



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



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

**PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y HONGOS
AFLATOXIGÉNICOS CONTAMINANTES EN PRODUCTOS
AGRÍCOLAS EN LOCALIDADES DE PUEBLA Y TLAXCALA**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

KAREN CRISTINA SAEZ GOMEZ

Director de tesis:
Dr. Ricardo Munguía Pérez

Diciembre 2018



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



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

**PRESENCIA DE AFLATOXINAS Y HONGOS
AFLATOXIGÉNICOS CONTAMINANTES EN PRODUCTOS
AGRÍCOLAS EN LOCALIDADES DE PUEBLA Y TLAXCALA**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

KAREN CRISTINA SAEZ GOMEZ

Comité tutorial:

Director	Dr. Ricardo Munguía Pérez
Co-director	Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide
Integrante Comité Tutorial	Dr. Eduardo Torres Ramírez

Diciembre 2018



BUAP

C. KAREN CRISTINA SAEZ GOMEZ

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dra. María Lilia Cedillo Ramírez</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dr. Eduardo Torres Ramírez</i>	<i>Secretario</i>
<i>M.C. María de la Cruz Meneses Sánchez</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dr. José Víctor Rosendo Tamariz Flores</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dra. Sonia Emilia Silva Gómez</i>	<i>Suplente</i>

Designado para la defensa de su tesis “Presencia de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos contaminantes en productos agrícolas en Localidades de Puebla y Tlaxcala” han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE

“PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR”

H. PUEBLA DE Z., OCTUBRE 29 DE 2018


DRA. EDITH CHAVEZ BRAVO
SECRETARIA ACADEMICA



ECB/app
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT)

Por concederme la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Dr. Ricardo Munguía Pérez por su apoyo durante la realización de este trabajo de investigación y por contribuir a mi crecimiento profesional.

Al Co-director e integrantes del Comité Tutorial, por sus valiosas aportaciones en la realización del presente trabajo de tesis.

Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Dra. María Guadalupe Tenorio Arvide

Dr. Eduardo Torres Ramírez

Al laboratorio de Micología II perteneciente al Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme realizar el trabajo de tesis en sus instalaciones.

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

A los profesores del posgrado por compartir sus conocimientos y contribuir en mi formación académica.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:
Norberto Santiago Saez Amaro
Celia Gomez Palestina

Por apoyarme en cada etapa de mi vida, por su amor y comprensión.

A mis hermanos: Norberto, Ángel y Víctor, por las vivencias compartidas y su apoyo.

A mis amigos, a las personas que he conocido a lo largo de la vida y las cuales han representado una parte importante para mí.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
I.	JUSTIFICACIÓN.....	3
II.	MARCO DE REFERENCIA	5
3.1	Antecedentes	5
3.2	Salud ambiental.....	6
3.3	Seguridad alimentaria	7
3.4	Inocuidad de los alimentos	8
3.5	Cultivo de maíz en México	8
3.6	Hongos filamentosos	9
3.6.1	Generalidades de <i>Aspergillus</i> spp.	10
3.6.2	Generalidades, características macro y micromorfológicas de <i>Aspergillus flavus</i>	18
3.6.3	Generalidades, características macro y micromorfológicas de <i>Aspergillus parasiticus</i>	20
3.6.4	Otros hongos filamentosos de importancia médica y económica	20
3.7	Micotoxinas.....	24
3.7.1	Micotoxinas y cambio climático	25
3.7.2	Micotoxinas importancia en el sector agrícola y de salud	26
3.7.3	Micotoxinas y su actividad tóxica en humanos y animales.....	27
3.7.4	Aflatoxinas, importancia y generalidades	27
3.8	Hongos aflatoxigénicos-Aflatoxinas-Ambiente.....	38
III.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	39
IV.	HIPÓTESIS	39
V.	OBJETIVOS.....	40
5.1	Objetivo general	40
5.2	Objetivos específicos	40
VI.	DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN	41
7.1	Aislamiento e identificación fenotípica de cepas aflatoxigénicas	42
7.2	Caracterización molecular de cepas de potencialmente aflatoxigénicas	42
7.3	Evaluación de la presencia de aflatoxinas totales en muestras de maíz almacenado.	43
7.4	Identificación de otros hongos filamentosos	44
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45

8.1 Identificación fenotípica de especies aflatoxigénicas.....	48
8.2 Identificación molecular de <i>Aspergillus flavus</i>	52
8.3 Determinación de aflatoxinas totales en maíz	56
8.4 Identificación de otras especies de <i>Aspergillus</i> y otros hongos filamentosos.....	59
VIII. CONCLUSIONES.....	64
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	66

Índice de Tablas

Tabla 1: Resumen de las principales aflatoxinas producidas por especies de <i>Aspergillus</i>	30
Tabla 2: Características socioambientales de los sitios muestreados.....	47
Tabla 3: Secuencias de cepas de <i>Aspergillus flavus</i> editadas en BioEdit versión 7.0.5.3... ..	55
Tabla 4: Valores E-value y de Identidad, obtenidos en BLASTN 2.8.0... ..	56
Tabla 5: Concentración de aflatoxinas totales en maíz	58

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Muestras recolectadas en cada sitio de muestreo en enero y agosto	46
Gráfico 2: Total de muestras recolectadas de suelo agrícola y maíz almacenado, en cada sitio de muestreo.....	48
Gráfico 3: Número de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> en suelo y maíz.....	51
Gráfico 4: Porcentaje de aislamientos de <i>Aspergillus flavus</i> en suelo agrícola y maíz almacenado... ..	52
Gráfico 5: Curva de calibración, concentraciones de aflatoxinas totales 1, 2.5 , 5 y 10 µg/kg de maíz	57
Gráfico 6: Número de aislamientos de otras especies de <i>Aspergillus</i>	60
Gráfico 7: Número de aislamientos de otros hongos filamentosos... ..	61
Gráfico 8: Géneros identificados en maíz almacenado... ..	62
Gráfico 9: Géneros identificados en suelo agrícola.....	63

Índice de Imágenes

Imagen 1: Estructura química de las principales aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ , B _{2A} y G _{2A}	31
Imagen 2: Rangos y medias por regiones de los límites para las aflatoxinas totales en los alimentos.....	37
Imagen 3: Interacción hongos aflatoxigénicos/aflatoxinas-ambiente hombre/animal.....	38
<i>Imagen 4: Muestreo de suelo agrícola tipo Z.....</i>	41
Imagen 5: Características macromorfológica (derecha) y micromorfológica (izquierda) de <i>Aspergillus flavus</i>	49
Imagen 6: Anverso y reverso de la colonia de <i>Aspergillus flavus</i> en medio diferencial AFPA.....	49
Imagen 7: Corrimiento electroforético de las regiones amplificadas de cepas de <i>A. flavus</i>	53

I. INTRODUCCIÓN

En 1996 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) presentó la definición de seguridad alimentaria, la cual dice: “existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso material y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades y preferencias alimenticias, a fin de llevar una vida activa y sana” (IICA, 2012). Todas las personas tienen derecho a que los alimentos que consumen sean inocuos. En los pasados decenios se han documentado en todos los continentes graves brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, lo que demuestra su importancia desde el punto de vista social y de la salud pública. (FAO y OMS, 2003).

La inseguridad alimentaria está presente en algunos estados del país, tal es el caso de Tlaxcala y Puebla que presentan inseguridad alimentaria extrema y marcada respectivamente (Torres, 2014). Por este motivo existe una sensibilización creciente acerca de la importancia de un enfoque multidisciplinario que abarque el monitoreo de toda la cadena agroalimentaria, puesto que, muchos de los problemas de inocuidad de los alimentos tienen su origen en la producción primaria. (MinSalud, 2013).

La mayoría de los productos agrícolas pueden ser susceptibles de contaminación por hongos micotoxigénicos y sus metabolitos casi en cualquier momento, desde su producción en el campo, durante la cosecha, en el transporte y en el almacenamiento. (Martínez *et al.*, 2013). De acuerdo con la FAO (2003), las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas que acarrearán sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional.

Las primeras micotoxinas que fueron objeto de regulación a nivel europeo fueron las Aflatoxinas, en México la norma que regula la presencia de estos metabolitos en cereales es la NOM-188-SSA1-2002 la cual dice que el límite máximo permisible es de 20 µg/kg de producto. Existen aproximadamente 20 tipos aflatoxinas, normalmente sólo las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se encuentran en los alimentos y en conjunto son denominadas

aflatoxinas totales; la notación de las aflatoxinas B₁ y B₂ hace referencia a la fluorescencia azul que producen cuando se hacen pasar bajo la luz ultravioleta, mientras que, las G₁ y G₂ a la fluorescencia verde que emiten. (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015). Urrego y Díaz (2006) mencionan que, las aflatoxinas son contaminantes comunes de ciertos alimentos particularmente de cereales usados en la dieta en muchos países en desarrollo. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, los hongos productores de aflatoxinas están muy extendidos por todo el mundo y pueden producir aflatoxinas tanto antes como después de la cosecha en numerosos alimentos y piensos. Alrededor del 25% de los cultivos agrícolas se encuentra contaminado con algún tipo de micotoxina (FAO, 2003).

La presencia de hongos aflatoxigénicos en suelo agrícola, así como la presencia de estos y su metabolito en maíz, uno de los cereales de mayor importancia a nivel mundial y el de mayor consumo en México destinado para la alimentación humana y del ganado, puede poner en riesgo la salud humana y de animales, por ello es necesario llevar a cabo el monitoreo de la presencia y distribución de hongos aflatoxigénicos y aflatoxinas para contribuir a hacer una agricultura sustentable en regiones de Puebla y Tlaxcala.

I. JUSTIFICACIÓN

Se estima que cada año enferman en el mundo alrededor de 600 millones de personas (casi 1 de cada 10 habitantes) por ingerir alimentos contaminados con algún agente físico, químico o biológico, esto representan un problema de salud pública debido a que del 20 al 50% de todos los cánceres están relacionados con factores de la dieta. La crisis económica mundial provocó mayores efectos adversos sobre la seguridad alimentaria interna, actualmente 524 municipios del país se encuentran en situación de inseguridad alimentaria extrema, y 773 municipios equivalentes a 31.4% se ubican en una situación de inseguridad marcada. La incidencia de la inseguridad alimentaria extrema ha prevalecido principalmente en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Tlaxcala y Yucatán, por otro lado, Durango, Guanajuato, Estado de México y Puebla presentan inseguridad marcada. (Torres, 2014; OMS, 2018).

De acuerdo con la FAO (2018), se estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales se ven afectados por hongos productores de micotoxinas, y según las estimaciones de la FAO, las pérdidas mundiales de productos alimenticios debidas a las micotoxinas son del orden de 1000 millones de toneladas al año. Las aflatoxinas, sustancias generadas principalmente por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, son micotoxinas que repercuten sobre los humanos tanto por sus efectos toxicológicos como económicos. Los efectos a la salud generados por las aflatoxinas son carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos hasta la producción de desórdenes hormonales o inmunosupresores (Carvajal, 2013). El problema principal reside en que las aflatoxinas son acumulativas de modo que una vez que contaminan el grano o el producto agrícola en campo o almacén persisten a la digestión, al calor de la cocción o al congelamiento (Requena *et al.*, 2005). Estas especies productoras de aflatoxinas invaden los granos de maíz tanto durante la cosecha como en la postcosecha pudiéndose encontrar en zonas tropicales, subtropicales e incluso en zonas templadas (Bogantes *et al.*, 2004), teniendo como principal reservorio al suelo (Klich, 2007). El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente, esta interacción determina la

infección y colonización del sustrato, así como, el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas (Martínez *et al.*, 2013).

Debido a lo mencionado, es importante realizar un estudio enfocado en determinar la presencia y distribución de hongos aflatoxigénicos en suelo agrícola, debido a que, al ser el principal reservorio pone en riesgo al cultivo de maíz y lo hace susceptible a contaminación por estos hongos micotoxigénicos, así como, la presencia de estos hongos en maíz por ser un cereal importante en cuanto a su alto consumo, ya que, las pérdidas en la producción del grano se asocian con su manipulación durante la cosecha en el campo y en el almacenaje (Padrón *et al.*, 2013). La importancia de este trabajo no solo se centra en determinar la presencia de cepas aflatoxigénicas, sino también, en determinar la cantidad de aflatoxinas totales presentes en muestras de maíz almacenado.

El tema es relevante en el área de las ciencias ambientales debido a que dentro de los factores involucrados en la producción de micotoxinas se encuentra el clima, la fuerza impulsora del agroecosistema clave en la colonización por hongos y producción de micotoxinas, además de las prácticas agrícolas las cuales pueden contribuir hacia una agricultura sustentable, involucrándose de esta manera la sociedad con la naturaleza.

Por último, la realización de este tema contribuye aportando conocimiento en cuanto a la presencia de estos hongos potencialmente aflatoxigénicos, tanto en suelo agrícola como en maíz, debido a que no existe investigación acerca del monitoreo de hongos aflatoxigénicos y aflatoxinas en Puebla y Tlaxcala.

II. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Antecedentes

Las principales especies productoras de aflatoxinas son *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, aunque *A. flavus* es de las especies más frecuentemente aisladas en la agricultura, la contaminación por aflatoxinas provoca importantes pérdidas anuales de cultivos a nivel internacional (Cleveland *et al.*, 2009; Sardiñas *et al.*, 2011; Nierman *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Rojas y Wilches (2009), se determinó que, en alimentos de consumo infantil en Pamplona de las cuatro aflatoxinas principales (B1, B2, G1 y G2) la que se observa habitualmente en mayores concentraciones es la B1, considerada el compuesto biológicamente más activo de la familia de las aflatoxinas siendo ésta la aflatoxina más tóxica. Las cuatro toxinas pueden estar presentes simultáneamente, aunque no necesariamente y sus concentraciones relativas y su presencia pueden variar según la cepa fúngica y el sustrato.

Por su parte Morris (2011), en estudio realizado en la Costa Caribe Colombiana reporta que de las 24 muestras de maíz analizadas la aflatoxina B1 se encuentra contaminando el 12.5% del total de las muestras y la aflatoxina B2 el 8.3%, siendo el valor medio de aflatoxinas totales de 9.2 ppb.

En México quizá el caso más alarmante debido a una alta contaminación por aflatoxinas en maíz, fue el suscitado en el estado de Tamaulipas a partir de las fuertes contaminaciones en el grano (alrededor del 90 %) y los altos niveles de aflatoxinas (concentraciones entre 63 y 167 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Moreno y Gil, 1991; Carvajal y Arroyo, 1997) ocurridas en el maíz cultivado en la región durante 1989 y 1990; lo que se asoció con la presencia de temperaturas altas y el ataque severo de plagas en la etapa reproductiva del cultivo, así como factores favorecedores del drástico incremento de la contaminación del grano en los almacenes regionales (alta humedad y temperatura).

En otro estudio realizado por García *et al.* (2012), en maíz blanco cultivado en Sinaloa, México reporta la incidencia de aflatoxinas B1 y G1 en 90 muestras de las 150 analizadas. Meareg y Nancy (2014) mencionan que *Aspergillus flavus* es un hongo saprófito ubicuo que se encuentra en los suelos de todo el mundo. Esto coincide con lo reportado por Arias y Piñeros (2008), quienes, en un estudio realizado en los páramos de Guasca, Bogotá reportan la presencia de *Aspergillus flavus* en muestras de suelo.

3.2 Salud ambiental

La salud y el ambiente son temas que se han manejado aisladamente, la salud con un enfoque primordialmente en la prevención y tratamiento de enfermedades, mientras que, el ambiente enfocado en el desarrollo económico sostenible. Pero las afectaciones en la salud debido a factores ambientales, reconoce que estos dos temas no se deben concebir por separado, sino dentro de un contexto amplio de salud pública y desarrollo. Existen dos maneras complementarias para abordar la salud ambiental: una, eminentemente preventiva, es decir, centrada en el enfoque de riesgo y, por ende, en las acciones de seguridad e higiene en sus diferentes componentes, y otra promocional, es decir, centrada en los conceptos de desarrollo de potencialidades y calidad de vida (García *et al.*, 2013).

La palabra salud en la mayoría de los casos es asociada a una ausencia de enfermedades, sin embargo, de acuerdo con la OMS (2018) «La salud es un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades», esta definición no ha sido modificada desde 1948 después de que fuera adoptada por la Conferencia Sanitaria Internacional en julio de 1946, la cual entro en vigor en abril de 1948.

A partir de este enunciado podría considerarse que es casi imposible alcanzar un completo bienestar, pero, también se pone de manifiesto que la salud no solamente es ausencia de enfermedad, sino que, hay otros aspectos ligados a la salud como son la sociedad y el ambiente que nos rodea. Es evidente que las interrelaciones entre el hombre, la sociedad

y la naturaleza son complejas, por ello, se requiere adoptar un enfoque más amplio y menos antropocentrista para conocer y manejar adecuadamente estas interrelaciones, ya que, es necesario comprender cuales son los problemas o necesidades que impiden alcanzar un nivel de salud adecuado, debido a que, el estado de salud de una sociedad es indicativo de las relaciones que tiene esta con su entorno (el ambiente) (Rengifo, 2008).

3.3 Seguridad alimentaria

La OMS (2017) se esfuerza por promover la disponibilidad de alimentos inocuos, sanos y saludables para toda la población. También se afana en promover la integración de la inocuidad de los alimentos en los programas de nutrición y seguridad alimentaria.

El acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud. Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer. Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas, casi 1 de cada 10 habitantes, por ingerir alimentos contaminados y que 420,000 mueren por esta misma causa. El suministro de alimentos inocuos fortalece las economías nacionales y el comercio, contribuye a la seguridad alimentaria y nutricional, y sirve de fundamento para el desarrollo sostenible (OMS, 2015).

La seguridad alimentaria se refiere al grado de satisfacción de los requerimientos nutricionales y a las variaciones internas de esa satisfacción. Una de las estrategias de seguridad alimentaria es la capacidad de generar alimentos cuya composición y volumen permitan satisfacer la demanda y, además, las necesidades tanto de las regiones como de los grupos sociales que no tengan acceso al mercado debido a problemas de ingreso (Arroyo *et al.*, 2017).

3.4 Inocuidad de los alimentos

Ante el crecimiento de la población mundial, la intensificación e industrialización de la agricultura y la producción ganadera para satisfacer la creciente demanda de alimentos, se plantean a la vez oportunidades y dificultades para la inocuidad de los alimentos. Se prevé que el cambio climático también incidirá en la inocuidad de los alimentos, ya que, los cambios de temperatura pueden modificar los riesgos que la amenazan, relacionados con la producción, almacenamiento y distribución de alimentos (OMS, 2015).

Cuando el suministro de alimentos es inseguro, las personas tienden a adoptar dietas menos sanas y a consumir más “alimentos insalubres” que contienen sustancias químicas, microbios y otros peligros que ponen en riesgo la salud (OMS, 2015).

3.5 Cultivo de maíz en México

En México el cultivo de maíz es de suma importancia no solo por su riqueza en cuanto a biodiversidad, sino también por su carácter económico-agrícola, social y cultural (Turrent, 2008).

El maíz (*Zea mays*) forma parte de los granos básicos a nivel mundial, tan solo en el período de 1998-2008 mostro un crecimiento moderado, con una Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) de 2.7%. Así mismo, en 2008 aumento su volumen de producción con respecto al de 1998, pasó de 615.8 millones de toneladas a 822.7 millones de toneladas. Los principales países en los que se concentró la producción de maíz fueron: Estados Unidos con el 40%, China con el 20%, Brasil con el 6% y México con el 3% de la producción (Caballero, 2010).

La superficie cosechada de maíz a nivel mundial tuvo una TMAC de 1.4%, lo que significó un incremento de 138.8 millones de hectáreas en 1998 a 161.0 millones de hectáreas en 2008. Los principales países en los que se concentró esta superficie cosechada fueron: Estados Unidos, China, Brasil y México con 21%, 18%, 9% y 5% respectivamente (Caballero, 2010).

El maíz es una planta nativa de México que actualmente se destina para la alimentación humana y del ganado, además de su aprovechamiento industrial. En México en 2008 se produjeron 37,481,648 toneladas de granos básicos, de los cuales el maíz fue el cultivo de mayor importancia debido a que aportó el 65.1% (Caballero, 2010). En 2012 la producción de maíz fue de 22 millones de toneladas, en el país. El volumen y la calidad del maíz se ve afectada principalmente por plagas, enfermedades, factores como la temperatura, salinidad de los suelos, deficiencia de nutrientes en los suelos y sequías (Martínez *et al.*, 2013).

3.6 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios facultativos, los cuales se reproducen por esporas, sexual o asexualmente. Los hongos no tienen clorofila por lo que no pueden realizar fotosíntesis y por consiguiente se alimentan de materia orgánica (Vargas y Villamizar, 2005; Arenas, 1993).

Tal como lo menciona Pontón (2008), la pared celular está compuesta básicamente de polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano o el galactomanano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas. Todos estos componentes están asociados entre sí dando lugar a una estructura rígida. Lo que hace que estos microorganismos absorban solo nutrientes simples y solubles.

En cuanto a las características estructurales del hongo, este presenta un complejo llamado talo o micelio, el cual está constituido por hifas (Moreno, 2000). Por otro lado, la fisiología de los hongos filamentosos les permite adaptarse a condiciones más extremas que otros microorganismos, por ejemplo, en sustratos se pueden desarrollar en concentraciones de azúcar elevadas (10%) ya que, no son sensibles a la presión osmótica elevada, además, crecen en un período de 4 a 7 días, pudiendo resistir condiciones de acidez relativamente altas, a pH entre 2 y 9, con un pH óptimo de 5 a 6. Sus fuentes de carbono son la glucosa

principalmente, pero también el almidón y la celulosa. Aprovechan fuentes de nitrógeno inorgánico, tal es el caso de sales de amonio y nitratos (Moreno, 2000).

Dentro de los hongos filamentosos se encuentra *Aspergillus* un hongo productor de micotoxinas, metabolito secundario tóxico; tanto el hongo como el metabolito generan múltiples afectaciones en la salud humana y animal.

3.6.1 Generalidades de *Aspergillus* spp.

El género *Aspergillus* pertenece a la División Ascomycota (Euascomycetes, Eurotiales, Aspergillaceae) (Houbraken y Samson, 2011), que es integrada por especies anamórficas con conocidas o presumidas nueve o más formas telomórficas, además incluye 4 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Nidulantes*). El género está integrado actualmente por más de 300 especies (Samson *et al.*, 2014), de las cuales, unas 40 se han reportado como causantes de infecciones en humanos y otros animales, principalmente incluidas en las secciones *Fumigati*, *Circumdati*, *Flavi* y *Nigri*. Se reconoce a Link (1809) como al autor que validó al género (CINB), a pesar de que Micheli (1729) fue el primero que lo describió, Micheli lo nombro así por el parecido que tenía con el “*aspergillum*” instrumento utilizado para dispersar el agua bendita (Piontelli, 2014).

Algunas especies pertenecientes a este género son de importancia ecológica, genética, biotecnológica, y, algunas otras son patogénicas y micotoxicogénicas para el hombre y otros mamíferos (Powell *et al.*, 1994).

Aspergillus es un hongo ubicuo, sus especies se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente en todo el mundo especialmente en zonas tropicales y subtropicales (Ryan, 2004). Aunque su principal nicho ecológico es la tierra, el agua o la vegetación, las esporas de *Aspergillus* se pueden dispersar fácilmente en el aire y sobrevivir en diferentes condiciones ambientales. Este hongo tiene un ciclo biológico muy simple en el cual se forman esporas para su reproducción y tras la germinación de estas esporas se forman las hifas que serán las formas invasivas del hongo. La simplicidad del ciclo biológico favorece

una alta capacidad del hongo para la esporulación y como consecuencia la presencia de concentraciones altas de esporas en el aire (García, 2012). Lo cual pone en peligro la vida de pacientes inmunosuprimidos, como aquellos con neutropenia prolongada, infección por VIH avanzada, inmunodeficiencia heredada o sometidos a trasplante alogénico de células madre, de pulmón y de corazón (Cuervo *et al.*, 2010).

Aunque hay varios cientos de especies en el género *Aspergillus*, las que tienen un impacto considerable en la salud humana o animal suelen ser *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*, entre otras (Paulussen *et al.*, 2017). Sin embargo, dependiendo de la virulencia de la cepa fúngica, el estado inmunológico y / o la estructura y función pulmonar del huésped, *Aspergillus* puede conducir a una variedad de reacciones alérgicas y enfermedades infecciosas en individuos inmunocomprometidos. Esto puede progresar a una infección invasiva y letal del sistema respiratorio, a menudo seguido de diseminación a otros órganos, una condición conocida como aspergilosis invasiva (Kosmidis y Denning, 2015).

Las características morfológicas de *Aspergillus*, una notable biología de tolerancia al estrés, la capacidad de penetrar las defensas del huésped y colonizar-dañar el huésped y otros aspectos de su ecofisiología contribuyen colectivamente a su eficacia como patógeno (Paulussen *et al.*, 2017).

Aspergillus produce aflatoxinas, las micotoxinas naturales más tóxicas, dentro de las principales especies productoras de aflatoxinas están *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Martínez *et al.*, 2013). Son considerados hongos termotolerantes y microtermofílicos; el clima de las regiones tropicales y semitropicales favorece el crecimiento de estos hongos, debido a que, es un hongo cosmopolita este puede incluso encontrarse en zonas templadas (Bogantes *et al.*, 2004). Tienen como principal reservorio al suelo y contaminan una gran variedad de productos alimenticios (Klich, 2007).

Se desarrolla a una temperatura mínima de 6- 8 °C, con una óptima de 36-38 °C y de 44-46 °C como máxima, una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 %, y, pueden crecer en un intervalo de pH amplio (2,1 a 11,2) con

un crecimiento óptimo entre 3,5 y 8. Para la producción de aflatoxinas, se requieren una temperatura mínima de 12 °C, una óptima de 27-30° C, y como máxima 40-42 °C (Bogantes *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2013).

Aspergillus se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Martínez *et al.*, 2013).

Las principales características macro y microscópicas utilizadas en la clasificación a nivel de especie en el género *Aspergillus* incluyen el diámetro de las colonias; coloración del anverso y reverso de las colonias; presencia de esclerocios, gotas de exudado y pigmento difusible; textura de las colonias, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula; medidas de los estipes, vesículas, métulas y fiálides; ornamentación y color de las conidias, de las células de Hülle y de las ascosporas (Arrúa *et al.*, 2012).

3.6.1.1 *Aspergillus*-Huésped-Respuesta inmune

Los hongos pueden causar enfermedades y desbordar los sistemas de defensa del huésped debido a la presencia de varios genes y proteínas asociados con su patogenicidad, llamados factores de virulencia. La formación de factores de virulencia en *Aspergillus* ocurre naturalmente durante su desarrollo en el huésped humano; estos factores de virulencia los protegen en condiciones desfavorables y mejoran la propagación de la infección en el tejido (Mezher *et al.*, 2015).

Dentro del género *Aspergillus* existen factores de virulencia comunes los cuales confieren al hongo una mayor facilidad para poder invadir al huésped. Dentro de los factores de virulencia identificados para diferentes especies de *Aspergillus* se encuentran las adhesinas, pigmentos, enzimas hidrolíticas tales como proteasas, fosfolipasas, ribonucleasas, restrictocina; catalasas, superóxido-dismutasas, micotoxinas y metabolitos no proteicos de bajo peso molecular. La micotoxina, principalmente gliotoxina, es uno de

los poderosos factores de virulencia producidos por *A. fumigatus* y *A. terreus* en muestras de pacientes (Raksha y Urhekar, 2017). Las toxinas pueden ser secretadas por *Aspergillus* en un momento crucial de patogénesis, cuando el hongo interacciona con el huésped, al colonizar el epitelio mucoso (Amitani *et al.*, 1995). Estas toxinas tienen la capacidad de ralentizar el movimiento ciliar y lesionar el epitelio del tracto respiratorio (Dagenais y Keller, 2009).

Frecuentemente *Aspergillus* infecta al huésped por vía aérea, a través de la inhalación de sus conidios hasta el pulmón. El tiempo de germinación es variable, pueden ser días o incluso meses, dependiendo de la especie. Aunque la inhalación de estas esporas por el ser humano es muy frecuente, se calcula que inhalamos más de 200 esporas diarias, habitualmente, no producen ninguna enfermedad al ser eliminadas eficientemente por el sistema inmunitario (Cuervo *et al.*, 2010; Garcia y Carratalà, 2012).

Sin embargo, en algunos huéspedes, la espora tiene mayor facilidad para alcanzar el tracto respiratorio inferior y entonces, su tamaño reducido permite que se deposite en el alvéolo. Una vez depositado y, de nuevo, dependiendo de la respuesta del huésped, se pueden producir un amplio espectro de enfermedades tales como manifestaciones alérgicas (aspergilosis broncopulmonar alérgica), más frecuentes en el huésped inmunocompetente, la formación de masas fúngicas (aspergilomas), que veremos en pacientes con cavidades pulmonares preexistentes y la enfermedad invasora, característica del huésped inmunodeprimido (Garcia y Carratalà, 2012).

Uno de los principales déficits del huésped que predispone a una infección oportunista es la neutropenia. En pacientes neutropénicos, el grado y la duración de la neutropenia predicen el riesgo de infecciones potencialmente mortales (Segal, 2007).

Un concepto clave en el estudio de las respuestas inmunes a *Aspergillus* es que las susceptibilidades del huésped determinan la forma morfológica, la estructura antigénica y la ubicación física del hongo. Cuando un hospedador sano inhala pequeñas cantidades de conidios, los conidios se eliminan con éxito mediante mecanismos de defensa mucociliares epiteliales, y los conidios ocasionales que llegan a los alvéolos pueden ser

tratados por fagocitos residentes. Sin embargo, en hospederos con una respuesta inmune alterada los conidios germinan y forman hifas en el lado luminal de la superficie de la mucosa anormal e inician una respuesta inflamatoria sólida centrada en la vía aérea (Park y Mehrad, 2009). Todas estas células juegan un papel primordial tanto en la destrucción inicial del hongo como en la activación de las posteriores etapas de la respuesta inmunitaria (Garcia y Carratalà, 2012).

Los macrófagos alveolares (MA) constituyen la primera línea de defensa del huésped fagocítico contra los conidios inhalados. Los monocitos y neutrófilos de sangre periférica se reclutan posteriormente en los sitios de infección. Después de la germinación (transformación de conidios a hifas), los neutrófilos son el brazo de defensa del huésped dominante contra las hifas, la forma de moldes invasiva de los tejidos (Schaffner *et al.*, 1982). Por lo tanto, se produce una respuesta inmunitaria innata temprana cooperativa que está mediada por macrófagos y neutrófilos en los que los macrófagos se dirigen a conidios inhalados y neutrófilos dañan las hifas, lo que impide la invasión parenquimatosa (Roilides, 1994).

Los RRP más importantes en la respuesta del huésped frente a la infección por *Aspergillus* son los TLR y la dectina-1. Entre los TLR existen dos que presentan un papel y el TLR4. La activación de cada receptor mediará respuestas totalmente diferentes, aunque por ahora no queda muy claro que PAMP de *Aspergillus* son los reconocidas por cada tipo de TLR. Cuando *Aspergillus* se une al TLR4, se genera una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , interleuquina [IL] IL-1, IL12, IL-15, interferón-gamma) que se asocia a un efecto de protección frente la infección. De esta respuesta citoquímica se generará una respuesta adaptativa mediada por los linfocitos Th1. Por el contrario, la activación del TLR2 favorece una respuesta citoquímica antiinflamatoria, mediada por la IL-10 y la IL-4, y como consecuencia, promueve una respuesta del sistema inmune adaptativo mediado por los linfocitos Th2, relacionados con una mayor susceptibilidad a padecer infección fúngica invasora (Gersuk *et al.*, 2006; Bochud *et al.*, 2008).

La dectina-1 es específica para los betaglucanos presentes en la pared celular de los hongos. Este receptor aumenta de manera considerable su expresión cuando el huésped está continuamente expuesto al patógeno. La activación de la dectina-1 favorece la fagocitosis del hongo por la célula del sistema inmune, inicia la cascada inflamatoria de citoquinas y activa procesos oxidativos, como por ejemplo los mediados por la NADPH-oxidasa (Underhill *et al.*, 2005; Brown, 2006).

Una vez que se reconoce *Aspergillus* por los diferentes receptores, por un lado, se da la producción de citoquinas para activar la respuesta inmune adaptativa, y por otro se inician una variedad de procesos cuyo objetivo es la muerte del hongo, en donde, las células de defensa fagocitan las diferentes formas fúngicas y, según se trate de una espora o de una hifa, se activan diferentes procesos. Los macrófagos matarán las esporas mayoritariamente mediante procesos de oxidación o de acidificación. En los neutrófilos, los procesos de oxidación son los que tienen mayor relevancia (García y Carratalà, 2012).

Algunos factores humorales también participan en la respuesta inmune innata del huésped frente a la infección por *Aspergillus*. El sistema del complemento actúa frente a las diferentes formas del hongo, ya sea por su vía alternativa (que reconoce y elimina esporas) o por la clásica (que reconoce las formas en germinación y las hifas). En el fluido alveolar, existen algunas proteínas (lectinas tipo C) que favorecen la fagocitosis y aglutinan las esporas de *Aspergillus*, inmovilizando al patógeno y favoreciendo la acción del sistema inmunitario (García y Carratalà, 2012).

En la respuesta inmune adaptativa las células dendríticas procesan el antígeno y lo presentan a los linfocitos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los linfocitos CD4+, también denominados linfocitos T helper (Th, 'T cooperadores'), se encargan de regular y amplificar la respuesta del huésped frente *Aspergillus*. Los linfocitos CD4+ se subdividen a su vez en linfocitos de la subpoblación Th1 y Th2. A través de la secreción de citoquinas, estos linfocitos son los responsables de coordinar la respuesta inmune celular. La respuesta mediada por las células Th1 se asocia con la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Como consecuencia de esta estimulación se activan los

macrófagos, se generan más linfocitos T CD4+, se favorece la producción de anticuerpos y se retrasa las reacciones de hipersensibilidad. La respuesta Th2 se asocia a la secreción de citoquinas antiinflamatorias, entre las que destaca la IL-10, que regulan la inflamación causada por las citoquinas dependientes de la respuesta Th1. La respuesta Th2 también se asocia a diferentes mecanismos de las reacciones alérgicas. Solo de un óptimo balance entre la respuesta Th1 y Th2 se obtendrá una respuesta inmunitaria que permita hacer frente a la infección por *Aspergillus*. Esta respuesta Th influirá en activación de linfocitos B y en la maduración del resto de células fagocíticas (García y Carratalà, 2012).

3.6.1.2 Principales manifestaciones clínicas de *Aspergillus*

Las manifestaciones clínicas abarcan reacciones alérgicas, colonización asintomática, infección superficial y enfermedad invasora. La sinusitis alérgica por *Aspergillus* se presenta en pacientes adultos jóvenes con antecedente de asma o rinitis alérgica, pólipos nasales crónicos y opacificación en los senos paranasales; la aspergilosis broncopulmonar alérgica se caracteriza por presentar remisiones y exacerbaciones. Por otro lado, el aspergiloma pulmonar consiste en un conglomerado sólido de hifas de *Aspergillus*, fibrina, moco y residuos celulares que crece en una cavidad pulmonar preexistente, puede permanecer como una lesión asintomática en muchos pacientes, sin embargo, la complicación más grave puede ser la generación de hemoptisis potencialmente fatal. Otra de las manifestaciones clínicas es la otomicosis, un proceso saprófito que compromete el canal auditivo externo y cuyos síntomas son prurito, dolor, hipoacusia y otorrea. En el caso de la aspergilosis pulmonar invasora (API) los hallazgos en el examen físico, así como, los síntomas que abarcan tos, disnea, dolor pleurítico y fiebre, son inespecíficos, por lo que se requiere una alta sospecha clínica para iniciar el tratamiento, ya que la sobrevida depende de este. La aspergilosis cerebral tiene un porcentaje de mortalidad del 90%, por lo que es la más temida, los síntomas que abarca son cefalea, convulsiones, déficit focal, es importante mencionar que los hallazgos por imagen son inespecíficos; por

lo tanto, el diagnóstico frecuentemente no se sospecha y es difícil de realizar (*Cuervo et al.*, 2010).

3.6.1.3 *Aspergillus* y su identificación

Las especies de *Aspergillus* se estudian mediante sus características macro y micromorfológicas, junto a caracteres de crecimiento en diferentes medios de cultivo, perfiles de extrolitos (micotoxinas) y técnicas moleculares, tales como; secuencias del gen de la β -tubulina, calmodulina y actina, mientras otras técnicas de análisis como, amplificación de DNA polimórfico al azar (RAPD) entre otras, han sido utilizadas. Concretamente para el diagnóstico de Aspergilosis invasiva se considera el uso de imágenes, microscopía directa, histopatología, cultivo, detección de antígenos y detección de ADN (Piontelli, 2014).

Actualmente para la identificación de *Aspergillus* se recomienda examinar varias secuencias de genes (ITS, calmodulina, β -tubulina, actina) y luego comparar los resultados obtenidos con secuencias almacenadas en bases de datos bien conocidas. Sin embargo, los ITS con frecuencia muestran poca o ninguna variación entre especies estrechamente relacionadas. Para los metabolitos producidos por estos hongos, se recomienda analizar 4-8 compuestos en lugar de solo una molécula. Lo más apropiado sería evitar el uso de micotoxinas como criterio para separar especies, ya que podrían o no ser producidas por estos hongos (Samson *et al.*, 2014).

3.6.1.4 *Aspergillus* en suelo agrícola

El principal reservorio de este hongo es el suelo. Una de las especies de este género, de mayor importancia económica a nivel mundial es *A. flavus*, el cual se encuentra en una mayor concentración en el suelo de los campos de cultivos, los cuales son altamente susceptibles, pero *A. flavus* también se encuentra en los pisos de los bosques, donde no hay muchos hospedadores conocidos, lo que refleja su capacidad saprófita. En un campo cultivado, la población de *A. flavus* en el suelo aumenta después de la cosecha y durante

los eventos calientes y de sequía y tiene una distribución espacial total o parche dentro de los campos (Sweany *et al.*, 2014).

En el campo, *Aspergillus* contamina plantas de maíz a través de vectores como insectos o bien a través de diseminación aérea de los conidios los cuales infectan la semilla (Sweany *et al.*, 2014).

3.6.1.5 *Aspergillus* en maíz

Las especie del género *Aspergillus* son mohos hialinos de rápido crecimiento, oportunistas comunes que se encuentran en los suelos o sobre materias en descomposición (Alimentarius, 2012).

Aspergillus ataca diversos cultivos, tal es el caso del maíz, el cual es invadido tanto durante la cosecha como en la postcosecha, así también, es un hongo altamente productor de micotoxinas. El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas (Martínez *et al.*, 2013).

Las pérdidas en la producción del grano se asocian con su manipulación durante la cosecha en el campo, almacenaje, transporte y procesamiento para el consumo humano o animal (Padrón *et al.*, 2013).

3.6.2 Generalidades, características macro y micromorfológicas de *Aspergillus flavus*

El suelo es el principal hábitat de *Aspergillus flavus*, por lo que hay una amplia gama de cultivos agrícolas importantes, que incluyen monocotiledóneas y dicotiledóneas, en las cuales puede actuar como patógeno (Cleveland *et al.*, 2009).

A. flavus sobrevive como conidios o esclerocios en el suelo y los desechos orgánicos. Mientras que los conidios permiten que el hongo se disemine en masa, los esclerocios permiten la supervivencia en condiciones ambientales adversas y pueden germinar una vez que mejoran las condiciones. En los tejidos del huésped, incluidos los humanos, los animales y las plantas, los conidios germinan y crecen como micelios, que pueden convertirse en conidióforos o esclerocios dependiendo de las señales ambientales y nutricionales. Si bien el conidio se considera la espora infecciosa predominante, se desconoce la forma reproductiva predominante en el suelo (Amare y Keller, 2014).

Este hongo contaminante de granos almacenados y otros cultivos al producir aflatoxinas, los compuestos tóxicos y hepatocarcinógenos naturales más potentes, puede causar toxicidad aguda y carcinogenicidad a largo plazo, al ingerir alimentos contaminados con este metabolito. *A. flavus* también puede causar infección directa y enfermedad sistemática en humanos. Después de *A. fumigatus*, *A. flavus* es la segunda causa principal de aspergilosis invasiva y no invasiva en pacientes inmunocomprometidos (Squire, 1981; Cleveland *et al.*, 2009; Nierman *et al.*, 2015).

Características macromorfológicas: colonias de color verde oliváceo a verde amarillento; micelio blanco; esclerocios, cuando están presentes, de color marrón oscuro a negro, variables en forma y tamaño; reverso incoloro, marrón claro o anaranjado; textura de la colonia variable, generalmente lanosa o flocosa (Abarca, 2000).

Características micromorfológicas: cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales; estipes normalmente rugosos, hialinos o de color marrón pálido. Vesícula esférica; métulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos o elipsoidales, lisos o ligeramente rugosos (Abarca, 2000).

3.6.3 Generalidades, características macro y micromorfológicas de *Aspergillus parasiticus*

La especie *A. parasiticus* se considera cosmopolita, común en suelos cultivados, granos, alimentos granulados, composta, vegetales, insectos, productos almacenados y otros ambientes diversos (Salim y Runco, 2008). Al igual que *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* contamina granos, legumbres, nueces, maíz y cacahuates; y es productor de una de las micotoxinas más tóxicas las aflatoxinas (Muriel, 2017).

Características macromorfológicas: las colonias presentan un diámetro de 40-50 mm, tonalidades amarillentas y verdosas que con el tiempo oscurecen, reverso amarillento (Kozakiewicz, 1989; Abarca, 2000).

Características micromorfológicas: cabezas conidiales uniseriadas radiales de más de 400 μm de diámetro, conidióforo ligeramente rugoso e incoloro de más de 200 μm de longitud, vesículas subglobosas o globosas, conidios globosos, equinulados, de color verdoso amarillento midiendo aproximadamente de 3.6-5 μm de diámetro (Kozakiewicz, 1989; Abarca, 2000).

3.6.4 Otros hongos filamentosos de importancia médica y económica

Algunos de los hongos de mayor importancia asociados a granos y considerados contaminantes de almacén o campo, pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Martínez *et al.*, 2013). Comúnmente estos hongos se reproducen mediante esporas las cuales pueden estar en abundancia en los almacenes, siempre y cuando sean propicias las condiciones de temperatura y humedad adecuadas. Los insectos, así como el aire diseminan las esporas para que puedan invadir, geminar y colonizar diversos sustratos (Agrios, 2005).

Los denominados hongos de campo son aquellos que contaminan los granos antes o durante la cosecha cuando ocurre el desarrollo o maduración de los granos, o bien cuando

la planta cortada se encuentra a la intemperie amontonada para la trilla. La presencia de estos hongos es visible en los diferentes órganos de las plantas, en mazorcas, vainas, espigas o capítulos. Algunos hongos de campo son: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Fusarium* (Christensen y Kaufmann, 1969).

Los hongos de almacén a diferencia de los hongos de campo predominan en las bodegas o lugares en donde se almacenan los cereales. Estos hongos también son cosmopolitas y contaminan una gran variedad de materiales orgánicos e inorgánicos, frecuentemente estos mohos solo son contaminantes de granos durante su almacenamiento, aunque *Aspergillus* es una de las excepciones ya que también puede invadir antes de la cosecha (Christensen y Kaufmann, 1969). Cabe mencionar que los almacenes que no están bien diseñados o en algunos otros casos que son espacios improvisados por lo regular al aire libre, comprometen la sanidad de los granos, debido a que se complica controlar o bien disminuir los efectos ambientales adversos como por ejemplo la lluvia y humedad (Martínez *et al.*, 2013).

3.6.4.1 *Penicillium*

El género *Penicillium* es un género cosmopolita que puede desarrollarse en diversos sustratos como granos, frutas, paja. Es importante en la alimentación animal y de humanos debido al deterioro que produce en los granos, además de producir toxinas (Agrios, 2005; Sommers *et al.*, 1992).

Muchas de las especies pertenecientes a *Penicillium* son abundantes en el suelo, ya que tienen la capacidad de competir por sustratos orgánicos. Aunado a esto, su proliferación en alimentos es fácil, representando un serio problema para la conservación de estos, además de que es un hongos potencialmente micotoxigénico, algunas de sus especies son productoras de la micotoxina denominada Ocratoxina presente en diversos alimentos, y la cual es considerada nefrotóxica, inmunotóxica, teratogénica, además la IARC la clasifica dentro de la clase 2B por ser probable carcinógeno humano (Murphy *et al.*, 2006; Agrios, 2005; Alexopoulos *et al.*, 1996). Algunas otras especies de *Penicillium* son patógenos

importantes de frutas durante la post cosecha, y otras son benéficas y con un amplio uso en la industria farmacéutica y alimenticia (Martínez *et al.*, 2013).

Descripción macromorfológica: la velocidad de crecimiento de las colonias es moderada a rápida, con un micelio aéreo que va desde colores claros, blanco, verde, gris o amarillo. La textura es flocosa o algodonosa, aterciopelada o fasciculada. El reverso de las colonias puede ser incoloro o en algunos casos debido a los pigmentos que genera adquirir tonalidades claras (Davel *et al.*, 2016).

Características micromorfológica: Conidióforos rectos, hialinos o levemente pigmentados, con fiálides que nacen directamente de la hifa o sobre métulas. Conidios producidos en cadena, de forma esféricas o elipsoidales, a menudo con una base trunca, hialinas, de pared delgada y en ocasiones ornamentadas (Tangarife, 2011).

Penicillium verrucosum es una de las especies productoras de la micotoxina Ocratoxina A presente en diversos alimentos, la cual es considerada nefrotóxica, inmunotóxica, teratogénica, y afecta principalmente a los riñones, además, la IARC la clasifica dentro de la clase 2B por ser un posible carcinógeno humano (FAO. 2003; Murphy *et al.*, 2006).

3.6.4.2 *Fusarium*

Fusarium es un hongo filamentoso que se encuentra en suelos y plantas. Es considerado oportunista debido a su capacidad de crecer a 37 °C. Algunas de sus especies son productoras de toxinas las cuales pueden afectar al hombre y animales. Se han descrito alrededor de 100 especies de las cuales 12 son consideradas patógenas para el hombre, entre estas se encuentran *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*. Es un género de gran importancia económica debido a que actúan como fitopatógenos (Monzón y Rodríguez, 2001; Tapia y Amaro, 2014).

Características micromorfológicas: las fiálides tienen forma de botella y generalmente son finas, ya sea, simples o ramificadas, cortas o largas. Los macroconidios tienen forma de media luna, hialinos y septados. Las características importantes para una adecuada

clasificación son el largo, ancho, curvatura, número de septos y los detalles que presentan los extremos de las células de pie y apical. No todas las especies presentan microconidios, pero cuando están estos pueden ser ovales, fusiformes, clavadas, estar en agrupaciones o en cadenas largas o cortas (Tapia y Amaro, 2014).

Características macromorfológicas: el crecimiento de la colonia es rápido y suele ocupar toda la placa; el color de la colonia puede ser naranja, violeta, café, rojo, gris, blanco, el color puede variar según el medio de cultivo que se utilice. El micelio aéreo generalmente es abundante y algodonoso. Los datos que contribuyen a una adecuada identificación de la especie son la velocidad del crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia (Monzón y Rodríguez, 2001).

Algunas especies de *Fusarium* son productoras de micotoxinas, estas son: *F. sporotrichioides* productor de la Toxina T-2, *F. graminearum* produce deoxinivalenol y zearalenona, y *F. moniliforme* fumonisina B1 (FAO, 2003).

3.6.4.3 *Paecilomyces*

El género *Paecilomyces* se aísla de una gran variedad de sustratos entre estos el suelo, restos vegetales y frutas, generalmente es considerado como contaminante. Es de importancia económica debido principalmente al daño que causa en diversos materiales. Algunas especies están asociadas a enfermedades en humanos y animales *Paecilomyces lilacinus* Samson y *P. variotti* Bain (Junior *et al.*, 2005). Al igual que otros hongos saprófitos, *Paecilomyces* spp. se pueden encontrar en materiales clínicos sin tener importancia etiológica (Jang *et al.*, 1971).

Las características morfológicas que presenta son las siguientes: fiálides largas y delicadas, poco ordenadas, solitarias, en verticilos o irregularmente dispuestas sobre el conidióforo, conidios con forma de limón y las colonias generalmente son de color blanco, marrones o lila (Davel *et al.*, 2016).

3.6.4.4 *Alternaria*

Alternaria es un hongo filamentoso, saprofito. En el ambiente es un hongo patógeno de vegetales, su principal reservorio es el suelo, aunque también se encuentra en vegetales en descomposición, en frutas, en papel, tejidos y fómites (INSHT, 2014).

Las esporas se encuentran en el aire (bioaerosol), a finales de verano y otoño es cuando se alcanzan las concentraciones más altas. Es considerado un contaminante de los edificios o lugares de trabajo. Las esporas son resistentes a la radiación ultravioleta y la desecación (INSHT, 2014).

Algunas especies de *Alternaria* son consideradas contaminantes de postcosecha y otras de importancia clínica debido a la producción de metabolitos secundarios tóxicos, micotoxinas implicadas en el desarrollo de cáncer en mamíferos (Thomma, 2003).

La característica taxonómica clave del género es la producción de conidios grandes, multicelulares, de color oscuro con septos longitudinales y transversales. Estos conidios son más anchos cerca de la base y gradualmente se van estrechando hacia un pico alargado, proporcionando una apariencia tipo maza. Se producen en cadenas simples o ramificadas (Honda *et al.*, 1987, 1990).

El crecimiento de las colonias es rápido (tres o cuatro días), presentan un aspecto veloso, al principio de color gris, después adquieren tonos negros oliváceos en el centro y reverso y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia (INSHT, 2014).

3.7 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos específicos que son contaminantes comunes en productos agrícolas. Estos compuestos son tóxicos para humanos y animales, y un problema de salud en el mundo (Huerta *et al.*, 2016).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud dentro de las sustancias químicas que contaminan a los alimentos se encuentran las micotoxinas, y son las que más atención han

merecido debido a la importancia que tienen en cuanto a la inocuidad de los alimentos (OMS, 2002).

Los efectos que tienen estos metabolitos sobre la salud humana y animal son serios, por estos es que en diversos países se han fijado límites permisibles en alimentos y raciones, con la finalidad de proteger la salud humana e interés económicos. Dentro de los factores que se consideran para fijar los límites y reglamentar las micotoxinas se encuentran: disponibilidad de datos toxicológicos; datos sobre la presencia de las micotoxinas en productos básicos; y conocimiento sobre la distribución de las concentraciones de las micotoxinas en un lote (Van y Jonker, 2004).

Las micotoxinas son formadas por una serie de reacciones consecutivas, catalizadas a partir de intermediarios bioquímicamente simples del metabolismo primario; por ejemplo: acetato, mebolato, malonato y ciertos aminoácidos. La producción de micotoxinas está asociada al proceso de esporulación del hongo, estrechamente relacionado con las condiciones ambientales y la concentración de nutrientes en el medio (Bogantes *et al.*, 2004).

3.7.1 Micotoxinas y cambio climático

La destrucción a gran escala de los bosques, la quema de combustibles fósiles y otras actividades humanas han cambiado el clima mundial. Las concentraciones de metano, dióxido de carbono, óxido nitroso y clorofluorocarbonos en la atmósfera han aumentado dando como resultado un calentamiento ambiental (Chakraborty *et al.*, 2000).

Son diversos los factores involucrados en la contaminación de alimentos por micotoxinas, pero el clima es el más importante (Paterson y Lima, 2010). Factores ambientales como la temperatura y humedad contribuyen en la producción de estos metabolitos en los cultivos antes y/o después de la cosecha; otros factores ambientales asociados en la producción de micotoxinas son el ataque de insectos, sequías y condiciones de estrés de las plantas (Miraglia *et al.*, 2009).

Las micotoxinas son dependientes del clima, problemas asociados a la planta y al almacenamiento, también influenciados por factores no infecciosos (por ejemplo, biodisponibilidad de (micro) nutrientes, daño por insectos y otros ataques de plagas), que a su vez dependen de las condiciones climáticas. El clima representa la fuerza impulsora del agroecosistema clave de la colonización por hongos y la producción de micotoxinas (Paterson y Lima, 2010).

Por ejemplo, la lluvia, en o cerca de la cosecha, significa concentraciones inaceptables de aflatoxinas en muchos cultivos en regiones cálidas. Por otro lado, los cultivos en desarrollo con frecuencia son muy resistentes a la infección por *A. flavus* y a la posterior contaminación por aflatoxinas, a menos que las condiciones ambientales favorezcan el crecimiento fúngico y la susceptibilidad de los cultivos. Las heridas producidas por insectos, mamíferos, aves, procesos mecánicos (por ejemplo, granizo) y / o el estrés de las condiciones de calor seco producen infecciones significativas durante la primera fase. Además, el clima influye directamente en la susceptibilidad del huésped (Paterson y Lima, 2010).

3.7.2 Micotoxinas importancia en el sector agrícola y de salud

Las micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos generados por hongos, representan un riesgo en el estado de salud y bienestar de los consumidores; además, también los productores, empresas y el mercado de exportación resulta afectado por las pérdidas económicas (Capcarova *et al.*, 2016).

Las micotoxinas han sido clasificadas como el factor de riesgo dietético crónico más importante, más alto que los contaminantes sintéticos, toxinas de plantas, aditivos alimentarios o residuos de plaguicidas (Kuiper, 1998). Por esto, se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre el análisis de micotoxinas en matrices de alimentos y piensos, en humanos y la exposición de animales de cría y efectos de salud relacionados (Schenzel, 2012).

3.7.3 Micotoxinas y su actividad tóxica en humanos y animales

La actividad toxica que generan las micotoxinas es aguda; estos metabolitos secundarios tóxicos inhiben la síntesis de proteínas, generan síndromes de Reye y de Kwashiorkor, son inmunosupresores, están involucrados en la irritación dérmica, son disrupciones endocrinas, producen hepatitis aguda y otras perturbaciones metabólicas; dentro del cuadro clínico se incluye hígado graso y edema cerebral severo. A largo plazo se presentan efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos. Las micotoxinas suelen entrar en el cuerpo a través de la ingestión de alimentos contaminados, pero la inhalación de esporas toxigénicas y el contacto cutáneo directo son rutas también importantes (Martínez *et al.*, 2013). Son absorbidas en el tracto gastrointestinal debido a su alta liposolubilidad y biotransformadas en el hígado por enzimas microsomales de la superfamilia del citocromo P450, entre las que se encuentran CYP1A2, 2B6, 3A4, 3A5, 3A7 y GSTM1. Las dos enzimas más importantes son representadas por la CYP3A4, que interviene en la formación de la forma exoepóxido y el metabolito aflatoxina Q₁ (AFQ₁), y la CYP1A2 forma en su mayoría la forma endoepóxido y la aflatoxina M₁ (AFM₁). Adicionalmente, en humanos se producen otros metabolitos como son aflatoxicol, AFP₁, AFB_{2á} y AFB₁ -2,2 dihidrodiol (IARC, 2012).

3.7.4 Aflatoxinas, importancia y generalidades

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos, que contaminan una amplia variedad de cereales entre estos el maíz, ocasionando una disminución en su valor nutricional y comercial (Peña *et al.*, 2013)

Las especies *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* son los principales productores de este metabolito, y pueden crecer en una amplia variedad de sustratos. Su capacidad para producir aflatoxinas depende de su sistema metabólico individual, esencial para el

metabolismo primario de lípidos y enzimas específicas (sintetasas) capaces de producir este metabolito secundario (Martins *et al.*, 2000).

Las aflatoxinas son conocidas desde 1960, cuando en Inglaterra se presentó una epidemia que mató alrededor de 100.000 pavos alimentados con maní infectado con *A. flavus* proveniente de Brasil. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de aflatoxinas, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1), G2 (AFG2), M1 (AFM1), M2 (AFM2), P1 (AFP1), Q1 (AFQ1) y D (AFD), éste último derivado del tratamiento de la AFB1 con amonio (Martínez *et al.*, 2013). Las aflatoxinas suelen designarse con letras, que se refieren a una característica física o de otro tipo del compuesto, por ejemplo, las B1 y B2 presentan fluorescencia azul (blue en inglés) y las G1 y G2, fluorescencia verde (green) cuando se exponen a radiación ultravioleta de onda larga (Bogantes *et al.*, 2004).

Es importante señalar que la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de la cepa, no de la especie (Martínez *et al.*, 2013). Los niveles de producción de aflatoxinas son afectados por parámetros como la temperatura, actividad del agua, pH, presión osmótica, naturaleza del sustrato. Las cepas toxinogénicas de *Aspergillus flavus* suelen producir niveles más altos de aflatoxina B1 y aflatoxina B2, mientras que, con *A. parasiticus* se obtienen cantidades más equitativas de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (Martins *et al.*, 2000).

Esta micotoxina se sintetiza por la ruta metabólica de los policétidos y las reacciones involucradas incluyen condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, llevando a la formación de una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bisdihidrofurano y a una ciclopentanona. Estos metabolitos se forman por la condensación del acetil-coenzima A y malonil coenzima A, dando lugar al acetil-S Coenzima A, la cual será la molécula iniciadora de la AFB1. Dentro de la vía biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB1 que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la

molécula del bisfurano. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva (Padrón *et al.*, 2013).

Son un serio problema de salud, esto debido a que son acumulativas, por lo tanto, una vez que contaminan el grano o el producto agrícola ya sea en campo o almacén, son persistentes ante la digestión, calor generado durante cocción o bien al congelamiento. Estos metabolitos son ingeridos a través de los granos, semillas, frutos, leche o carne de animales contaminados (Requena *et al.*, 2005).

Son un grupo de aproximadamente 20 metabolitos fúngicos, compuestos químicos orgánicos no proteicos, de bajo peso molecular, son inodoras, insípidas e incoloras, su esqueleto básico es un anillo de furano unido al núcleo de cumarina, son estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* son las especies que principalmente producen este metabolito (Urrego y Díaz, 2006; Martínez *et al.*, 2013; Ehrlich *et al.*, 2007; Bbosa *et al.*, 2013), en la tabla 1 se resumen las principales aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus*.

Estos metabolitos se clasifican en dos grandes grupos según su estructura química e incluyen las series de difurocumarociclopentenona (AFB1, AFB2, AFB2A, AFM1, AFM2, AFM2A y aflatoxicol) y la serie de difurocumarolactona (AFG1, AFG2, AFG2A), AFGM1, AFGM2, AFGM2A y AFB3) (Bbosa *et al.*, 2013) en la Imagen 1 se muestra la estructura química de las principales aflatoxinas.

Las aflatoxinas muestran potencia de toxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad en el orden de AFB1 > AFG1 > AFB2 > AFG2. El grado de toxicidad depende del órgano afectado, el hígado es uno de las principalmente afectados, inclusive las aflatoxinas están implicadas en la incidencia de cáncer de hígado (Bbosa *et al.*, 2013).

Tabla 1: Resumen de las principales aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus*

Difuranocoumarins	Type of aflatoxin	<i>Aspergillus</i> specie(s)	
Difurocomarocyclopentenone series	Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	<i>A. flavus</i> , <i>A. arachidicola</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. ochraceoroseus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. pseudotamarii</i> , <i>A. rambellii</i> , <i>Emericella venezuelensis</i>	
	Aflatoxin B ₂ (AFB ₂)	<i>A. arachidicola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>	
	Aflatoxin B _{2a} (AFB _{2a})	<i>A. flavus</i>	
	Aflatoxin M ₁ (AFM ₁)	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> ; metabolite of aflatoxin B ₁ in humans and animals and comes from a mother's milk	
	Aflatoxin M ₂ (AFM ₂)	Metabolite of aflatoxin B ₂ in milk of cattle fed on contaminated foods	
	Aflatoxin M _{2A} (AFM _{2A})	Metabolite of AFM ₂	
	Aflatoxicol (AFL)	<i>A. flavus</i> , metabolite of AFB	
	Aflatoxicol M ₁	Metabolite of AFM	
	Difurocoumarolactone series	Aflatoxin G ₁ (AFG ₁)	<i>A. arachidicola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. Parasiticus</i>
		Aflatoxin G ₂ (AFG ₂)	<i>A. arachidicola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
Aflatoxin G _{2A} (AFG _{2A})		Metabolite of AFG ₂	
Aflatoxin GM ₁ (AFG ₁)		<i>A. flavus</i>	
Aflatoxin GM ₂ (AFGM ₂)		Metabolite of AFG ₂	
AFGM _{2A}		Metabolite of AFGM ₂	
Aflatoxin B ₃ (AFB ₃)		<i>Aspergillus</i> species not defined	
Parasiticol (P)		<i>A. flavus</i>	
Aflatrem		<i>A. flavus</i> , <i>A. minisclerotigenes</i>	
Aspertoxin		<i>A. flavus</i>	
Aflatoxin Q ₁ (AFQ ₁)	Major metabolite of AFB ₁ in in vitro liver preparations of other higher vertebrates		

Fuente: Bbosa *et al.*, 2013

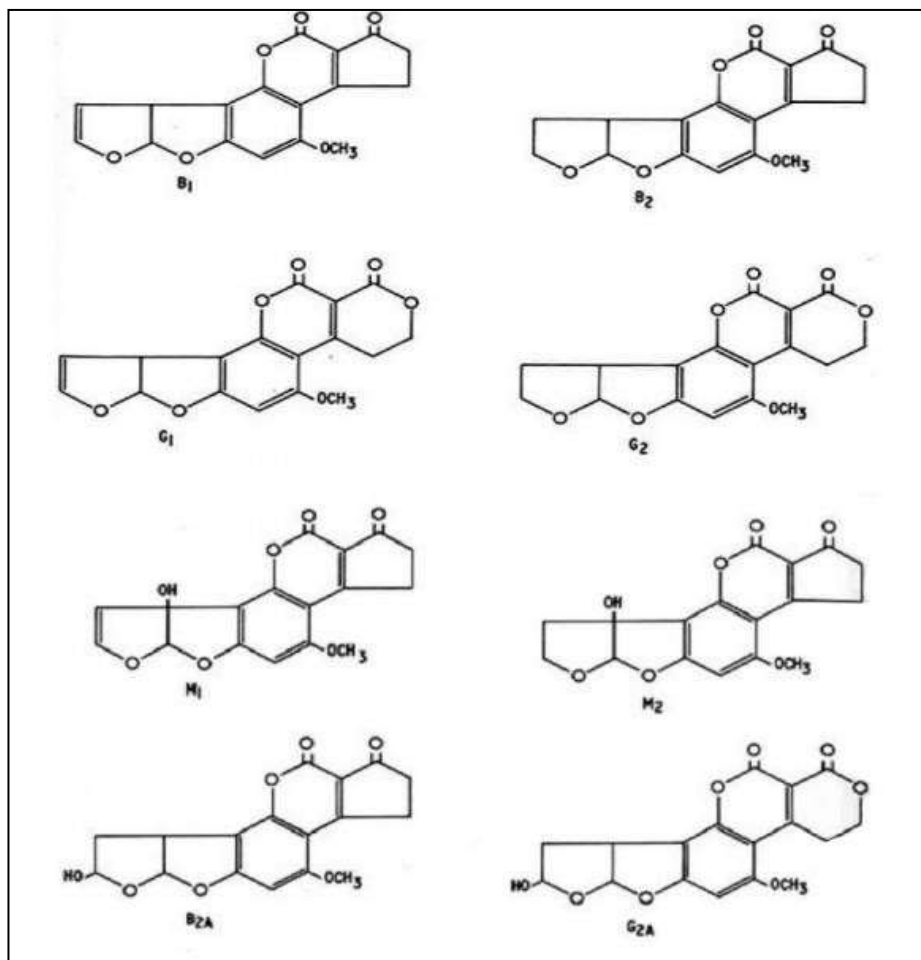


Imagen 1: Estructura química de las principales aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2A} y G_{2A}

Fuente: Bbosa *et al.*, 2013

3.7.4.1 Aflatoxinas y su mecanismo de acción

Las aflatoxinas son compuestos altamente liposolubles y se absorben fácilmente desde el sitio de exposición, generalmente a través del tracto gastrointestinal y del tracto respiratorio al torrente sanguíneo (Larsson y Tjalve, 2000; Agag, 2004).

Los seres humanos y los animales se exponen a las aflatoxinas por dos rutas principales:
 a) ingestión directa de alimentos contaminados con aflatoxinas o ingestión de aflatoxinas

arrastradas desde el alimento a la leche y productos lácteos como queso y leche en polvo, así como otros tejidos animales principalmente como AFM1 (Agag, 2004) (b) por inhalación de partículas de polvo de aflatoxinas especialmente AFB1 en alimentos contaminados en industrias y fábricas (Coulombe y Jr, 1994). Después de ingresar al cuerpo, las aflatoxinas se absorben a través de las membranas celulares donde alcanzan la circulación sanguínea. Se distribuyen en la sangre a diferentes tejidos y al hígado, el principal órgano del metabolismo de los xenobióticos. Las aflatoxinas son metabolizadas principalmente por el hígado a un epóxido reactivo intermedio o hidroxilado para convertirse en la aflatoxina M1 menos dañina. En humanos y especies animales susceptibles, las aflatoxinas especialmente AFB1 son metabolizadas por las enzimas microsomales del citocromo P450 (CYP450) para aflatoxin 8,9-epóxido, una forma reactiva que se une al ADN y a la albúmina en el suero sanguíneo, formando aductos y causando daño al ADN. Diversas isoformas de las enzimas CYP450 se producen en el hígado y metabolizan la aflatoxina en una especie de oxígeno reactivo (aflatoxina-8,9-epóxido), que puede unirse a las proteínas y causar toxicidad aguda (aflatoxicosis) o al ADN e inducir cáncer de hígado (Wild y Montesano, 2009; Wu y Khlangwiset, 2010). Las isoformas de CYP450 humanas predominantes implicadas en el metabolismo humano de AFB1 son CYP3A4 y CYP1A2. Ambas enzimas catalizan la biotransformación de AFB1 al altamente reactivo exo-8,9-epóxido de AFB1; CYP 1A2 también es capaz de catalizar la epoxidación de AFB1 para producir una alta proporción de endoepóxido e hidroxilación de AFB1 para formar aflatoxina M1 (AFM1), que es un sustrato pobre para la epoxidación y menos potente que AFB1 (Guengerich *et al.*, 1998). Esto se considera generalmente como la principal vía metabólica de desintoxicación para las aflatoxinas. El CYP3A4 es la principal enzima CYP450 responsable de la activación de AFB1 en la forma de epóxido y también forma AFQ1, un metabolito de desintoxicación menos tóxico. El CYP3A5 metaboliza AFB1 principalmente a exo-epóxido y algo de AFQ1 (Wang *et al.*, 1998). Sin embargo, los estudios de polimorfismo con CYP3A5 han indicado que esta enzima isoforma no es expresada por la mayoría de la gente, especialmente en los africanos. Los estudios en niños gambianos mostraron que las aflatoxinas atraviesan la

placenta y se transportan al feto y al recién nacido, donde pueden causar efectos perjudiciales. El CYP3A7 es una isoforma de la enzima CYP450 principal en el hígado fetal humano y metaboliza AFB1 al epóxido 8, 9 que puede causar defectos fetales en el feto en desarrollo (Kitada *et al.*, 1989).

La epoxidación de AFB1 al exo-8, 9-epóxido es un paso crítico en la ruta genotóxica de este carcinógeno. Se ha informado que la unión de AFB1 a la aducción de ADN y ADN por AFB1 exo-8,9 epóxido causa cambios funcionales en la conformación del ADN (Raney *et al.* 1993). El epóxido es altamente inestable y se une con alta afinidad a las bases de guanina en el ADN para formar aflatoxinas -N7-guanina (Guengerich, 2001). La aflatoxina-N7-guanina ha demostrado ser capaz de formar mutaciones de transversión de guanina (purina) a timina (pirimidina) en el ADN y, por lo tanto, afecta al gen supresor de p53 en el ciclo celular (Bailey *et al.*, 1996). El gen p53 es importante para prevenir la progresión del ciclo celular cuando hay mutaciones de ADN o señalización de apoptosis. Se ha informado que las mutaciones afectan algunas ubicaciones de pares de bases más que otras especialmente en la tercera base del codón 249 del gen p53 en la región correspondiente al dominio de unión a ADN de la proteína correspondiente (Sudakin, 2003; Li *et al.*, 1993) y esto parece ser más susceptibles a mutaciones mediadas por aflatoxinas que las bases cercanas (Aguilar *et al.*, 1993). AFB1 induce la transversión de la base G a la base T en la tercera posición del codón 249 y se han observado mutaciones similares en el carcinoma hepa-celular (HCC) en alimentos ricos en AFB1 en regiones del este de Asia y África (Li *et al.*, 1993; Gerbes y Caselmann, 1993; Mace *et al.*, 1997).

La epóxido hidrolasa y la glutatión-S-transferasa (GST) están involucradas en la desintoxicación hepática de AFB1 activado, pero se cree que la conjugación catalizada por GST de glutatión a AFB1-8,9-epóxido juega el papel más importante en la prevención de la unión del epóxido a macromoléculas como el ADN y diversas proteínas de las células (Sherratt y Hayes, 2001). El epóxido exo y endo también puede convertirse no enzimáticamente en AFB1-8,9-dihidrodiol, que a su vez puede sufrir lentamente una reacción de apertura del anillo catalizada por la base a un ion fenolato de dialdehído (Guengerich *et al.*, 1998). El dialdehído AFB1 puede formar bases de Schiff con residuos

de lisina en la albúmina sérica formando complejo de aflatoxina-albúmina (Sabbionni y Wild, 1991). También el dialdehído de aflatoxina se reduce a un dialcohol en una reacción catalizada dependiente de NADPH por la aflatoxina aldehído reductasa (AFAR) (Knight *et al.*, 1999). Sin embargo, la alquilación de guanina por aflatoxina B1 produce exo-8,9-epóxido que es la forma reactiva y un carcinógeno para el hígado y la reacción es más de 2000 veces más eficiente en el ADN que en la solución acuosa (Brown *et al.*, 2009).

3.7.4.2 Aflatoxinas y afectaciones en la salud

El estudio de aflatoxinas es de interés médico por su alta incidencia en alimentos, y porque su consumo en dosis bajas, medias o altas, causa tanto efectos tóxicos en corto tiempo (agudos), como aquellos que pudieran manifestarse a los meses o años (crónicos), siendo estos últimos los más comunes (Martínez *et al.*, 2013).

Experimentos realizados en animales han demostrado que las aflatoxinas pueden producir toxicidad aguda y crónica. Los efectos agudos incluyen necrosis hepática, nefritis, y congestión pulmonar. Los efectos crónicos incluyen daño celular, carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad en modelos animales (Bogantes *et al.*, 2004).

Las aflatoxinas ingeridas, que se absorben por el tracto gastrointestinal, son metabólicamente activadas o detoxificadas en las células de la mucosa intestinal y en el hígado, donde sufren una biotransformación por medio de procesos de epoxidación, hidroxilación, o-des-metilación, conjugación y procesos espontáneos (Bogantes *et al.*, 2004).

La aflatoxina B1 (AFB1) es considerada por la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC) como evidente cancerígeno en animales de experimentación, convirtiéndola en la aflatoxina de mayor importancia en la salud pública (Martínez *et al.*, 2013). Además de tener efectos teratogénicos y mutagénicos en humanos y animales (Das *et al.*, 2014).

3.7.4.3 Hongos aflatoxigénicos y aflatoxinas en maíz

Los hongos filamentosos destruyen alrededor del 10% de la cosecha mundial. Las especies de hongos que frecuentemente contaminan el sistema agropecuario pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Penicillium* y *Stachybotrys*. Con base al comportamiento epidemiológico de los mismos pueden clasificarse en “hongos de campo” y “hongos de almacén”, alrededor de 150 especies de hongos son los que afectan granos almacenados. En zonas de clima húmedo es en donde ocurren las mayores afectaciones (Sánchez *et al.*, 2009; Bonifaz, 2012).

Ahora bien, los hongos que frecuentemente contaminan el maíz son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, organismos potencialmente productores de micotoxinas. En México, aproximadamente el 60% del maíz total utilizado (importado y producido) está destinado al consumo humano, en contraste con solo el 4% en los EE. UU. Esta planta es nativa de México y no solo es destinada para consumo humano, sino también del ganado, además de que industrialmente es aprovechada (Martínez *et al.*, 2013). De acuerdo con SIAP (2018) en 2016 en México se produjeron 28,250,783.32 toneladas de maíz. El rendimiento, así como la calidad de este es limitado debido a factores bióticos y abióticos; tales como, enfermedades y plagas causadas por microorganismos, la condiciones de temperatura, humedad, del suelo, entre otros factores (Moreno y González, 2011).

Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus*, ambos pertenecientes a la sección Flavi, son las dos principales especies productoras de aflatoxinas; *Aspergillus flavus* es de las especies más frecuentemente aisladas en la agricultura y la medicina, la contaminación por aflatoxinas provoca importantes pérdidas anuales de cultivos a nivel internacional (Cleveland *et al.*, 2009; Sardiñas *et al.*, 2011; Nierman *et al.*, 2015). Estas especies contaminan numerosos productos alimenticios, incluidos cereales, pistachos, nueces y cacahuets, 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. Estas especies tienen diferentes perfiles toxigénicos: *A. flavus* produce aflatoxina B1 (excretada en la leche materna como M1) B2, ácido ciclopiazónico, aflatrem, ácido 3-nitropropiónico, sterigmatocystin, versicolorin A y

aspartoxina, mientras que *A. parasiticus* produce aflatoxina B1, B2, G1, G2 y versicolorin A (Sardiñas *et al.*, 2011).

Las aflatoxinas tienen un impacto económico y comercial, inclusive puede llegar a ocasionar pérdidas humanas y animales. La infección del maíz por *Aspergillus* durante la pre-cosecha puede reducir el volumen del cereal destinado al consumo animal y humano. Los reportes en México sobre la incidencia de aflatoxinas en granos y productos terminados hechos a base de maíz, se extiende en diversas regiones del país, pero quizá el caso más alarmante fue el reportado en Tamaulipas cuando en 1989 prácticamente toda la cosecha superaba los 100 µg/kg de aflatoxinas (Quezada *et al.*, 2011).

La producción de aflatoxinas en granos de maíz es favorecida por factores que ocurren durante el campo o en almacén. En campo, la producción de aflatoxinas se incrementa con el estrés hídrico, las altas temperaturas, daños a la planta hospedante producidos por insectos y ataque de plagas. En almacén, las condiciones de alta temperatura y humedad, aireación e inóculo primario proveniente del campo también son determinantes en el incremento de la síntesis de aflatoxinas en el grano de maíz (Martínez *et al.*, 2013).

3.7.4.4 Normatividad para aflatoxinas

Establecer reglamentos para las micotoxinas es una tarea compleja debido a que involucra diversos factores y partes interesadas. En la década de 1960 se establecieron los primeros límites para las micotoxinas, y estos fueron para las aflatoxinas. En 2003, aproximadamente 100 países ya tenían regulados límites para micotoxinas específicos, tanto para alimentos como para raciones (Van y Jonker, 2004)

Existen múltiples formas de aflatoxina, sin embargo, la B1 es la más prevalente en el maíz, y de acuerdo con la IARC se clasifica dentro del grupo 1 como sustancia cancerígena. Se estima que más de 55 millones de personas están expuestas a aflatoxinas en niveles no saludables. En países subdesarrollados, la regulación es difícil de aplicar, por lo que los

métodos de intervención para reducir la exposición humana se vuelven costosos y / o intensivos (Liu y Wu, 2010; Reese, 2010).

A nivel internacional, la Norma General del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos, comprende los niveles máximos de contaminantes y sustancias tóxicas naturales que se encuentran en los piensos en los casos en que el contaminante en los piensos puede ser transferido al alimento de origen animal y que pueden ser pertinentes para la salud pública (Codex Alimentarius, 2015). En la Imagen 2 se muestra los rangos y medias por regiones de los límites para las aflatoxinas totales en los alimentos (Van y Jonker, 2004).

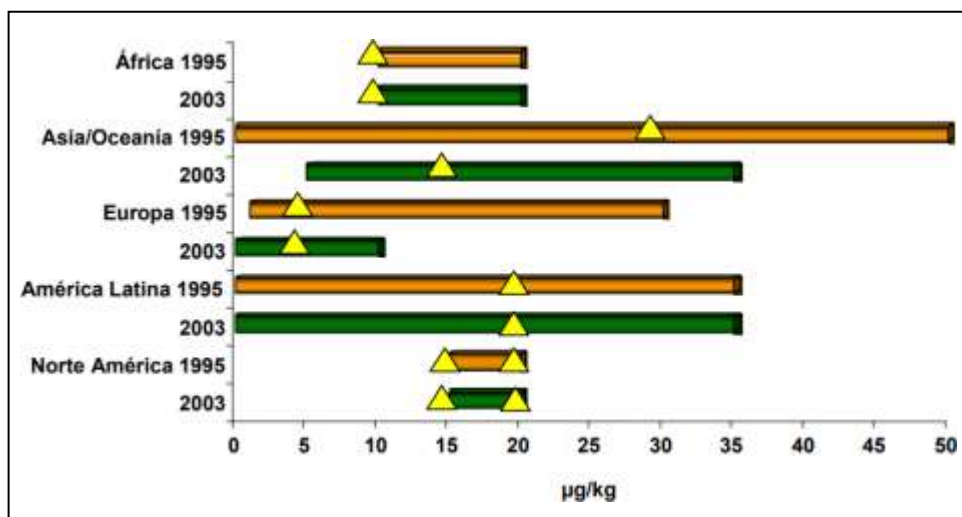


Imagen 2: Rangos y medias por regiones de los límites para las aflatoxinas totales en los alimentos

Fuente: Van y Jonker, 2004

En México la NOM-188-SSA1-2002 establece el nivel máximo de aflatoxinas permitido en los cereales destinados al consumo humano y animal, así como los requisitos sanitarios para el transporte y el almacenamiento de los productos; cuando los niveles de este metabolito son superiores a 20 µg/kg el cereal es destinado para consumo animal.

3.8 Hongos aflatoxigénicos-Aflatoxinas-Ambiente

En la Imagen 3 se puede observar la interacción que se llevan a cabo entre los hongos aflatoxigénicos, las aflatoxinas, el ambiente, y como esta interacción puede repercutir sobre la salud humana y animal.

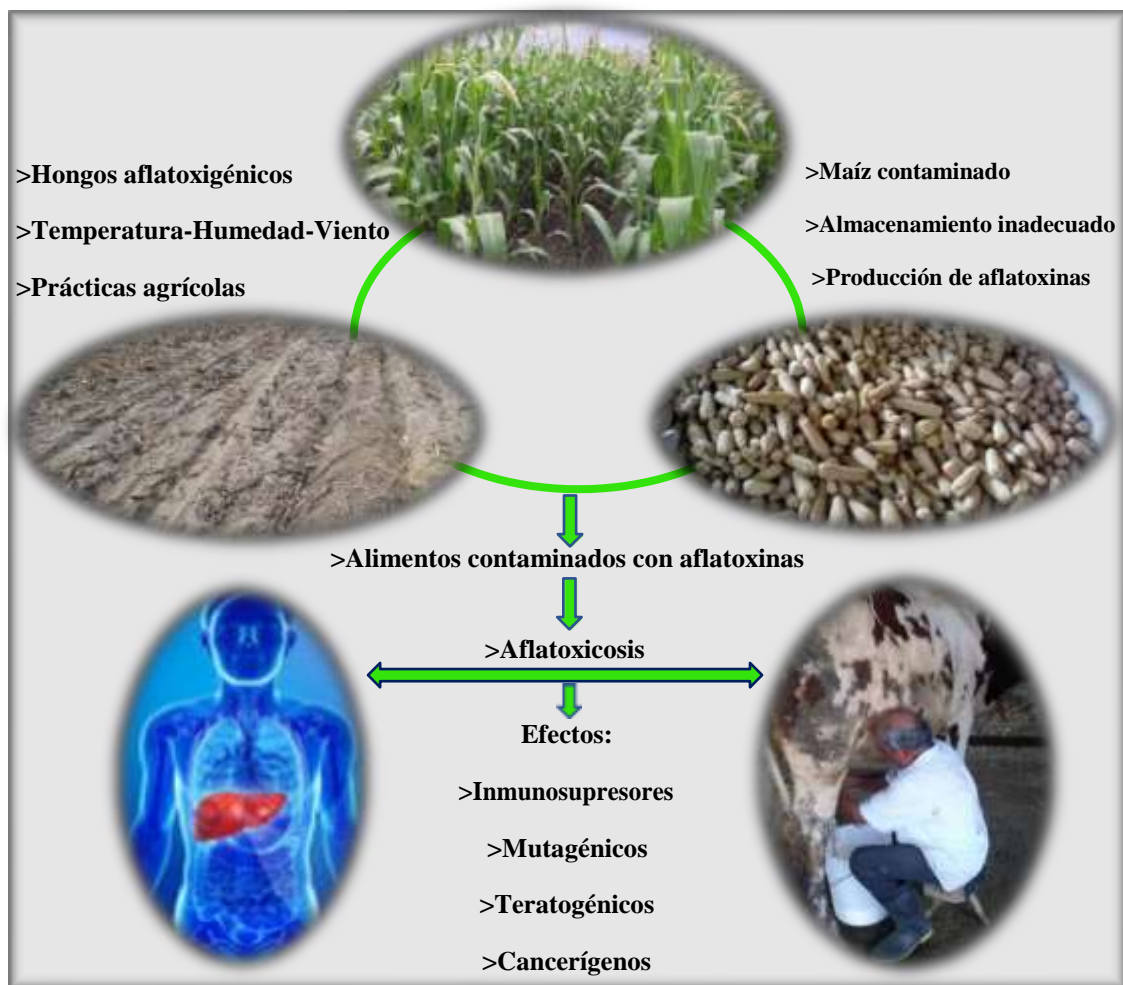


Imagen 3: Interacción hongos aflatoxigénicos/aflatoxinas-ambiente-hombre/animal

Fuente: Propia

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la condición del suelo destinado al cultivo de maíz y granos de maíz criollo almacenado en relación con hongos potencialmente aflatoxigénicos y, es el maíz susceptible a contaminación por aflatoxinas totales, en sitios de Puebla (San Salvador el Seco y la Junta Auxiliar la Resurrección) y Tlaxcala (Tlaltepango y Nativitas)?

IV. HIPÓTESIS

Los suelos destinados al cultivo de maíz y granos de maíz criollo almacenado están contaminados con hongos potencialmente aflatoxigénicos, asimismo, este cereal es susceptible a contaminación por aflatoxinas totales, en sitios de Puebla (San Salvador el Seco y la Junta Auxiliar la Resurrección) y Tlaxcala (Tlaltepango y Nativitas).

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la presencia y distribución de hongos aflatoxigénicos en suelo agrícola y maíz almacenado, así como la contaminación por aflatoxinas totales en maíz almacenado, en sitios de Puebla (San Salvador el Seco y la Junta Auxiliar la Resurrección) y Tlaxcala (Tlaltepango y Nativitas).

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (hongos potencialmente productores de aflatoxinas) en suelo agrícola destinado al cultivo de maíz y maíz criollo almacenado en sitios de Puebla y Tlaxcala.
2. Analizar la presencia de aflatoxinas totales en muestras de maíz almacenado a la intemperie.
3. Monitorear la presencia de otros hongos filamentosos en suelo agrícola destinado al cultivo de maíz, así como la presencia de estos en este cereal.

VI. DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

Para la realización de este trabajo fue necesario recolectar muestras de suelo agrícola destinado al cultivo de maíz, así como, maíz criollo de almacenes a la intemperie de sitios de Puebla (San Salvador el Seco y Junta Auxiliar la Resurrección) y Tlaxcala (Tlaltepango y Nativitas), se escogieron estos sitios de muestreo debido a las características socioambientales que comparten y porque se permitió tener acceso a los mismos.

En la fase de campo las muestras se recolectaron usando como referencia la NOM-021-SEMARNAT-2000 en el caso de suelo agrícola y la NOM-188-SSA1-2002, para la recolección de muestras de maíz. Se recolectaron un total de 147 muestras, 67 de suelo agrícola y 80 de maíz criollo almacenado (mazorcas y granos), en dos muestreos realizados el primero en enero y el segundo en agosto de 2017. El muestreo de suelo agrícola (Imagen 4) y maíz almacenado se realizó tipo z, obteniéndose muestras representativas con base a la dimensión del terreno.



Imagen 4: Muestreo de suelo agrícola tipo Z

Fuente: Propia

En la fase de laboratorio las muestras obtenidas se analizaron en el “Laboratorio de Micología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas –ICUAP”.

7.1 Aislamiento e identificación fenotípica de cepas aflatoxigénicas

Para el aislamiento de cepas aflatoxigénicas se tamizó el suelo agrícola y posteriormente se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000; también para el procesamiento de muestras de maíz se realizaron las diluciones, solo que, estas últimas se molieron hasta obtener un polvo fino; las últimas dos diluciones se inocularon en agar dextrosa Sabouraud y fueron incubadas a una temperatura de 28 ± 2 0C durante un período de 4 a 7 días, con la finalidad de aislar cepas presuntivas de estos hongos potencialmente aflatoxigénicos. 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 de *A. flavus* y *A. parasiticus* se les realizó la técnica de microcultivos, esta técnica permite la correcta identificación de estructuras fúngicas. Posteriormente se realizó la identificación macromorfológica y micromorfológica usando claves taxonómicas especializadas; las cepas presuntivas de *A. flavus* y *A. parasiticus* se inocularon en el medio diferencial AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* agar) (SIGMA-ALDRICH) el cual nos permitió corroborar estas especies, ya que en ambos casos se produce una coloración naranja amarillenta al reverso de la colonia.

7.2 Caracterización molecular de cepas de potencialmente aflatoxigénicas

A las cepas presuntivas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se les realizó PCR y posteriormente se enviaron a secuenciar.

Para la obtención de ADN, se utilizó el kit de aislamiento de ADN de plantas (sistema de cuentas magnéticas) suministrado por NORGEN, a partir de la extracción realizada del micelio de las cepas de *Aspergillus flavus*. Una vez obtenido el ADN del hongo se hizo la

amplificación de la secuencia parcial del gen *benA* (beta-tubulina). Esto se llevó a cabo mediante el procedimiento reportado por Glass y Donaldson (1995). Inicialmente en un volumen final de 25 µL de reacción, se emplearon: 10 ng de ADN genómico, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (Applied Biosystems Inc.), 1 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems Inc.) y 30 pmol de cada oligonucleótido Bt2a (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3'). La amplificación se realizó en un termociclador (ESCO, Swift Maxi) usando el programa: 95 0C por 8 min, 35 ciclos de 95 0C por 15 s, 58 0C por 20 s y 72 0C por 1 min, y un ciclo de 72 0C por 5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed (10000X) (Biotium). El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 100 V, en amortiguador TBE 0.5X. Como marcador de pares de bases se usó Ladder de 100 pb (Applied Biosystem Inc.). Las imágenes de los geles se capturaron en un fotodocumentador GelDoc TM XR (Bio-Rad).

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados con el gen *benA* de los aislados de *Aspergillus flavus* se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Macrogen USA (Rockville, USA).

7.3 Evaluación de la presencia de aflatoxinas totales en muestras de maíz almacenado

Para determinar la contaminación por aflatoxinas totales en muestras de maíz se utilizó un kit de ELISA competitivo directo de fase sólida, siguiendo la siguiente metodología.

Preparación de las muestras: se preparó la solución de extracción (metanol al 70%), una vez hecha la preparación la muestra se molió hasta obtener el tamaño de partícula del café instantáneo fino, posteriormente se peso 1g de la muestra y se añadieron 5ml del disolvente de extracción se mezcló agitando durante 2 minutos aproximadamente, la mezcla se dejó reposar hasta que precipitó, seguido de esto se filtró través de un papel de filtro Whatman # 1, el filtrado obtenido se analizó como se menciona a continuación.

Análisis del filtrado obtenido a partir de la muestra: de acuerdo con las muestras analizadas se colocaron 200 μL del conjugado aflatoxina-HRP dentro de cada pozo de dilución, se agregaron 100 μL de cada patrón y muestra al pocillo de dilución apropiado que contenía el conjugado, se mezcló con la pipeta 3 veces y se transfirieron 100 μL de contenido de cada pocillo de dilución a un correspondiente pocillo de microtitulación recubierto con anticuerpo, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se decantó el contenido de los micropocillos en una cubeta de desecho. Los micropocillos se lavaron 5 veces llenando cada uno con tampón de lavado PBS-Tween, posteriormente se eliminó el tampón residual, se añadieron 100 μL de reactivo sustrato a cada micropocillo y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de esto se añadieron 100 μL de la solución de paro. Finalmente se hizo la lectura de la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con un lector de placas de microtitulación usando un filtro de 450 nm. Las concentraciones fueron calculadas por extrapolación de la DO con la respectiva curva de calibración, la cual se construyó a partir de las siguientes concentraciones: 1, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

7.4 Identificación de otros hongos filamentosos

Se realizó la misma metodología llevada a cabo para el aislamiento e identificación fenotípica de cepas aflatoxigénicas, sólo que, para la identificación de otros hongos filamentosos no se utilizó el medio deferencial AFPA.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el trabajo de investigación se realizaron dos muestreos, uno en enero y otro en agosto del 2017, en dos sitios del estado de Puebla (San Salvador el Seco y la Junta Auxiliar la Resurrección) y de Tlaxcala (Tlaltepango y Nativitas), en los cuales se recolectaron un total de 147 muestras, 67 de suelo agrícola y 80 de maíz almacenado (mazorcas y granos), en el Gráfico 1 se muestra el número de muestras recolectadas en cada sitio y mes de muestreo. Es importante mencionar que durante el primer muestreo de suelo agrícola se muestrearon 2 terrenos agrícolas destinados al cultivo de maíz tanto en la localidad de San Salvador el Seco (SSS) y La Junta Auxiliar la Resurrección (JAR), ambos sitios pertenecientes al estado de Puebla, mientras que, sólo se muestreo un terreno agrícola en Tlaltepango (TLA) y Nativitas (NAT), ambos sitios de Tlaxcala, y, durante el segundo muestreo se tuvo acceso a los mismos sitios muestreados en el mes de enero, muestreándose un terreno agrícola más en el sitio de Tlaltepango, por esto tal como se observa en el Gráfico 1, durante el segundo muestreo se obtuvieron más muestras en este sitio. Cabe mencionar que los agricultores propietarios de los sitios muestreados eran los mismos en cada localidad, por esto, sólo se muestreo un almacén en cada localidad durante los dos muestreos, ya que, todo el maíz recabado durante la cosecha lo almacenan en un solo almacén.

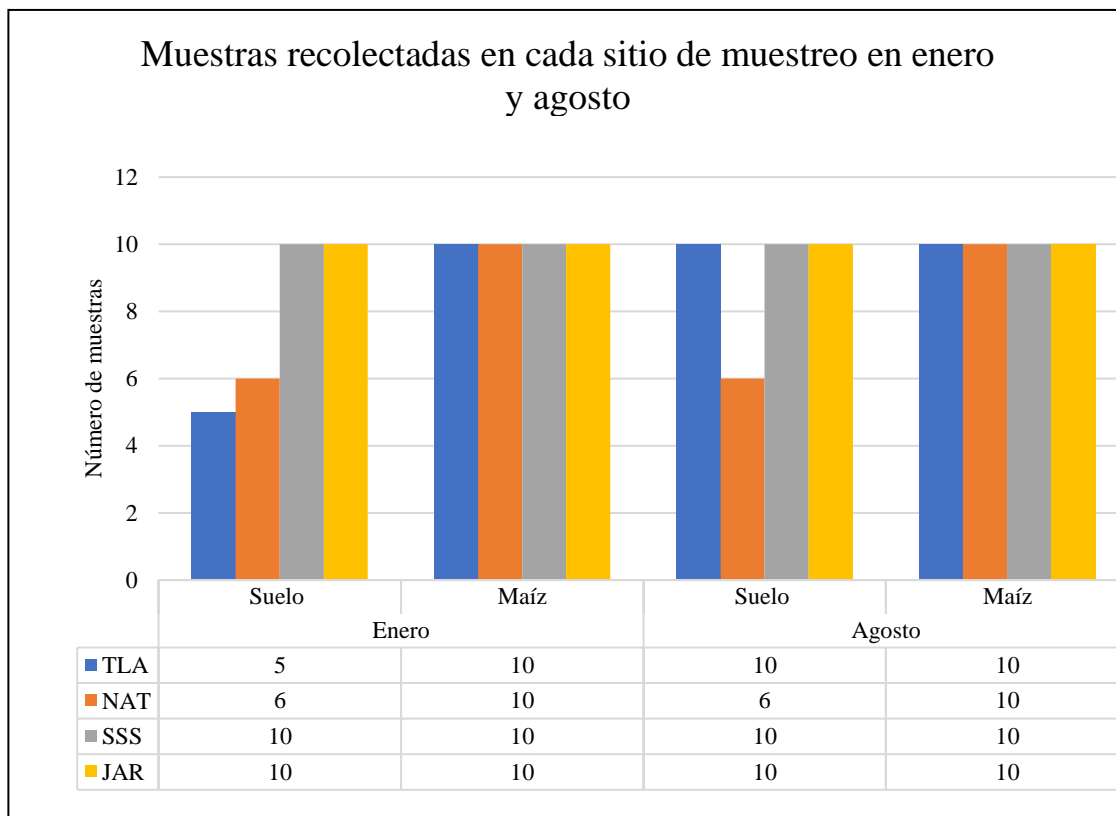


Gráfico 1: Muestras recolectadas en cada sitio de muestreo en enero y agosto

TLA: Tlaltepango; NAT: Nativitas; SSS: San Salvador el Seco; JAR; Junta Auxiliar la Resurrección

En cuanto a las condiciones socio ambientales que presentan los sitios de muestreo se describen en la Tabla 2, como se puede observar NAT comparte el mismo tipo de suelo que SSS, JAR y TLA, además el clima que presentan es templado subhúmedo en 3 de los sitios y SSS es el que difiere ya que el clima que presenta es semiseco templado, mientras que el rango de temperatura no varía por mucho entre un sitio y otro, y por último la precipitación es la misma por un lado para TLA y NAT, y por otro para JAR y SSS, este último presentando un alto grado de marginación.

Tabla 2: Características socioambientales de los sitios muestreados

Características socio-ambientales	SSS	JAR	TLA	NAT
Tipo de suelo	>Regosol >Litosol	>Regosol >Fluvisol	>Regosol >Fluvisol >Andosol	>Regosoles >Fluvisoles >Andosoles >Litosoles
Clima	Semiseco templado	Templado subhúmedo	Templado subhúmedo	Templado subhúmedo
Rango de temperatura	13-15 °C	10-16 °C	12-16 °C	14-16 °C
Precipitación	300-900 mm	400-900 mm	800-1000 mm	800-1000 mm
Zona	Rural	Rural	Urbana	Rural
Grado de marginación	Alto	Medio	Medio	Medio

TLA: Tlaltepango; NAT: Nativitas; SSS: San Salvador el Seco; JAR; Junta Auxiliar la Resurrección

Como se puede ver en Gráfico 2, en los sitios de muestreo pertenecientes al estado de Puebla, San Salvador el Seco y la Junta Auxiliar la Resurrección, se recolectaron 20 muestras tanto de suelo agrícola como de maíz almacenado, mientras que, en los sitios pertenecientes a Tlaxcala, Tlaltepango y Nativitas, se recolectaron 15 y 12 muestras de suelo respectivamente, y 20 muestras de maíz en ambos sitios.

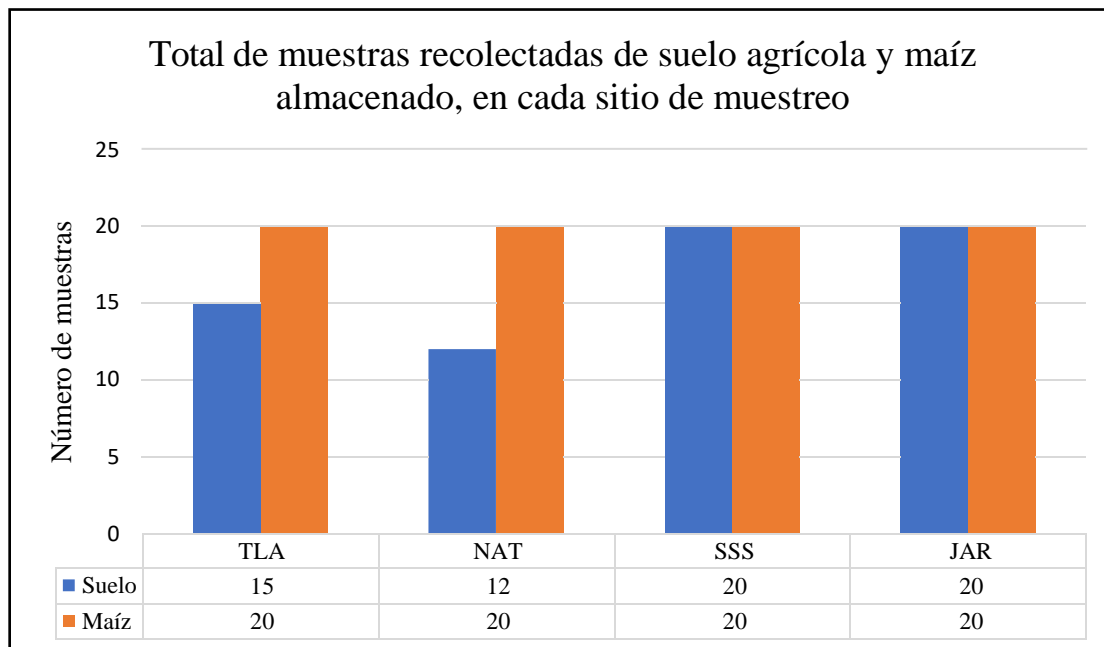


Gráfico 2: Total de muestras recolectadas de suelo agrícola y maíz almacenado, en cada sitio de muestreo

TLA: Tlaltepango; NAT: Nativitas; SSS: San Salvador el Seco; JAR; Junta Auxiliar la Resurrección

El número de muestras recolectadas en los sitios dependió como ya se había mencionado del acceso que se tuvo y del número de terrenos agrícolas muestreados en cada sitio, aunque como se puede observar no hubo mucha variación en cuanto al número de muestras recabadas.

8.1 Identificación fenotípica de especies aflatoxigénicas

A través de características macromorfológica y micromorfológica (Imagen 5, respectivamente), usando claves taxonómicas especializadas, durante la realización de este trabajo de investigación sólo se identificaron especies de *Aspergillus flavus* en suelo agrícola destinado al cultivo de maíz y en granos de maíz criollo almacenado a la intemperie, en los cuatro sitios de muestreo. A demás, las cepas positivas a las

características morfológicas de *A. flavus* se sembraron en el medio diferencial AFPA, para tener certeza de que se trataba de esta especie, ya que, las cepas de este hongo producen una pigmentación naranja amarilla al reverso de la colonia (Imagen 6),

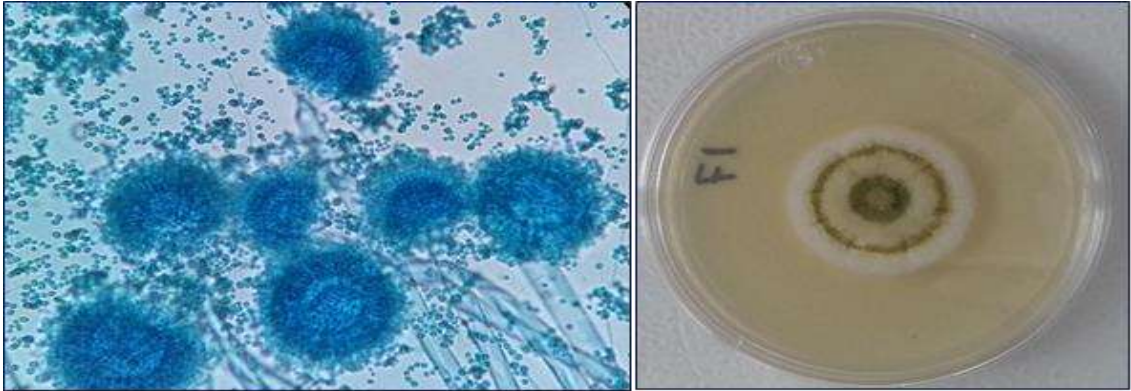


Imagen 5: Características macromorfológica (derecha) y micromorfológica (izquierda) de Aspergillus flavus

Fuente: Propia, 2017

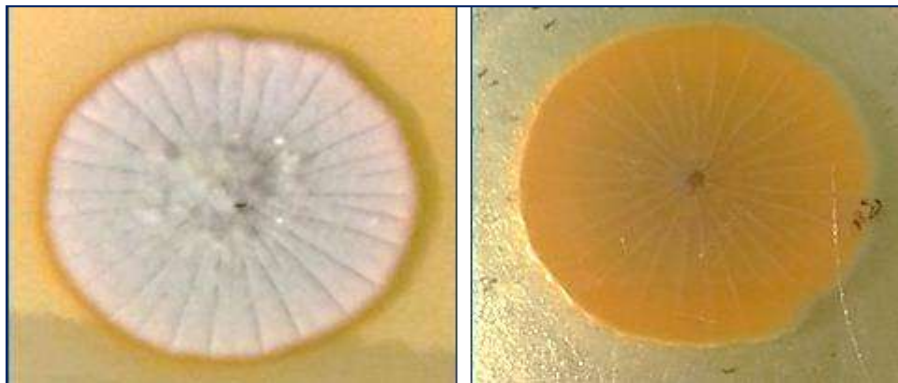


Imagen 6: Anverso y reverso de la colonia de Aspergillus flavus en medio diferencial AFPA

Fuente: Propia, 2017

Okoth *et al.* (2012) también reportan aislamientos de *Aspergillus flavus* sembrados en AFPA los cuales produjeron la coloración amarillo-anaranjada al reverso de la colonia. La contaminación por este hongo potencialmente aflatoxigénico en estos sustratos (suelo agrícola y maíz) representa una constante amenaza en la salud humana y animal en los sitios donde se llevó a cabo el muestro porque las cosechas son destinadas para autoconsumo de las familias de los agricultores o bien se comercializan en la región; por lo tanto, la presencia de estas especies altamente aflatoxigénicas compromete el acceso a alimentos nutritivos y culturalmente adecuados derivados de este cereal (maíz).

Se aislaron un total de 43 cepas de *Aspergillus flavus*, tal como se muestra en el Gráfico 3, obteniéndose 18 aislamientos en suelo agrícola y 25 en muestras de maíz. La presencia de este hongo en suelo coincide con lo reportado por Meareg y Nancy (2014), y por Arias y Piñeros (2008), quienes aislaron cepas de *A. flavus* en muestras de suelo, el principal reservorio de este hongo, la presencia de este hongo filamentoso en este sustrato representa un riesgo debido a que actúa como patógeno afectando una amplia gama de cultivos agrícolas que incluye dicotiledóneas y monocotiledóneas (Cleveland *et al.*, 2009), dentro de esta última se encuentra el maíz.

Por otro lado, la presencia de *A. flavus* en maíz coincide con lo reportado por Arrúa *et al.* (2012) quienes también aislaron cepas de este hongo en muestras de maíz; este moho al ser potencialmente aflatoxigénico, y al no tener las condiciones de almacenamiento adecuadas en donde se controle la temperatura y humedad, podría ser un factor determinante para la producción de aflatoxinas, metabolitos secundarios tóxicos implicados ampliamente en el cáncer hepático (Bbosa *et al.*, 2013).

Además, como se puede observar en SSS se obtuvieron un menor número de aislamientos de estas especies aflatoxigénicas esto puede deberse al clima que ahí se presenta el cual es semiseco templado, y, aunque *Aspergillus* es un hongo cosmopolita que puede encontrarse en diversos climas, el clima que favorece su proliferación es el húmedo de acuerdo con Sánchez *et al.*, 2009 y a Bonifaz, 2012, clima que se presenta en los demás sitios muestreados, con estos resultados se pone de manifiesto que el clima es un factor

que contribuye a la proliferación de hongos aflatoxigénicos y en este estudio en particular en la producción de *Aspergillus flavus*, única especie aflatoxigénica aislada en los sitios muestreados.

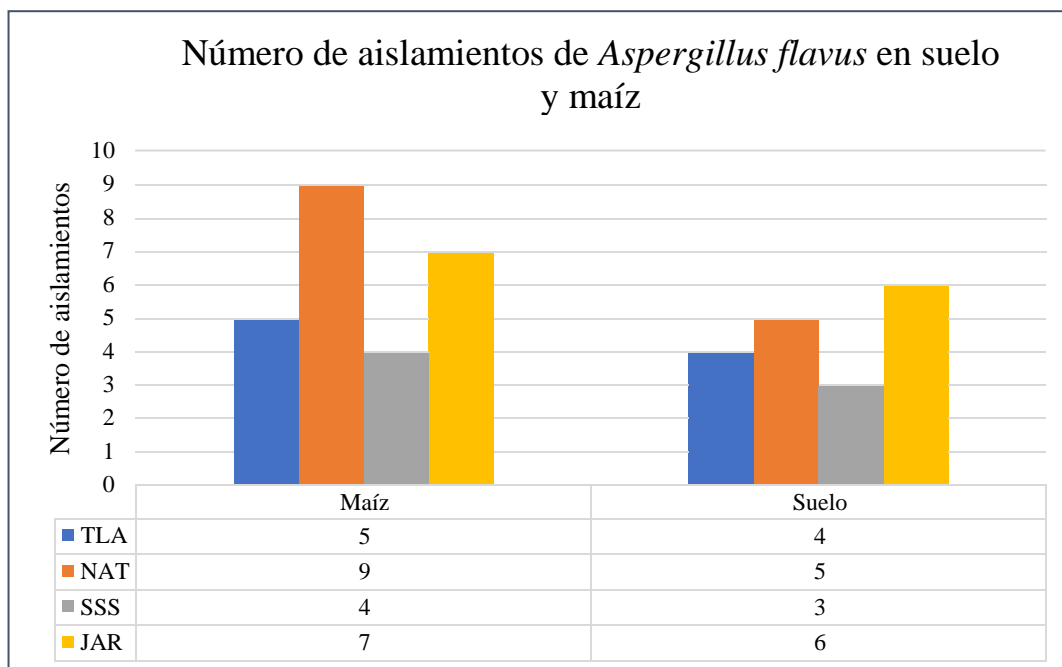


Gráfico 3: Número de aislamientos de *Aspergillus flavus* en suelo y maíz

TLA: Tlaltepango; NAT: Nativitas; SSS: San Salvador el Seco; JAR; Junta Auxiliar la Resurrección

De acuerdo a Díaz (1996) uno de los constituyentes de la microflora del suelo es *Aspergillus flavus*, además, al ser un hongo cosmopolita puede encontrarse en áreas tropicales, subtropicales o templadas, esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que, en el suelo agrícola de los cuatro sitios de muestreo se identificó la presencia de este hongo potencialmente aflatoxigénico. Se obtuvieron un mayor número de aislamientos de especies de *Aspergillus flavus* en muestras de maíz, más del 50%, en comparación con los aislamientos obtenidos en suelo, tal como se muestra en el Gráfico 4, esto se justifica con lo reportado por Rodríguez *et al.* (1993), que mencionan que la contaminación por este

hongo puede iniciar durante la fase de campo e incrementar durante la fase de almacenamiento, si no se tienen las condiciones de almacenamiento adecuadas, por ejemplo si no se tiene un control de la temperatura, si los granos contaminados no son retirados estos pueden contaminar a otros, si hay poblaciones de insectos o ácaros pueden dañar los granos haciéndolos más susceptibles a ser contaminados; estos factores pudieron influir en que en el maíz se presentara una mayor contaminación por este hongo, debido a que, en los sitios de muestro los lugares destinados al almacenamiento del maíz eran a la intemperie.

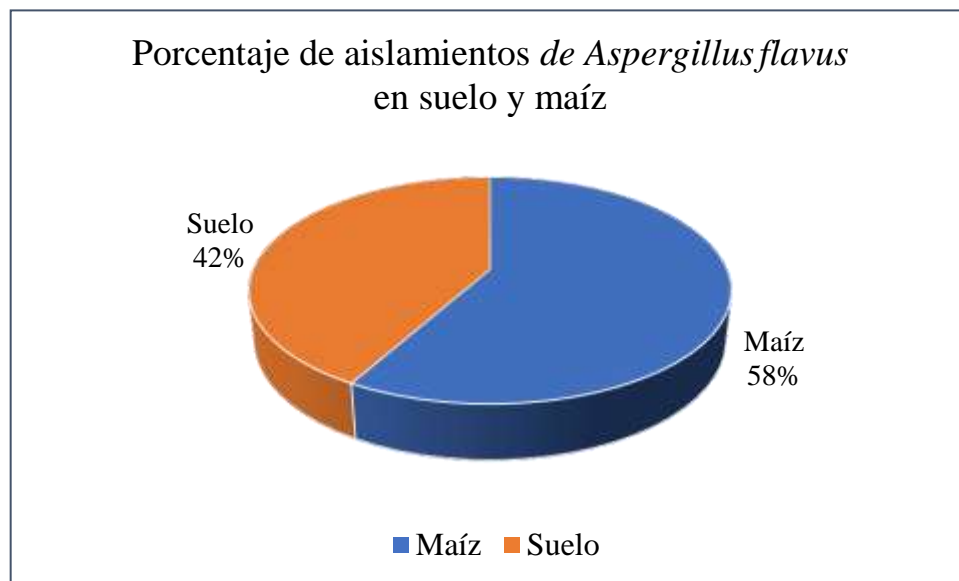


Gráfico 4: Porcentaje de aislamientos de *Aspergillus flavus* en suelo agrícola y maíz almacenado

8.2 Identificación molecular de *Aspergillus flavus*

De las 43 cepas obtenidas de *Aspergillus flavus* a 7 de estas se les realizó PCR, para la amplificación se utilizó el gen β -tubulina, debido a que en estudio realizado por Garzón (2013) se demostró que en la identificación molecular de *Aspergillus flavus* usando la región amplificada con β -tubulina se muestran mejores resultados, ya que, a esta especie

la ubica dentro del árbol filogenético en el clado de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* que comparten la sección "flavi", mientras que en el árbol realizado con la amplificación de regiones ITS queda ubicado fuera de este clado.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose el siguiente corrimiento electroforético (Imagen 7), demostrándose que el gen β -tubulina es un marcador de amplificación adecuado para especies de *Aspergillus flavus*.

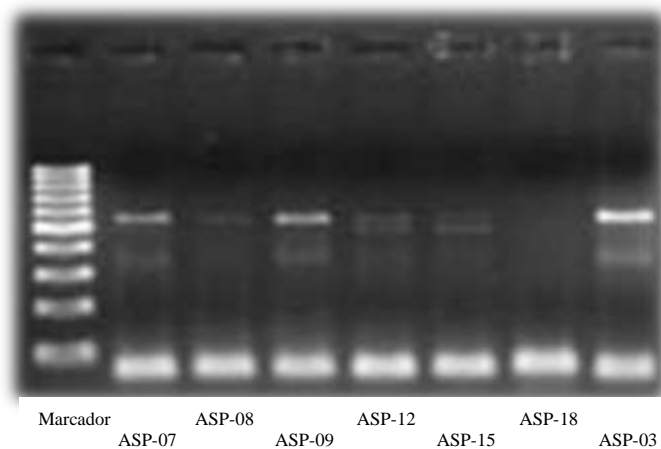


Imagen 7: Corrimiento electroforético de las regiones amplificadas de cepas de *A. flavus*.

Fuente: Propia

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados con el gen β -tubulina de los aislados de *Aspergillus flavus*, se enviaron a secuenciar a MacroGen USA (Rockville, USA). Las secuencias se editaron en el programa BioEdit 7.0.5.3, obteniéndose las siguientes secuencias (Tabla 3).

Las secuencias 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). Todas las

secuencias presentaron valores de E(S) (E-value) $\leq 0,001$, que de acuerdo con Sebastian (2014) son habitualmente suficientes para considerar que el alineamiento de dos secuencias no es fruto del azar sino de la homología. Los resultados obtenidos en el BLAST se reportan en la Tabla 3.

Como se puede observar en la Tabla 4 el porcentaje de Identidad (Ident) el cual mide el grado en el que dos secuencias son invariantes, es alto entre el 95 y 99%.

Con los datos obtenidos se corrobora que los aislamientos obtenidos son cepas de *Aspergillus flavus*, hongo potencialmente aflatoxigénico. Es importante la identificación molecular ya que esta información aunada a la identificación fenotípica nos da la certeza de que se trata de esta especie, la cual es importante debido a los efectos que genera en la salud humana y animal.

Tabla 3: Secuencias de cepas de *Aspergillus flavus* editadas en BioEdit versión 7.0.5.3.

CLAVE DE LA CEPA	SECUENCIA
ASP-07	1 CACGGCCTTG ACGGCTCCGG TGTGTAAGTA CAGCCTGTAT ACACCTCGAA CGAACGACGA 61 CCATATGGCA TAAAAAGTTG GAATGGATCT GACGGCAAGG ATAGTTACAA TGGCTCCTCC 121 GATCTCCAGC TGGAGCGTAT GAACGTCTAC TTCAACGAGG TGCGTACCTC AAAAATTCAG 181 CATCTATGAA AACGCTTTGC AACTCCTGAC CGCTTCTCCA GGCCAGCGGA AACAAAGTATG 241 TCCCTCGTGC CGTCTCGTT GATCTTGAGC CTGGTACCAT GGACGCCGTC CGTGCCGGTC 301 CCTTCGGACA GCAGAAACCG TCCCACAAC TTCGTTTTTC GCCAGTCCGG TGCTGGTAAC 361 AACTGGGCCA AGGGTCACTA CACTGAGGGT
ASP-08	1 CGAGTTAGTA TGCTTTGGAC CAAGGAACTC CTCAAAAGCA TGATCTCGGA TGTGTCTGT 61 TATATCTGGC ACATGTTTGC TAACAACTTT GCAGGCAAAC CATCTCTGGC GAGCACGGCC 121 TTGACGGCTC CGGTGTGTAA GTACAGCCTG TATACACCTC GAACGAACGACGACCATATG 181 GCATTAGAAG TTGGAATGGA TCTGACGGCA AGGATAGTTA CAATGGCTCC CCCCCTCCG 241 TCAGGGGGAC
ASP-09	1 GACGAGAGGC ACGAGGGAGT AGTTGGGGGG GCTGGGATGG AGAAGCGGTC AGGAGTTGAA 61 AAGCGTTTC TTAGATGCTG AAATTTTGGAG GTACGCACCT CGTTGAAGTA GACGTTCCATA 121 CGCTCCAGCT GGAGATCGGA GGAGCCATTG TAACTATCCT TGCCGTCAGA TCCATTCCAA 181 CTTCTAATGC CATATGGTCG TCGTTCTGTT GAGGTGTATA CAGGCTGTAC TTACACACCG 241 GAGCCGTCAA GGCCGTGCTC GTCAGAGATG GTTTGCCTGC AAAATTGTTA GCAAACATGT 301 GGCAGATATA ACAGGACACA TCCGATATTA TGCTTTTGGAG GATTCCCTTG GTCCAAANCA 361 CACTAACTCG
ASP-12	1 GTTGTCCGGG CGGAGAGCTG ACCGAGGGAC CGGCACGGAC GGCGGACCAT GGTACCAGGC 61 TCAAGATCAA CGAGGACGGC ACGAGGGACA TACTTGTTTC CGCTGGCCTG GAGAAGCGGT 121 CAGGAGTTGC AAAGCGTTTT CATAGATGCT GAAATTTTGA GGTACGCACC TCGTTGAAGT 181 ACACGTTTAT ACGTCCAGC TGGAGATCGG AGGAGCCATT GTAACATATC TTGCCGTCAG 241 ATCCATTCCA ACTTCTAATG CCATATGGTC GTCGTTCTGT CGAGGTGTAT ACAGGCTGTA 301 CTTACACACC GGAGCCGTC AAGCCGAGCT CGACAGAGAT GGTTTGACTG CAAATTTGTT 361 ACCAACTATG TGGCAGATAT AACAGGACAC
ASP-15	1 AGTGTGTTGCT AACAACTTTG CAGGCAAACC ATCTGTGGCG AGAACGGCCTTGACGGCTCC 61 GGTGTGTAAG TACAGCCTGT ATACACCTCG AACGAACGAC GACCATATGGCATTAGAAAGT 121 TGGAAATGGAT CTGACGGCAA GGATAGTTAC AATGGCTCCT CCGCCCCCCT GCTGGAGCGT 181 ATGAACGTCT ACTTCAACGA GGTGCGTACC TCAAAATTTT AGCATCTATG AAAACGCTTT 241 GCAAATCCTG ACCGCTTCTC CAGGCCAGCG GAAACAAGTA TGTCCCTCGT GCCGTCCTCG 301 TTGATCTTGA GCCTGGTACC ATGGACGCCG TCCGTGCCGG TCCCTTTGGT CATTCTTCT 361 TTCCCAGCAA TTTCGTTTTT GGCCAATCCG GTGCTGGTAA CATCTGGGCC AAGGGTCACT
ASP-18	1 GGAGCCGCTG GCTGAAAACG GTCAGAGTTG CAAAGCGTTT TCATAGATGC TAAAATTTTG 61 AGGTACGCAC CTCGTTGAAG TAGACGTTCA TACGCTCCAT CTGGAGATCG GAGGAGCCAT 121 TGTAACATC CTTGCCGTC GATCCATTCC AACTTCTAAT GCCATATGGT CGTCGTTCTG 181 TCGAGGTGTA TACAGGCTGT ACTTACACAC CGGAGCCGTC AAGGCCGTGC TCGCCAGAGA 241 TGGTTGCCT GCAAAGTTGT TAGCAAACAT GTGGCAGATA TAACAGGACA CATCCGAGAT 301 CATGCTTTTG AGGAGTTCT TGGTCCAAAG CATACTAACT CGGGGGCATT GAAACATACC 361 AAAAAGCAAC
ASP-03	1 AGTTGTCGGG ACGGAGAGCT GACCGAAGGG ACCGGCACGG ACGGCGTCCA TGGTACCAGG 61 CTCAAGATCA ACGAGGACGG CACGAGGGAC ATACTTGTTT CCGCTGGCCT GGAGAAGCGG 121 TCAGGAGTTG CAAAGCGTTT TCATAGATGC TAAAATTTTG AGGTACGCAC CTCGTTGAAG 181 TAGACGTTCA TACGCTCCAG CTGGAGATCG GAGGAGCCAT TGTAACATC CTTGCCGTC 241 GATCCATTCC AACTTCTAAT GCCATATGGT CGTCGTTCTG TCGAGGTGTA TACAGGCTGT 301 ACTTACACAC CGGAGCCGTC AAGGCCGTGC TCGCCAGAGA TGGTTGCTT GCAAAGTTGT 361 TAGCAAACAT GTGGCAGATA TAACAGGANA CATCCGAGAT CATGCTTTTG AGGAGTTCT 421 TGGTCCAAAG CATACTAACT CGAAGGCATT GAACACATAC CAAAAAGCAA CATCGATTG 481 ATTCCC

Fuente: Propia

Tabla 4: Valores E-value y de Identidad, obtenidos en BLASTN 2.8.0

CLAVE CEPA	E-value	Identidad
ASP-07	9e-74	96%
ASP-08	2e-68	99%
ASP-09	7e-60	95%
ASP-12	7e-45	96%
ASP-15	4e-67	95%
ASP-18	3e-73	98%
ASP-03	3e-74	98%

ASP: Cepa de *Aspergillus flavus*

8.3 Determinación de aflatoxinas totales en maíz

Se determinó la presencia de aflatoxinas totales en 40 muestras de maíz. Para determinar la concentración de este metabolito en las muestras, se construyó una curva de calibración mediante regresión lineal con los estándares de aflatoxinas totales a diferentes concentraciones. La curva se muestra en el Gráfico 5, en donde puede observarse un ajuste con un valor de R^2 de 0.9727. Los resultados del análisis de las muestras de maíz se muestran en la Tabla 5.

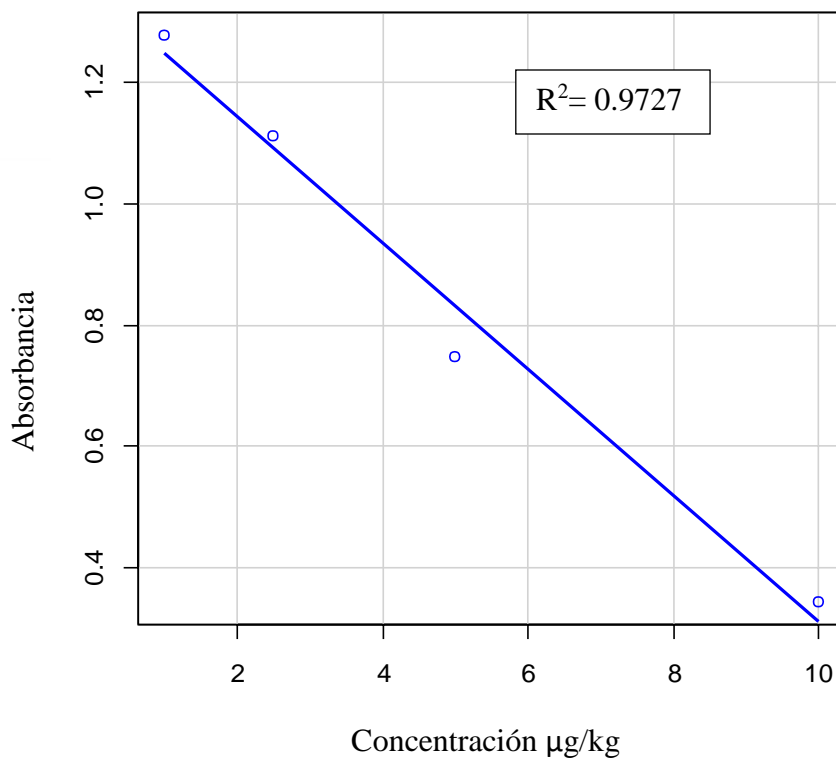


Gráfico 5: Curva de calibración, concentraciones de aflatoxinas totales 1, 2.5, 5 y 10 µg/kg de maíz.

Fuente: R versión 3.5.1, 2018

Como el valor de R^2 es cercano a 1, podemos entonces predecir los valores de las concentraciones de aflatoxinas totales presentes en la muestra a partir de los valores de la absorbancia obtenidos durante el análisis de estas, y confirmar de esta manera si las muestras de maíz analizadas son susceptibles a contaminación por aflatoxinas totales y cuáles son las concentraciones de este metabolito contaminante en las muestras. Y así confirmar o rechazar la hipótesis de que las muestras son susceptibles a contaminación por este metabolito.

Tabla 5: Concentración de aflatoxinas totales en maíz

Cepas	Absorbancia	Concentración µg/kg	Cepas	Absorbancia	Concentración µg/kg
2S-M5	0.765	5.637	2N-M4	0.645	8.239
2J-M5	0.985	3.516	2T-M2	0.495	6.215
2N-M5	0.86	4.721	1S-M9	0.705	*10.552
1T-M10	0.76	5.685	2J-M1	0.255	1.589
2T-M5	0.915	4.191	2N-M1	1.185	4.191
2S-M1	0.388	**9.27	1J-M6	0.915	8.769
2S-M4	0.975	3.613	2T-M1	0.44	5.203
2J-M4	0.423	8.933	1J-M10	0.81	**9.328
1N-M10	0.525	7.95	1N-M9	0.382	6.649
1T-M9	0.72	6.07	1J-M8	0.66	**9.637
2T-M4	0.408	**9.078	1T-M7	0.35	6.553
1S-M10	0.12	*11.854	1S-M8	0.67	8.384
2S-M3	0.935	3.998	1J-M9	0.48	6.89
2J-M3	1.09	2.504	1N-M8	0.635	7.227
2N-M3	0.975	3.613	1S-M7	0.6	**9.107
1N-M6	0.71	6.167	1T-M6	0.405	5.203
2T-M3	1.08	2.601	1S-M6	0.81	6.408
2S-M2	0.67	6.553	1J-M7	0.685	7.468
2N-M2	1.04	2.986	1N-M7	0.575	6.167
2J-M2	0.71	6.793	1T-M8	1.13	2.119

Concentraciones de aflatoxinas totales: * superiores a 10 µg/kg de maíz; ** cercanas a 10 µg/kg de maíz

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en todos los casos se reporta la presencia de algún tipo de micotoxina y en un porcentaje alto de las muestras analizadas, en este estudio realizado, se puede ver en la Tabla 4 que todas las muestras presentaron contaminación por

aflatoxinas totales (AFB₁, AFB₂, AFB₃, AFB₄), la media de las concentraciones de aflatoxinas totales presentes en las muestras analizadas es 6.3 µg/kg de maíz, en 2 de estas la concentración es superior a 10 µg/kg y en 5 cercana a esta concentración, aunque ninguna rebasa la NOM-188-SSA1-2002 si se hace la comparación con normas europeas, estas concentraciones son superiores a lo permitido.

La contaminación por este metabolito en un cereal de alto consumo en nuestro país, y específicamente en los sitios muestreados representa un riesgo para la salud humana y animal, debido a los efectos que pueden generar estos metabolitos, ya que este maíz muestreado se comercializa en la región, además, también repercute sobre el valor nutricional y comercial, lo cual pone en riesgo los ingresos familiares de los productores debido a que en los sitios muestreados la agricultura es una de las principales actividades económicas.

Por lo tanto, podemos decir que las muestras de maíz analizadas en los cuatro sitios de muestro son susceptibles a contaminación por aflatoxinas totales.

8.4 Identificación de otras especies de *Aspergillus* y otros hongos filamentosos

Otras de las especies de *Aspergillus* identificadas se reportan en el Gráfico 6. Como se puede observar se aisló *A. fumigatus* y *A. terreus* especies implicadas en la aspergilosis. También se puede ver que estas especies sólo se aislaron de Nativitas y de la Junta Auxiliar la Resurrección, y particularmente en Nativitas sólo en suelo.

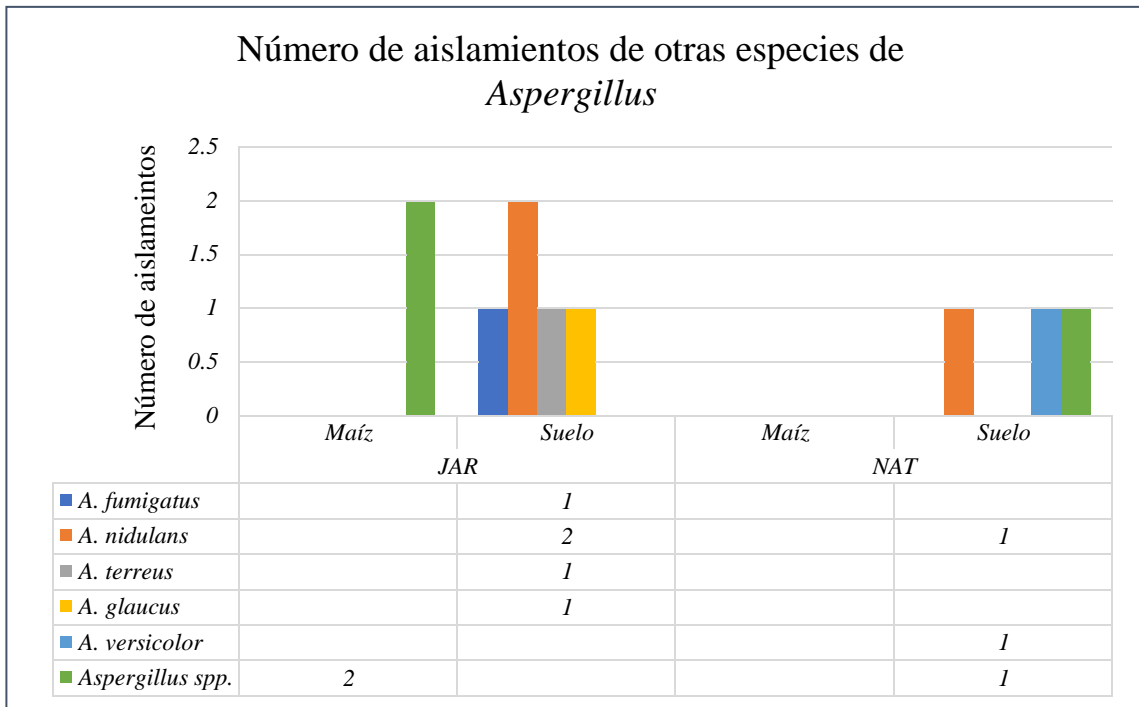


Gráfico 6: Número de aislamientos de otras especies de *Aspergillus*

NAT: Nativitas; JAR: Junta Auxiliar la Resurrección

Otros hongos filamentosos identificados y de importancia económica (Gráfico 7) fueron *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*, dentro de los cuales algunas de sus especies son también potencialmente aflatoxigénicas. Podríamos considerar que solo los aislados de *Penicillium*, *Paecilomyces* y *Fusarium* son relevantes por el número de cepas obtenidas.

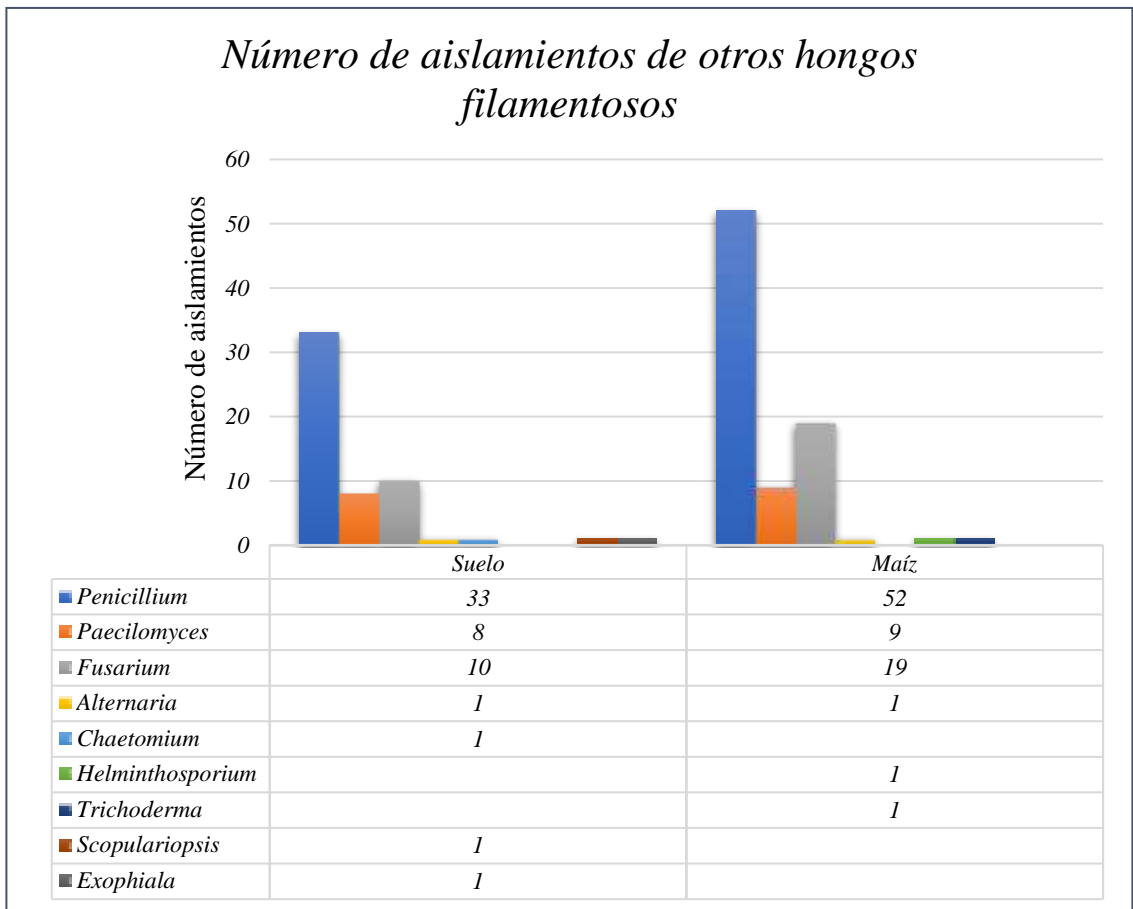


Gráfico 7: Número de aislamientos de otros hongos filamentosos

Los géneros identificados en muestras de maíz almacenado, en cada uno de los sitios de muestreo se muestran en el Gráfico 8. En la Junta Auxiliar la Resurrección es donde se obtuvieron mayor diversidad en cuanto a los géneros identificados, seguido de Tlaltepango, Nativitas y San Salvador el Seco, en este último se obtuvieron sólo dos géneros obteniéndose 3 aislamientos de *Penicillium* y 1 de *Fusarium*.

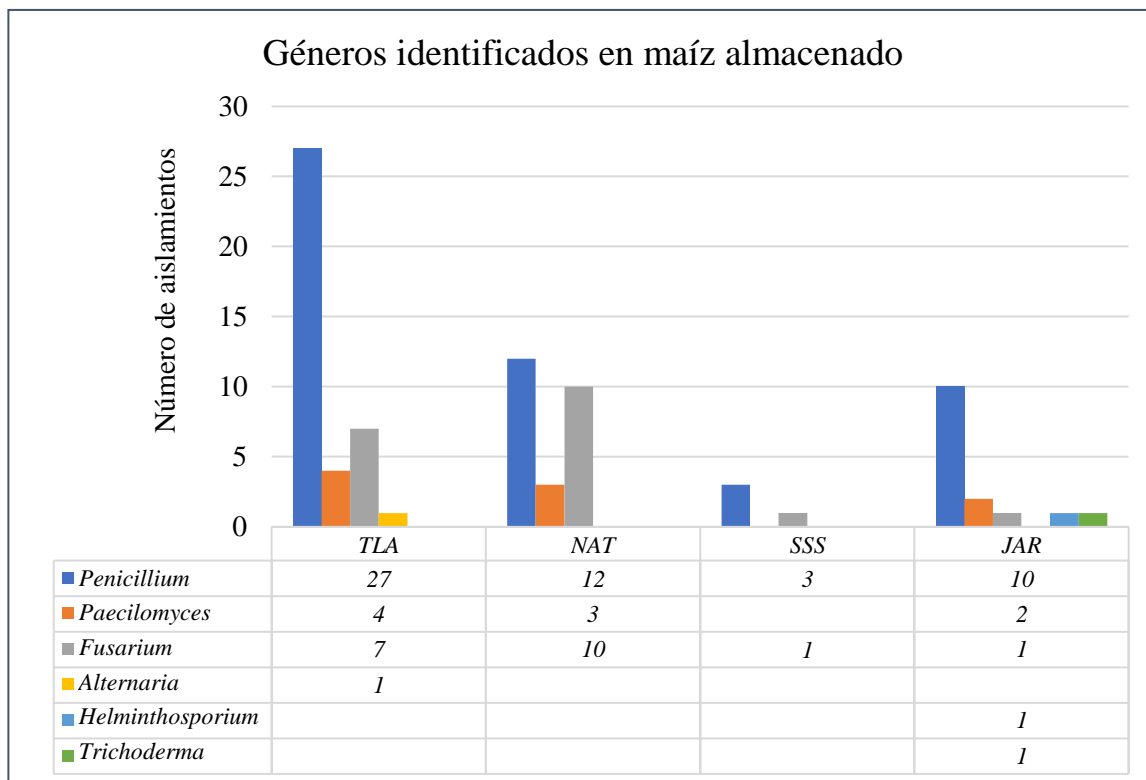


Gráfico 8: Géneros identificados en maíz almacenado

TLA: Tlaltepango; NAT: Nativitas; SSS: San Salvador el Seco; JAR; Junta Auxiliar la Resurrección

En cuanto a los géneros identificados en suelo agrícola (Gráfico 9), al igual que en el maíz, en la Junta Auxiliar la Resurrección se obtuvieron más géneros, seguido de Tlaltepango, San Salvador el Seco que en este sustrato se identificaron 3 pero también un mayor número de aislamientos, y por último Nativitas que, aunque sólo que identificó a *Penicillium* el número de aislamientos fue de 7.

Con los resultados obtenidos se pone de manifiesto que *Aspergillus flavus* es un hongo contaminante de suelo agrícola y maíz. En este trabajo se reporta la presencia de este hongo potencialmente aflatoxigénico en estos dos sustratos y en los cuatro sitios muestreados: Tlaltepango, Nativitas, San Salvador el Seco y Junta Auxiliar la Resurrección, los dos primeros pertenecientes a Tlaxcala y los otros dos a Puebla, sitios en donde nunca se había llevado a cabo el monitoreo de hongos aflatoxigénicos.

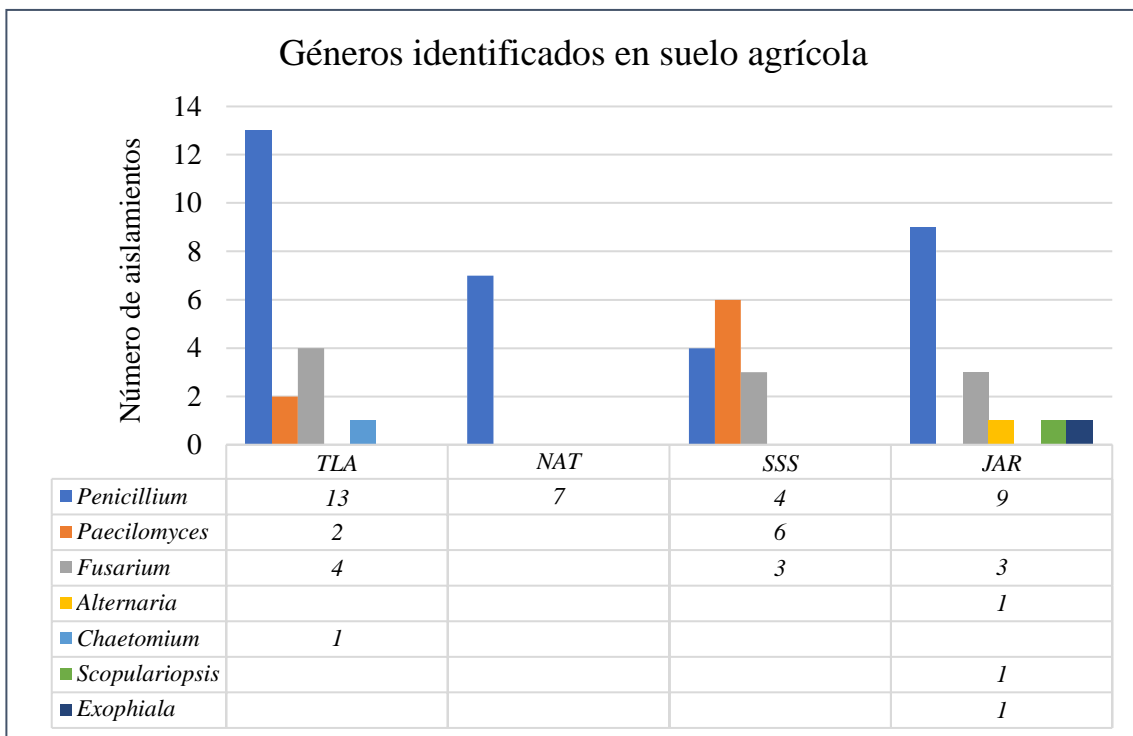


Gráfico 9: Géneros identificados en suelo agrícola

TLA: Tlaltepango; NAT: Nativitas; SSS: San Salvador el Seco; JAR; Junta Auxiliar la Resurrección

También se destaca la importancia de las prácticas agrícolas, las cuales pueden contribuir a que durante la fase de almacenamiento la proliferación de estos hongos incremente, así como, sí las condiciones de almacenamiento no son adecuadas la producción de aflatoxinas suceda, y aunque todas las muestras presentaron contaminación por este metabolito ninguna rebasa el límite máximo permitido por la NOM-188-SSA1-2002.

Por esto es importante llevar a cabo prácticas agrícolas sustentables que contribuyan a garantizar la inocuidad de los cultivos.

VIII. CONCLUSIONES

- Los suelos destinados al cultivo de maíz y granos de maíz criollo almacenado están contaminados con hongos potencialmente aflatoxigénicos, en este estudio de investigación se identificó *Aspergillus flavus*, asimismo, este cereal es susceptible a contaminación por aflatoxinas totales, en sitios de Puebla (San Salvador el Seco y la Junta Auxiliar la Resurrección) y Tlaxcala (Tlaltepango y Nativitas).
- De las especies potencialmente aflatoxigénicas sólo se identificó la presencia ambiental de *Aspergillus flavus* tanto en suelo agrícola y maíz criollo almacenado, lo cual pone en riesgo la calidad de este cereal, y al mismo tiempo la salud humana y animal pueden verse comprometidas.
- La distribución de *Aspergillus flavus* fue mayor en maíz, obteniéndose un total de 25 aislamientos, mientras que, en suelo agrícola se obtuvieron 18 aislados.
- El mayor número de aislamientos se obtuvieron en Nativitas (14), seguido de la Junta Auxiliar la Resurrección (13), Tlaltepango (9) y San Salvador el Seco (7).
- Las muestras analizadas presentaron contaminación por aflatoxinas totales, 2 de ellas con niveles superiores a 10 µg/kg y 5 muy cercanas a esta concentración, aunque ninguna rebasa el límite permisible de 20 µg/kg establecido en la NOM-188-SSA1-2002, es importante el monitoreo de este metabolito en un cereal de alto consumo en México, el maíz.
- Se aislaron otros géneros filamentosos que cuentan con especies potencialmente micotoxigénicas los cuales fueron *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*.
- En la Junta Auxiliar la Resurrección se identificaron un mayor número de géneros fúngicos (5), seguido de Tlaltepango (4) y San Salvador el Seco (3); mientras que

en Nativitas sólo de identifico a *Penicillium*, estos resultados independientemente de las especies identificadas de *Aspergillus*. Por lo que, la presencia de otros hongos puede estar jugando un rol importante en el crecimiento de especies aflatoxigénicas.

- Factores ambientales como el clima, así como las prácticas agrícolas contribuyen a la proliferación de hongos potencialmente aflatoxigénicos, por esto es importante llevar a cabo prácticas agrícolas sustentables, como el monitoreo de especies aflatoxigénicas para disminuir la contaminación por estos hongos, así como la producción de su metabolito en un cereal de alto consumo a nivel mundial como lo es el maíz.
- Se aporta información sobre la presencia de *Aspergillus flavus*, especie potencialmente aflatoxigénico, así como la contaminación por aflatoxinas en los sitios de muestreo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17, S79-S84.
2. Agag, B. (2004). Mycotoxins in foods and feeds: Aflatoxins. *Association of Universal Bulletin of Environmental Research*, 7 (1), 173-191.
3. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. University of Florida, Gainesville, U.S.A.
4. Aguilar, F., Hussain, S., & Cerutti, P. (1993). Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the 53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *PNAS*, 90 (18), 8586-90.
5. Alexopoulos, C., Mims, C., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. Wiley & Sons. New York.
6. Alimentarius, C. (2012). *Prevención y Reducción de la Contaminación de los Alimentos y Piensos*. Primera edición.
7. Amare, M., & Keller, N. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 11-18.
8. Amitani, R., Murayama, T., Nawada, R., Lee, W., & Suzuki, N. (1995). *Aspergillus* culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro. *Eur Respir J*, 8, 1681-1687
9. Arenas, R. (1993). *Micología Médica Ilustrada*. Clínica, laboratorio y terapéutica. Primera Edición. McGraw Hill. México D.F. 397 pg.
10. Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Páramos de Guasca y Cruz Verde*. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
11. Arroyo, N., Ocegüera, D., Gasca, J., Delgadillo, J., Trápaga, Y., Torres, F., & Cortez, H. (2017). *Seguridad alimentaria: Seguridad nacional* Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Económicas.

12. Arrúa, A., Moreno, E., Viay, Q., Yolanda, M., Moreno, J., Vázquez, M., & Flores, A. (2012). Aspergillus aflatoxigénicos: enfoque taxonómico actual. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(5), 1047-1052.
13. Bailey, E., Iyer, R., Stone, M., Harris, T., & Essigmann, J. (1996). Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1535-1539.
14. Bbosa, G., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W., & Kyegombe, D. (2013). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. In *Aflatoxins-recent advances and future prospects*. InTech.
15. Bochud, P., Chien, J., Marr, K., Leisenring, W., Upton, A., & Janer, M. (2008). Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *NEJM*, 359, 1766-1777.
16. Bogantes, P., Bogantes, D., & Bogantes, S. (2004). Aflatoxinas. *Acta médica costarricense*, 46(4), 174-178.
17. Bonifaz, A. (2012). *Micología clínica básica*. 4 edición. McGraw Hill.
18. Brown, G. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 6, 33-43
19. Brown, K., Bren, U., Stone, M., & Guengerich, F. (2009). Inherent stereospecificity in the reaction of aflatoxin B1 8, 9-epoxide with deoxyguanosine and efficiency of DNA catalysis. *Chemical research in toxicology*, 22 (5), 913-917
20. Caballero, M. (2010). *Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de la infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México.
21. Capcarova, M., Zbynovska, K., Kalafova, A., Bulla, J., & Bielik, P. (2016). Environment contamination by mycotoxins and their occurrence in food and feed:

- physiological aspects and economical approach. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(4), 236-244.
22. Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1 –ADN. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2), 109-120.
 23. Carvajal, M., & Arroyo, G. (1997). Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 22,327-350.
 24. Chakraborty, S., Tiedemann, A., & Teng, P. (2000). Climate change: Potential impact on plant diseases. *Environmental Pollution*, 108(3), 317–326.
 25. Christensen, C., y Kaufmann, H. (1969). *Grain storage: the role of the fungi in quality loss*. University of Minnesota Press, U.S.A.
 26. 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 in biotechnology*, 27(3), 151-157.
 27. Codex Alimentarius. (2015). *Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos*. CODEX STAN 193-1995. Disponible en: [https://goo. gl/XqGcyo](https://goo.gl/XqGcyo)
 28. Coulombe, R., & Jr. (1994). Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B1. The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural significance., <http://toxicology.usu.edu/endnote/Nonhepatic-disposition.pdf>., 89-101
 29. Cuervo, S., Gomez, J., Rivas, P., & Orlando, F. (2010). *Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis invasora*. *Infectio*, 14 (S2), S131-S134.
 30. Dagenais, T., & Keller, N. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rew*, 22, 447-465.
 31. Das, A., Bhattacharya, S., Palaniswamy, M., & Angayarkanni, J. (2014). Biodegradation of aflatoxin B1 in contaminated rice straw by *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 and *Pleurotus ostreatus* GHBBF10 in the presence of metal salts and surfactants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(8), 2315-2324.

32. Davel, G., Canteros, C., Refojo, N., Hevia, A., y Abrantes, R. (2016). Curso a distancia y taller de identificación de hongos miceliales oportunistas de interés médico. INEI (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas), Departamento de Micología, Argentina.
33. Díaz G. (1996). Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. Primera parte. *Veterinaria al día* 2, 28-34.
34. Ehrlich, K., Kobbeman, K., Montalbano, B., & Cotty, P. (2007). Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International journal of food microbiology*, 114 (2), 153-159.
35. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y OMS (Organización Mundial de la Salud) (2003). *Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos*. Recuperado en julio de 2018, de <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s09.htm>
36. Garcia, C., & Carratalà, J. (2012). Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(3), 151-158.
37. García, C., Lizárraga, G., Armenta, A., & Apodaca, M. (2012). Efecto de productos biorracionales en la incidencia de hongos y concentración de aflatoxinas en maíz blanco cultivado en Sinaloa, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4), 830-838
38. García, J., Bohórquez, M., & García, C. (2013). *Determinación ambiental de la salud: un reto para Colombia*. Facultad Nacional de Salud Pública: El escenario para la salud pública desde la ciencia, 31, 2.
39. Garzón, N. (2013). *Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca-Colombia* (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias)
40. Gerbes, A., & Caselmann, W. (1993). Point mutations of the 53 gene, human hepatocellular carcinoma and aflatoxins. *Journal of Hepatology*, 19, 312-315.

41. Gersuk, G., Underhill, D., Zhu, L., & Marr, K. (2006). Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*, 176, 3717-3724.
42. Guengerich, F. (2001). Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 488(3), 195-209.
43. Guengerich, F., Johnson, W., Shimada, T., Ueng, Y., Yamazaki, H., & Langouët, S. (1998). Activation and detoxication of aflatoxin B 1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402 (1), 121-128.
44. Honda, Y., Nanba, N. y Nozu, M. (1990). A further study on ultrastructural aspects of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture*, 24, 39–46.
45. Honda, Y., Sota, K. and Nozu, M. (1987) An ultrastructural study of photo-induced conidiogenesis and dedifferentiation in *Alternaria solani*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture*, 21, 141–154.
46. Houbraken, P., & Samson, R. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1-51.
47. Huerta, A., Dávila, J., Sánchez, E., Heredia, N., & García, S. (2016). Ocurrencia de micotoxinas en alfalfa (*Medicago sativa* L.), sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] y zacate (*Cenchrus ciliaris* L.) en venta al menudeo en el estado de Nuevo León, México. *Agrociencia*, 50(7), 825-836.
48. IARC (International Agency For Research On Cancer) (2012). *Chemical Agents and Related Occupations: Review of Human Carcinogens - Aflatoxins*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100, 225-248.
49. IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). (2012). *Situación de la seguridad alimentaria en las Américas*. San José, Costa Rica.
50. INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo) (2014). *Alternaria* spp. recuperado en agosto de 2018, de DATABIO Sitio web:

<http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20Obiologicos/Fichas/Alter%20spp.pdf>

51. Jang, S., Biberstein, E., Slauson, D., y Suter, P. (1971). Paecilomycosis in a dog. *J. A. V. M. A.*, 159(12):1775-1779.
52. Kitada, M., Taneda, M., Ohi, H., Komori, M., Itahashi, K., Nagao, M., & Kamataki, T. (1989). Mutagenic activation of aflatoxin B1 by P-450 HFLa in human fetal livers. *Mutation Research Letters*, 227(1), 53-58.
53. Klich, M. (2007). *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8, 713-722.
54. Knight, L., Primiano, T., Groopman, J., Kensler, T., & Sutter, T. (1999). cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis*, 20(7), 1215-1223.
55. Kosmidis C., & Denning D. (2015). The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*70, *Pub Med*, 270–277.
56. Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus species on stored products*. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
57. Kuiper, T. (1998). *Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. Mycotoxins and phycotoxins developments in chemistry, toxicology and food safety*. Alaken Inc., Fort Collins, Colo, 25-48.
58. Larsson, P., & Tjalve, H. (2000). Intranasal instillation of Aflatoxin B1 in rats: Bioactivation in the nasal mucosa and neuronal transport to the olfactory bulb. *Toxicological Science*, 55, 383-391.
59. Li, D., Cao, Y., He, L., Wang, N., & Gu, J. (1993). Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*, 14(2), 169-173.
60. Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. *Environ. Health Perspect*, 118, 818-824.
61. Mace, K., Aguilar, F., Wang, J., Vautravers, P., Gomez, M., Gonzalez, F., & Pfeifer, A. (1997). Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53

mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis*, 18(7), 1291-1297

62. Martínez, H., Hernández, S., Reyes, C., & Vázquez, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 126-146.
63. Martínez, R., Rojo, G., García, C., Ramírez, B., Jasso, J., Nava, E., Apodaca, M., Camacho, J., Armenta, A., Bautista, N., González, M., Meza, J., Cortes, E., Rosas, N., Ruelas, R., Vejar, G., Aguilera, M., Díaz, R., y Vázquez, P. (2013). *Tecnologías de Granos y Semillas*. Universidad Autónoma Indígena de México, México.
64. Martins, M., Martins, M., & Bernardo, F. (2000). Interaction of strains of non-toxicogenic *Aspergillus flavus* with *Aspergillus parasiticus* on aflatoxin production. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37(6), 0-0.
65. Meareg, G., & Nancy, P. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 11–18.
66. Mezher, M., Raoof, W., & Bandar, K. (2015). Identification study some virulence factors of invasive mold infections isolated from patients undergoing chemotherapy in Tikrit teaching Hospital. *Egypt Acad J Biolog Sci.*, 7(1), 1-11.
67. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2015). *Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas*. Madrid.
68. MinSalud (Ministerio de Salud y Protección Social) (2013). Prosperidad para todos. Recuperado en julio de 2018, de <https://www.minsalud.gov.co/Documents/Archivos-temporal-jd/alimentos-temporal.pdf>
69. Miraglia, M., Marvin, H., Kleter, G., Battilani, P., Brera, C., & Coni, E. (2009). Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 47(5), 1009–1021.

70. Monzón, A., & Rodríguez, J. (2001). *Infecciones causadas por el género Fusarium*. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.
71. Moreno, L., & González, S. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 32, 193-205.
72. Moreno, M., & Gil, G. (1991). La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Coordinación de la investigación científica. Programa Universitario de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 42p.
73. Moreno, Z. (2000). *Correlación de la tasa de crecimiento radial y la tasa de crecimiento específico de hongos filamentosos aislados de la planta Espeletia barclayana*. *Microbiólogo Industrial*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. 133 pg.
74. Morris, L. (2011). Determinación de aflatoxinas en muestras de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana mediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011. Universidad Nacional de Colombia.
75. Muriel, P. (2017). The Liver: General Aspects and Epidemiology. *Liver Pathophysiology*, 3-22.
76. Murphy, P., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, M. (2006). Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71 (5), 51-65.
77. Nierman, W., Yu, J., Fedorova, N., Losada, L., Cleveland, T., Bhatnagar, D., & Payne, G. (2015). Genome sequence of *Aspergillus flavus* NRRL 3357, a strain that causes aflatoxin contamination of food and feed. *Genome announcements*, 3(2), e00168-15.
78. Okoth, S., Nyongesa, B., Ayugi, V., Kang'ethe, E., Korhonen, H., & Joutsjoki, V. (2012). Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya. *Toxins*, 4(11); 991-1007.

79. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2002). *Estrategia Mundial de la OMS para la Inocuidad de los Alimentos: alimentos más seguros para una mejor salud*. Programa 2002 de Inocuidad de los Alimentos. Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, Suiza.
80. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018). *¿Cómo define la OMS la salud?* Recuperado en julio de 2018, de <http://www.who.int/suggestions/faq/es/>
81. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2018). *Inocuidad de los alimentos*. Recuperado en julio de 2018, de <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/food-safety>
82. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2015) *Inocuidad de los alimentos*. Consultado en mayo de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
83. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017) *Nutrición y seguridad alimentaria*. Consultado en mayo de 2017, de http://www.who.int/foodsafety/areas_work/nutrition/es/
84. Padrón, M., Yuef, H., Hernández, S., Reyes, C., & Vázquez, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 126-146.
85. Park, J., & Mehrad, B. (2009). Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 535-551.
86. Paterson, R., & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International*, 43(7), 1902-1914.
87. Paulussen, C., Hallsworth, J., Álvarez, S., Nierman, W., Hamill, P., Blain, D., & Lievens, B. (2017). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial biotechnology*, 10(2), 296-322.
88. Peña, S., Carmona, M., & Valladares, B. (2013). Comparación de calidad física, contenido de fenoles y aflatoxinas en maíces híbridos y nativos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(5), 779-788.

89. Piontelli, E. (2014). Agentes comunes en las aspergilosis humanas: conceptos primarios en la diferenciación de sus complejos de especies. *Boletín Micológico*, 29(2).
90. Plasencia, J. (2004). Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. *Journal of Toxicology* 2, 155-177.
91. Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 78-82.
92. Powell, K., Renwick, A., & Peberdy, J. (1994). *The Genus Aspergillus: From taxonomy and genetics to industrial application*. New York, Plenum Press.
93. Quezada, M., Flores, A., Arrúa, A., Vázquez, M., & Moreno, E. (2011). Resistencia de Plantas de Maíz a la Infección por *Aspergillus Flavus* Link en Invernadero. *Revista Agraria*, 8(2), 15-20.
94. Raksha, G., & Urhekar, A. (2017). Virulence Factors Detection in *Aspergillus* Isolates from Clinical and Environmental Samples. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(7), DC13-DC18.
95. Raney, V., Harris, T., & Stone, M. (1993). DNA conformation mediates aflatoxin B1-DNA binding and the formation of guanine N7 adducts by aflatoxin B1 8,9-exo-epoxide. *Chemical Research in Toxicology*, 6(1), 64-68.
96. Reese, B. (2010). *Genome wide response of Aspergillus flavus to developing maize kernels and the functional analysis of the phytase gene phy1*, Purdue University. Recuperado en agosto de 2018 de: <https://search-proquest-com.etechnology.idm.oclc.org/docview/861344008?accountid=18927>
97. Rengifo, H. (2008). La salud ambiental. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25 (4), 353-354.
98. Requena, F., Saume, E., & León, A. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23, 393-410.
99. Robledo, M., Marín, S., & Ramos, A. (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 141-144.

100. Rodríguez J., Paerson C., Pos M., Poneleit C., & Beine R. (1993). Role of selected arthropods in the contamination of corn by *Aspergillus flavus* measured by aflatoxin production. *Alabama: Cramaster Printers*, 23-26.
101. Roilides, E., Holmes, A., & Blake, C. (1994). Antifungal activity of elutriated human monocytes against *Aspergillus fumigatus* hyphae: Enhancement by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- γ . *J Infect Dis*, 170, 894-899.
102. Rojas, O., & Wilches, A. (2009). Determinación de aflatoxinas en alimentos de mayor consumo infantil comercializados en la ciudad de Pamplona, norte de Santander. *Bistua. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 7 (1), 1-12.
103. Ryan, K. J. (2004). *Candida, Aspergillus, and Other Opportunistic Fungi*. Sherris Medical Microbiology (4th ed., pp. 659-668). USA: McGraw-Hill.
104. Sabbioni, G., & Wild, C. (1991). Identification of an aflatoxin G1-serum albumin adduct and its relevance to the measurement of human exposure to aflatoxins. *Carcinogenesis*, 12(1), 97-103
105. Salim, R., & Runco, R. (2008). Aspergilosis sinusal no invasiva por *Aspergillus parasiticus* en niño inmunocomprometido. *Boletín Micológico*, 23, 1-7.
106. Samson, R., Visagie, M., & Houbraken, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. (www.fungaltaxonomy.org/files/8114/0673/5235/20140721_SIM78_Aspgillus_nomenclature.pdf -)
107. Sánchez, Á., Pérez, E., & Bojórquez, D. (2009). Contaminantes biológicos de los granos almacenados de importancia socioeconómica en Sinaloa. *Tecnologías de Granos y Semillas*, 55.
108. Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil, J., González, M., & Patiño, B. (2011). Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus*

parasiticus in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *International journal of food microbiology*, 145(1), 121-125.

109. Schaffner, A., Douglas, H., & Braude A. (1982). Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*: Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*, 69, 617-631.
110. Schenzel, J., Forrer, H, Vogelgsang, S., Hungerbühler, K., & Bucheli, T. (2012). Mycotoxins in the environment: I. Production and emission from an agricultural test field. *Environmental science & technology*, 46 (24), 13067-13075.
111. Sebastian, Alvaro. (2014). *Análisis de secuencias biológicas (Analysis of biological sequences)*. 211-230.
112. Segal, B. (2007). Role of macrophages in host defense against aspergillosis and strategies for immune augmentation. *The Oncologist*, 12 (2), 7-13.
113. Sherratt, P., & Hayes, J. (2001). Glutathione S-transferase. Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics, 9, 320-351.
114. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2018). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Recuperado en mayo de 2018, de http://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/
115. Sommers, N., Fortlage, R., y Edwards, D. (1992). *Postharvest diseases of selected commodities*. University of California, U.S.A.
116. Squire, R. (1981) Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214, 877-880.
117. Sudakin, D. (2003). Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: A clinical review. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology*, 41, 195-204
118. Sweany, R., Damann, K., Jr., & Kaller M. (2014). Comparison of Soil and Corn Kernel *Aspergillus flavus* Populations: Evidence for Niche Specialization. *Phytopathology*, 101, 952-959.

119. Tangarife, V. (2011). *Penicillium* spp. Universidad de Antioquia, Escuela de Microbiología, recuperado en agosto 2018, de sitio web <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100815>.
120. Tapia, C., y Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85-86.
121. Thomma, B. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular plant pathology*, 4 (4), 225-236.
122. Torres, F. (2014). Seguridad alimentaria: una explicación sobre prevalencia de los desequilibrios en México. *Procuraduría Agraria*, 71-97.
123. Turrent, A. (2008) Transgénicos amenazan la biodiversidad del maíz nativo. *La Jornada del Campo*, 7.
124. Underhill, D., Rossnagle, E., Lowell, C. & Simmons, R. (2005). Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*, 106, 2543-2550.
125. Urrego, J., & Díaz, G. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina*, 54(2), 108-116.
126. Van, H., & Jonker, M. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. *Food & Agriculture Org.*
127. Vargas, A., & Villamizar, D. (2005). *Estudio preliminar de la producción, extracción y purificación de T2 toxina por Fusarium sporotrichioides NRRL 3299 en dos medios sintéticos*. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Jeveriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. 172 pg.
128. Wang, H., Dick, R., Yin, H., Licad, E., Kroetz, D., Szklarz, G., & Correia, M. (1998). Structure– function relationships of human liver cytochromes P450 3A: aflatoxin B1 metabolism as a probe. *Biochemistry*, 37(36), 12536-12545.

129. Wild, C., & Montesano, R. (2009). A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Letters*, 286, 22-28.
130. Wu, F., & Khlangwiset, P. (2010). Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and postharvest interventions. *Food Additives & Contaminants*, 27, 496-509.