A. N., Bisikwa, J., Were, M., & Oloka, H. K. (2010). Management of Aflatoxins in Groundnuts: A manual for Farmers, Processors and Traders in Uganda. *National Agricultural Research Organisation*, 1–38. https://www.researchgate.net/publication/260247426_Management_of_Aflatoxins_in_Groundnuts_A_manual_for_Farmers_Processors_and_Traders_in_Uganda

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004). *Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003* . Https://Www.Fao.Org/3/Y5499s/Y5499s.Pdf.

Organización Mundial de la Salud. (2018, May 9). *Micotoxinas*. Https://Www.Who.Int/Es/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Mycotoxins.

Palanisamy, S., Rudingwa, P., Panneerselvam, S., Satyaprakash, M. V. S., Kuberan, A., & Amala, R. (2022). Effect of low dose phenylephrine infusion on shivering and hypothermia in patients undergoing cesarean section under spinal anesthesia: a randomized clinical trial. *International Journal of Obstetric Anesthesia*, *50*, 103542. https://doi.org/10.1016/J.IJOA.2022.103542

Park, J. W., Choi, S.-Y., Hwang, H.-J., & Kim, Y.-B. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, *103*(3), 305–314. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.001

Paterson R., & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, *43*(7), 1902–1914. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.010

Perrone, G., Ferrara, M., Medina, A., Pascale, M., & Magan, N. (2020). Toxigenic fungi and mycotoxins in a climate change scenario: Ecology, genomics, distribution, prediction and prevention of the risk. *Microorganisms*, *8*(10), 1–20. https://doi.org/10.3390/microorganisms8101496

Pimenta, R. S., Monteiro dos Santos Baliza, D. D., & Moreira da Silva, J. F. (2020). Chapter 30 - Aspergillus. In N. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, K. Kumar, & A. Sankaranarayanan (Eds.), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 611–624). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00030-7

Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V., & Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on Cereal Byproducts. *Toxins*, *8*(2). https://doi.org/10.3390/TOXINS8020045

Popescu, R., & Kopp, B. (2013). The genus Rhododendron: An ethnopharmacological and toxicological review. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 147, Issue 1, pp. 42–62). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.02.022

Power, J. D., Clarke, K., McDermott, S. D., McGlynn, P., Barry, M., White, C., O'Brien, J., & Kavanagh, P. (2013). The identification of 4-methylamphetamine and its synthesis by-products in forensic samples. *Forensic Science International*, *228*(1–3), 115–131. https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2013.02.039

Qiu, J., Gong, Q., Gao, J., Chen, W., Zhang, Y., Gu, X., & Tang, D. (2018). Design, synthesis and evaluation of novel phenyl propionamide derivatives as non-nucleoside hepatitis B virus inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *144*, 424–434. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.12.042

Quimica.es. (2023). *Rhododendron*. Https://Www.Quimica.Es/Enciclopedia/Rhododendron.Html.

Rangel-Muñoz, E. J., Valdivia-Flores, A. G., Moreno-Rico, O., Hernández-Delgado, S., Cruz-Vázquez, C., De-Luna-López, M. C., Quezada-Tristán, T., Ortiz-Martínez, R., & Máyek-Pérez, N. (2020). Caracterización de Aspergillus Flavus y cuantificación de aflatoxinas en pienso y leche cruda de vacas en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *11*(2), 435–454. https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.5686

Rao, Y., Zhao, X., Li, Z., & Huang, J. (2018). Phenolic acids induced growth of 3D ordered gold nanoshell composite array as sensitive SERS nanosensor for antioxidant capacity assay. *Talanta*, *190*, 174–181. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.07.069

Rippon, J., & Castañeda, L. (1992). *Micología médica* (Nueva Edit. Interamericana, Ed.).

R.L. Paliwal. (2001). *Introducción al maíz y su importancia*. Https://Www.Fao.Org/3/X7650s/X7650s02.Htm#:~:Text=El%20ma%C3%ADz%20es%20de%20gran,La%20de%20cualquier%20otro%20cultivo.

Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Ceceña-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O., & Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoidesde chiltepín (Capsicum annum var. glabriusculum) en Alternaria alternata and Fusarium oxysporum. *Revista Argentina de Microbiologia*, *47*(1), 72–77. https://doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005

Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, *124*(May 2018), 81–100. https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047

Saif, F. A., Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2021). Identification and characterization of Aspergillus species of fruit rot fungi using microscopy, FT-IR, Raman and UV–Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *246*, 119010. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. *Studies in Mycology*, 141–173. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004

Santra, H. K., & Banerjee, D. (2022). Bioactivity study and metabolic profiling of Colletotrichum alatae LCS1, an endophyte of club moss Lycopodium clavatum L. *PLOS ONE*, *17*(4), e0267302. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267302

Sardaneh, A. A., Penm, J., Oliver, M., Gattas, D., McLachlan, A. J., & Patanwala, A. E. (2021). Pharmacoepidemiology of metaraminol in critically ill patients with shock in a tertiary care hospital. *Australian Critical Care*, *34*(6), 573–579. https://doi.org/10.1016/J.AUCC.2021.01.002

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(4), 709–722. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003

Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H. J., Duveiller, E., Reynolds, M., & Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, *5*(3), 291–317. https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y

Sirma, A.J., Ouko, E.O., Murithi, G., Mburugu, C., Mapenay, I., Ombui, J.N., Kang'ethe, E.K., & Korhonen, H. (2015). Prevalence of aflatoxin contamination in cereals from Nandi County, Kenya. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, *3*(3), 55–63.

Sirot, V., Fremy, J.-M., & Leblanc, J.-C. (2013). Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, *52*, 1–11.

Smirnov, V. I., & Badelin, V. G. (2009). Enthalpies of solution of DL-α-Alanyl-DL-α-Valine in aqueous solution of amides at 298.15 K. *Thermochimica Acta*, *485*(1–2), 72–75. https://doi.org/10.1016/J.TCA.2008.12.016

Suleiman, W. B. (2023). A multi-aspect analysis of two analogous aspergillus spp. belonging to section Flavi: aspergillus flavus and aspergillus oryzae. *BMC Microbiology*, *23*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02813-0

Tejeda, A., Méndez, I., Rodríguez, N., & Tejeda, E. (2018). *La humedad en la atmósfera: bases físicas, instrumentos y aplicaciones*.

Thevis, M., Sigmund, G., Geyer, H., & Schänzer, W. (2010). Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *39*(1), 89–105. https://doi.org/10.1016/J.ECL.2009.10.011

Tilak, R., Singh, A., Prakash, O., Maurya, S., Chandra, A., Tilak, V., & Gulati, A. K. (2010). *Brief Original Article*. *4*(3), 171–174. https://doi.org/https://doi.org/10.3855/jidc.309

Tu, E. Y., McCartney, D. L., Beatty, R. F., Springer, K. L., Levy, J., & Edward, D. (2007). Successful Treatment of Resistant Ocular Fusariosis With Posaconazole (SCH-56592). *American Journal of Ophthalmology*, *143*(2), 222-227.e1. https://doi.org/10.1016/j.ajo.2006.10.048

Urrego, J., & Díaz, G. (2006). AFLATOXINAS: MECANISMOS DE TOXICIDAD. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, *54*(2), 108–116. https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/74802/43849-204683-1-PB.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Valencia-Quintana, R., Milić, M., Jakšić, D., Klarić, M. Š., Tenorio-Arvide, M. G., Pérez-Flores, G. A., Bonassi, S., & Sánchez-Alarcón, J. (2020). Environment changes, aflatoxins, and health issues, a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(21), 1–10. https://doi.org/10.3390/ijerph17217850

Wajih ul Hassan, S., Sadef, Y., Hussain, S., Rafique Asi, M., Ashraf, M. Y., Anwar, S., & Malik, A. (2020). Unusual pattern of aflatoxins and ochratoxin in commercially grown maize varieties of Pakistan. *Toxicon*, *182*(March), 66–71. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.008

Wilkerson, W. W., DeLucca, I., Galbraith, W., Harris, R., & Kerr, J. (1993). Antiinflammatory β-benzeneethanamines. III. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *3*(4), 711–716. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)81260-9

World Meteorological Organization. (2021, May 27). *New climate predictions increase likelihood of temporarily reaching 1.5 °C in next 5 years*. Https://Public.Wmo.Int/En/Media/Press-Release/New-Climate-Predictions-Increase-Likelihood-of-Temporarily-Reaching-15-%C2%B0c-next-5/.

Wu, X., Wu, H., Wang, S., Wang, Y., Zhang, R., Hu, X., & Ye, J. (2018). Effect of propionamide on the growth of Microcystis flos-aquae colonies and the underlying physiological mechanisms. *Science of The Total Environment*, *630*, 526–535. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.02.217

Xu, Y., Zhang, Z., Lu, P., Li, R., Ma, P., Wu, J., Li, T., & Zhang, H. (2023). Increasing Fusarium verticillioides resistance in maize by genomics-assisted breeding: Methods, progress, and prospects. *The Crop Journal*. https://doi.org/10.1016/j.cj.2023.07.004

Yan, H., Smith, G. S., & Chen, F.-E. (2022). Recent advances using cyclopropanols and cyclobutanols in ring-opening asymmetric synthesis. *Green Synthesis and Catalysis*. https://doi.org/10.1016/J.GRESC.2022.05.007

Zeng, K., Ban, S., Cao, Z., Cao, P., Luo, X., Wang, R., Zhao, Z., & Xu, J. (2021). Phytochemical and chemotaxonomic study on the leaves of Rhododendron amesiae. *Biochemical Systematics and Ecology*, *95*(January), 2019–2022. https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104232

Zhang, C., Wang, C., Cao, G., Wang, D., & Ho, S. H. (2020). A sustainable solution to plastics pollution: An eco-friendly bioplastic film production from high-salt contained Spirulina sp. residues. *Journal of Hazardous Materials*, *388*. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121773