

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga¹

Juliana Moura Méndez¹

Danilo Fernández Ríos²

Cinthia Casal Martínez¹

¹Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas,
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica,
Universidad Nacional de Asunción

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción
Rev UN Med 2013 2(1): 141-169

Aspergillus y micotoxinas

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidas por ciertos hongos filamentosos y que producen en el ser humano y los animales síndromes llamados micotoxicosis. Los *Aspergillus*, son un grupo de hongos conocidos desde hace milenios debido a sus propiedades industriales, de deterioro y su capacidad de producir micotoxinas. Dos de las toxinas más importantes producidas por estos hongos son las aflatoxinas, producidas por la sección Flavi, y las ocratoxinas, producidas por la sección Nigri. La biosíntesis de micotoxinas es un proceso complejo gobernado por grupos de genes y su producción depende en gran manera de condiciones ambientales y la genética del hongo. Una gran cantidad de países han establecido legislaciones estableciendo límites mínimos para la presencia de micotoxinas en productos alimentarios. Esto se torna complejo debido a que hasta la actualidad el único método eficiente para el control de las mismas es la prevención.

Palabras Claves: micotoxinas, *Aspergillus*, Flavi, Negri, aflatoxinas, ocratoxinas.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos para los vertebrados y otros grupos de animales sintetizados por ciertos hongos en productos agrícolas expuestos a la infestación fúngica. Su producción es inevitable y depende de diferentes factores ambientales en el campo y/o durante el almacenamiento. Dado su carácter inevitable e imprevisible, la contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad de los alimentos [1]. Representan un problema económico y de salud pública debido a las legislaciones y restricciones que por su presencia se imponen. Dos de las principales micotoxinas presentes en alimentos son las ocratoxinas y aflatoxinas, producidas principalmente por hongos microscópicos filamentosos del género *Aspergillus* [1]. Estos compuestos que se sintetizan cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, y son a menudo relacionados con la diferenciación y la esporulación [2]. La presencia de estas micotoxinas puede darse en forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar

efectos sinérgicos en el organismo, aumentando su toxicidad [3].

La presencia de hongos potencialmente micotoxígenos no indica que el sustrato esté contaminado con micotoxinas. Los requerimientos fisiológicos y nutricionales relacionados a la producción de micotoxinas son por lo general mucho más específicos que aquellos relacionados con el crecimiento del hongo. Además, en muchas especies no todos los individuos son capaces de producir toxinas [3]. Las aflatoxinas y ocratoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus* se consideran dentro de las aflatoxinas mayores o de importancia mundial debido al impacto que presentan en la salud humana y en la economía de una región o país [4,5].

Cada micotoxina actúa sobre la salud humana y de los animales de una manera diferente. Actualmente se conocen más de 200 hongos productores de micotoxinas, siendo las aflatoxinas producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* consideradas las más tóxicas e importantes desde el punto de vista sanitario [3]. Elevados niveles de micotoxinas

presentes en los alimentos pueden causar efectos agudos o crónicos sobre la salud del hombre y los animales, afectando distintos órganos y sistemas [6].

EL GÉNERO *ASPERGILLUS*

Aspergillus es un género grande compuesto por más de 180 especies anamórficas que presentan sus telomormos en 9 géneros diferentes. Se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos [7,8]. Hasta el año 2007 se habían descrito aproximadamente 250 especies [9]. Actualmente para la identificación de especies de *Aspergillus* es recomendado el enfoque polifásico, consistente en el uso de características morfológicas, fisiológicas y moleculares. Las características morfológicas pueden variar al igual que las fisiológicas puesto que no se presentan en todos los aislados de una misma especie. En el caso de las características moleculares, las mismas no pueden tomarse como criterio único para el reconocimiento de especies, ya que la línea que separa las mismas no es clara y las mismas son potencialmente capaces de mezclarse entre sí y al mismo tiempo integrarse en un concepto coherente de especie [9].

Nuevas herramientas como la genómica comparativa pueden ayudar a la taxonomía en el género *Aspergillus* ya que permiten la comparación de datos que permiten el establecimiento de diferencias biológicas entre cepas y especies [10]. El primer paso consiste en la comparación de características morfológicas, tanto macro como micro morfología. Por lo general, esto se combina con características fisiológicas y nutricionales, acompañadas del perfil de metabolitos secundarios, tanto volátiles como no volátiles, enzimas extracelulares, etc., y secuenciamiento de DNA [11]. Algunas especies de *Aspergillus* son mitospóricas, entre ellas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, considerados como los principales productores de aflatoxinas [12]. Se citan también como productores de aflatoxinas a *Aspergillus pseudotamarii* y a *Aspergillus bombycis* pero esto no ha podido ser confirmado siempre a nivel laboratorio [13-15].

Los *Aspergillus* negros u oscuros comprenden a las especies dentro de la Sección Nigri, que se encuentran distribuidas mundialmente y que tienen un impacto significativo en la sociedad actual. Varias especies causan deterioro en alimentos, otras son utilizadas en la industria, en procesos de fermentación o en la industria biotecnológica. Se ha reportado la presencia de las especies del complejo *A. niger*, *A. carbonarius*, *A.*

japonicus/aculeatus como frecuentes responsables de pudriciones a campo y post cosecha en frutas (manzanas, peras, duraznos, cítricos, uvas, higos, berries, tomates, melones, etc.) y en algunos vegetales (especialmente cebollas, ajos y batatas). Además, es el hongo más comúnmente aislado de frutas secas [16]. Los *Aspergillus* negros, son uno de los grupos más difíciles de clasificar e identificar, sobre todo debido a la existencia de numerosos métodos propuestos para este fin. Actualmente, se consideran 9 taxas aceptadas [17].

CICLO DE VIDA DE *ASPERGILLUS*

Al ser un hongo del suelo que se reproduce mediante conidias asexuales la principal fuente de inóculo es el suelo, pero la estructura predominante de resistencia es desconocida. Se ha sugerido que el hongo sobrevive en conidias, micelio y esclerocios [18,19]. Las conidias son las estructuras infectivas capaces de colonizar a las plantas mediante el viento o los insectos. *Aspergillus* puede desarrollarse en tejidos vegetales vivos, en descomposición o en restos animales. Su población, tanto en la planta como en el suelo, depende de su capacidad de competir con la microbiota presente [18,19].

Los dos principales factores que influyen en la población de este hongo en el suelo, son la temperatura y la humedad. Bajo condiciones de alta temperatura y baja actividad del agua *Aspergillus* se vuelve muy competitivo y puede convertirse en una de las especies dominantes de hongos en el suelo. No se conoce la fase sexual de este hongo, pero se asume que la conidia es el inóculo primario [18,19]. En cuanto a los *Aspergillus* de la Sección Nigri, el hongo sobrevive en el suelo y se disemina a temperaturas de 25 a 30°C y con corrientes de aire [20,21]. Los *Aspergillus* negros fueron nombrados como sección Nigri debido al color negro de sus esporas, que son altamente resistentes a los rayos solares y a la sequía, aunque la exposición prolongada a estos factores disminuye la viabilidad de las esporas [20,21]. La germinación de las esporas es muy rápida, en menos de 24 horas a temperaturas por encima de los 25°C y actividad del agua de entre 0.90 y 0.99. Las temperaturas óptimas para su desarrollo varían en un rango de 10°C a 37°C; una actividad del agua de entre 0.90 y 0.995 es óptima para su desarrollo [21-23]. En el caso de las OTA en vinos, las uvas son generalmente secadas por un periodo de tiempo de 7 a 14 días para disminuir su nivel de humedad. Durante este proceso los azúcares se concentran y esto resultando en un me-

dio selectivo para los *Aspergillus* negros. La ocurrencia de lluvias durante el secado incrementa el riesgo de contaminación por ocratoxinas [24].

A pesar de no ser considerados como importantes hongos fitopatógenos, las especies de *Aspergillus* son responsables de varios desordenes en plantas y alimentos procesados [16]. Estos hongos se comportan muchas veces como saprófitos en un amplio rango de sustratos, incluyendo alimentos, semillas, frutas, y vegetales [25,26]. Contribuyen a los procesos de descomposición de la materia orgánica y algunas especies son patógenas de insectos [27]. Las especies de *Aspergillus* producen una serie de metabolitos tóxicos, siendo los más importantes los del grupo de las aflatoxinas producidas por hongos de las secciones Flavi, Nidulantes y Ochraceorosei y las ocratoxinas, producidas por hongos de las secciones Nigri y Circundati [3].

AFLATOXINAS

Son micotoxinas producidas por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. El estudio de las mismas se inició en 1960, debido a la muerte en Inglaterra de 100.000 pavos a causa de la que en su momento se llamó enfermedad X del pavo. Esta enfermedad se manifestó con la pérdida de apetito, letargo y debilidad de los animales. Cuando las aves estaban por morir, el cuello se arqueaba, la cabeza se tiraba hacia atrás y las patas quedaban tendidas. Posteriormente se descubrió que la causa de la muerte de las aves se debió a una intoxicación producida por alimento contaminado con *A. flavus* presente en pasta de cacahuete importada de Brasil [8,28-30].

Las aflatoxinas están estructuralmente relacionadas, químicamente son cumarinas sustituidas conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona. Son ópticamente activas, fluorescentes bajo luz ultravioleta y sus pesos moleculares varían de 312 kD a 350 kD; son poco solubles en agua, pudiendo ser extraídas con solventes orgánicos moderadamente polares. Cuando se encuentran en estado puros son termoresistentes, alcanzando sus puntos de fusión con temperaturas superiores a 250°C; se funden entre 190°C y 310°C y con rangos de pH entre 3 y 10. Son fotosensibles y tienden a descomponerse cuando están en solución sobre todo acuosa o metanólica. Se descomponen bajo la acción de agentes oxidantes o álcalis fuertes e hipoclorito de sodio [3,8,13,14]. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas de las cuales 6 son contaminantes de alimentos: las del grupo B (B_1 y B_2), G (G_1 y G_2) y M (M_1 y

M_2). Las aflatoxinas pueden localizarse en el micelio de los hongos, en las esporas o ser excretadas como exotoxinas que se liberan en el medio donde crece el hongo [3].

Aspergillus flavus produce únicamente aflatoxinas B_1 , B_2 y ácido ciclopiazónico, ambos o ninguna. *A. parasiticus* y *A. nomius* producen aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 . *A. pseudotamarii* produce aflatoxinas B_1 , B_2 y ácido ciclopiazónico y *A. bombycis* produce aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 . Sin embargo, se ha reportado la producción de aflatoxinas de tipo G por cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes a *A. flavus* [31]. Las aflatoxinas son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas. Son además teratogénicas y mutagénicas. El principal órgano diana es el hígado, donde producen daño hepático agudo, cirrosis; inducen además tumores, disminución de la eficiencia del sistema inmunitario, y afecciones de los pulmones. Se acumulan en los tejidos y se excretan por la leche. La aflatoxina B_1 actúa también sobre el metabolismo de los lípidos y de los glúcidos. Se considera a la aflatoxina B_1 como la de mayor riesgo. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica a las aflatoxinas dentro del grupo 1 en su sistema de clasificación, como agente altamente carcinogénico en humanos [6].

Por lo general, la aflatoxina B_1 es la que se encuentra en mayores concentraciones, siendo además la más potente de todas. Cuando los animales ingieren en sus alimentos aflatoxinas B_1 y B_2 en lactancia las mismas son excretadas por la leche en forma de aflatoxinas M_1 y M_2 , formas alteradas pero aun tóxicas. La importancia de las aflatoxinas radica en el riesgo que representan para la salud pública, así como las pérdidas económicas por la baja calidad del grano, limitaciones en las exportaciones, costos de manejo, análisis y eliminación de material contaminado [3]. La contaminación por aflatoxinas a nivel de campo ha sido reportada en varios países, y es bien conocido que las condiciones ambientales tienen una alta influencia en la dispersión de las esporas del hongo, la penetración y el establecimiento de las hifas en las plantas. Además, los tratamientos culturales y las condiciones agronómicas tienen una marcada influencia en la síntesis de aflatoxinas, sumado a la presencia de insectos, altas temperaturas y humedad. En la zona centro de México, las condiciones ambientales son especialmente favorables para la síntesis de aflatoxinas [33].

La síntesis de aflatoxinas ocurre en las hifas y conidias. Los máximos niveles de aflatoxinas se pueden hallar en el micelio o biomasa. El nivel de producción

declina rápidamente cuando las hifas sufren autólisis [33]. Las aflatoxinas pueden ser también sintetizadas en esclerocios producidos por el hongo [34]. Datos epidemiológicos implican a la aflatoxina B₁ como el compuesto responsable de la ocurrencia de cáncer en humanos en ciertas regiones del mundo. Las aflatoxinas no solamente son carcinogénicas, también son tóxicas [35]. Las aflatoxinas se producen en una ruta de biosíntesis compleja, que comprende múltiples pasos, siguientes a la síntesis del primer compuesto intermedio estable, el ácido norsolínico, y en la cual hasta ahora han sido identificados 24 genes relacionados. Es un proceso complejo que comprende reacciones multienzimáticas [35]. Los factores ambientales más significativos que afectan la síntesis de aflatoxinas son las fuentes de carbono y de nitrógeno, el pH, la temperatura, la actividad del agua y ciertos metabolitos volátiles de las plantas [19].

Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos son absorbidas en la mucosa intestinal y pasan al torrente circulatorio, a través del cual llegan al hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan. En los animales es evidente el daño al hígado y la disminución de la transformación de alimento en carne, huevo o leche [3]. La aflatoxina B₁ se considera la aflatoxina más importante, no sólo porque aparece con más frecuencia y en más abundancia, sino también porque es la más tóxica. La aflatoxina B₁ es absorbida en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas hasta el hígado, mayoritariamente por la vía portal. La toxina entra en las células y es metabolizada en el retículo endoplasmático para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos como aflatoxinas P₁, M₁, Q₁. También puede darse la formación de aflatoxina B₁-8,9-epóxido que puede ser eliminada por la orina [3].

OCRATOXINAS

En 1965, Van der Merwe y col. aislaron cepas del hongo *Aspergillus ochraceus* en alimentos elaborados a base de maíz contaminado que causó la muerte de ratas, ratones y pavos y consiguieron aislar una micotoxina hasta entonces desconocida a la que denominaron Ocratoxina A (OTA) [36,37]. Cuatro años más tarde, van Walbeek y col. [38] aislaron el mismo compuesto de un hongo que erróneamente fue identificado como *Penicillium viridicatum*, ya que esta especie no produce OTA. La OTA ha sido encontrada como contaminante en una serie de alimentos, tanto a campo como en post

cosecha. Ha sido encontrada en cereales, cacao, café, uvas, vino, chocolate, cerveza, jugos de frutas, y alimentos infantiles, entre otros [39,40]. La producción de OTA a climas fríos se asocia principalmente al género *Penicillium*, mientras que en climas cálidos al género *Aspergillus* [40].

La OTA es la más tóxica dentro del grupo de las ocratoxinas y está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. Existen varios compuestos análogos a la OTA, como la OTB, la OTC, la OTAα y la OTAβ, que difieren de la misma en su estructura y como consecuencia en su toxigenicidad [40]. Las ocratoxinas se absorben rápidamente por el tracto gastrointestinal y se eliminan lentamente. Su biodisponibilidad en las especies de mamíferos es superior al 50%. La OTA presenta alta afinidad con las proteínas plasmáticas. Se excreta por las heces y orina y el principal metabolito es la OT-α [40].

La toxicidad aguda de la OTA es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas. Las especies más sensibles son los perros, cerdos y pollos. Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón; nefrosis, y necrosis hepática y del tejido linfoide [40]. Los efectos crónicos de la OTA han sido ampliamente documentados. Está demostrado que produce nefropatía intersticial en animales de granja como pollos y cerdos [40]. En el ser humano se ha relacionado con la nefropatía endémica de los Balcanes, debido a la gran semejanza histopatológica con los síntomas en animales y a la alta exposición de las personas a la OTA en esa región geográfica en comparación con otras. Esta enfermedad se caracteriza por una atrofia tubular y fibrosis periglomerular, entre otros síntomas; se acompaña a veces de tumores malignos muy agresivos en el tracto urinario superior [39-42]. La OTA es también teratogénica, hepatotóxica, neurotóxica e inmunotóxica. Está clasificada como 2B por el IARC, lo que la postula como posible carcinógeno en humanos [40]. En cuanto a los mecanismos de toxicidad, la OTA posee analogía estructural con el aminoácido fenilalanina, por lo cual la toxina inhibe de manera competitiva la tRNA fenilalanina sintetasa y como consecuencia de ello se interrumpe la síntesis de proteínas [40].

BIOSÍNTESIS DE AFLATOXINAS Y OCHRATOXINAS

En la actualidad, se sabe que los genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas y otros metabolitos secundarios están frecuentemente organizados formando agrupaciones de genes o *clusters*. Los genes que codifican la síntesis de las enzimas relacionadas a la biosíntesis de aflatoxinas se encuentran localizados en una *cluster* de 75 kb de un fragmento de DNA. Las aflatoxinas son producidas intracelularmente y luego se excretan [43]. Se ha reportado que en *A. parasiticus* los endosomas juegan un papel fundamental en la síntesis y almacenamiento de las aflatoxinas [44]. Se citan 24 genes involucrados en la síntesis, aunque algunos autores suponen que existen más de 26 involucrados en el *cluster* [45]. Se relaciona la biosíntesis de aflatoxinas con la de los lípidos y se asume una disminución en la síntesis de proteínas en algunos casos. La producción de aflatoxinas se inicia durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo. Al inicio del crecimiento del mismo la producción de aflatoxinas es baja o nula, pero a medida que los niveles de nitrógeno y fosfatos se reducen en el medio, el metabolismo primario se desorganiza produciéndose la acumulación de metabolitos primarios e iniciándose la producción de aflatoxinas [46,47].

Varias enzimas con distintas actividades dentro de la vía han sido identificadas y algunas parcialmente purificadas (metiltransferasas, reductasas, ciclasas, esterasas, etc.). En la biosíntesis de las aflatoxinas están involucrados cuatro genes principales (*afl-R*, *nor-1*, *ver-1*, *omt-1*). Tales genes son responsables de la regulación biosintética de la producción de las mismas, así como otros genes homólogos. La biosíntesis de la aflatoxina B₁ ha sido dilucidada tanto a nivel bioquímico como a nivel genético. *afl-R* es el principal gen regulador en la producción de aflatoxinas dentro de la vía biosintética. La proteína AFLR se puede unir a la región promotora de cada gen de la producción de aflatoxinas y activar la expresión de genes. En adición a esto el gen *afl-R* posee función de autorregulación. La ausencia de este gen o su presencia anormal es un fuerte indicador de que la cepa de *Aspergillus* no posee capacidad de sintetizar aflatoxinas [47,48]. *afl-R* tiene como función la de activar la transcripción en la vía. Otro gen relacionado a esto es *afl-J*. Tanto en la biosíntesis de aflatoxinas en *A. parasiticus* como en *A. flavus*, y en *A. nidulans* en el caso de las Esterigmatocistinas, *afl-R* es regulador positivo de la transcripción para la activación de los genes relacionados a la biosíntesis.

El producto génico de *afl-R* posee un dominio de unión al DNA y corresponde a una proteína polipeptídica binuclear de zinc tipo gal4 de 47 kDa requerida para la activación transcripcional de la mayoría más no de todos los genes estructurales. La transcripción de las aflatoxinas puede ser iniciada cuando la proteína AFLR se une a la secuencia palindrómica 5'-TCGN₅-CGA-3' (también llamado motivo de unión) en la región promotora de los genes estructurales. El otro gen envuelto en la regulación de la biosíntesis es *afl-J*, que se encuentra adyacente a *afl-R* en el *cluster* de la biosíntesis de aflatoxinas. Se ha demostrado que *afl-J* interactúa con *afl-R* mas no con otros genes estructurales [47-50].

La ruta biosintética de OTA propuesta por Huff & Hamilton, basada en algunos artículos publicados previamente, postula tres distintas etapas en la biosíntesis de OTA [51]. La organización en un *cluster* de los genes de la ruta biosintética de OTA fue puesta de manifiesto por primera vez mediante la clonación de una secuencia que contenía tres genes adyacentes implicados en la biosíntesis de OTA en *P. nordicum* [52]. La ruta de biosíntesis de OTA en especies de *Aspergillus* es por el contrario muy poco conocida y solamente se ha identificado un gen codificador de una proteína poli-quetido sintasa PKS, implicado con seguridad en la biosíntesis de OTA en la especie *A. ochraceus*. Posteriormente, han sido descritos dos genes más pertenecientes a la superfamilia de citocromos P450, con elevada similitud a genes P450 fúngicos implicados en la ruta de biosíntesis de otras micotoxinas, y cuyos niveles de expresión se correlacionaban positivamente con la producción de OTA, en particular en uno de ellos (p450-B03). Sin embargo, su organización en un clúster no estaba confirmada [53,54].

FACTORES DETERMINANTES EN LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS DE ASPERGILLUS

La contaminación por micotoxinas pueda darse a nivel de campo o bien en post cosecha. Los factores que determinan la producción de micotoxinas pueden agruparse de la siguiente manera [55].

1. Factores intrínsecos, relacionados con la composición química y las propiedades físicas o biológicas del alimento. Se incluyen la composición de alimento en sí, actividad del agua, pH entre otros.

2. Factores extrínsecos o propios del ambiente donde se conserva el alimento. Entre estos se incluyen la temperatura de almacenamiento, humedad del ambiente, tensión de oxígeno, composición de la atmósfera de almacenamiento o del envase, y la presencia o ausencia de luz.
3. Factores relacionados a los tratamientos tecnológicos que ha estado sometido el producto. Estos tratamientos pueden ser físicos (principalmente térmicos), químicos y biológicos. Los primeros pueden tener efectos letales sobre los microorganismos, los segundos sobre la composición química del alimento.
4. Factores implícitos, que se refieren a las relaciones de dependencia o competencia entre los diferentes microorganismos que se encuentran en un alimento.

Interacciones fúngicas: las plantas son susceptibles a las infecciones por diferentes hongos micotoxigénicos. La especie dominante está estrictamente relacionada a las condiciones meteorológicas del área o región. Este factor ha sido aprovechado en el control biológico de estas especies por medio del uso de bacterias, levaduras, hongos y cepas no patogénicas de la misma especie [18,19,56–58]. *Aspergillus* es un hongo débil, y es mal competidor con otros hongos que crecen en el mismo sustrato bajo las mismas condiciones ambientales. En la competencia con la micobiota se puede alterar el metabolismo del hongo aflatoxigénico, por competencia por el sustrato o por la alteración de las condiciones ambientales de crecimiento, lo que puede inhibir la producción de aflatoxinas o crear un efecto sinérgico en su producción [59].

Insectos y daño al grano: uno de los factores de mayor relevancia en la epidemiología de *Aspergillus* es el daño físico resultado de la actividad de los invertebrados, el daño mecánico producido por la maquinaria agrícola, daño por aves y otros animales, etc. [18,19]. Los insectos pueden contribuir a la infección de 4 maneras: transporte del inóculo primario; movimiento de inóculo entre los granos; disseminación de esporas y propágulos; producción de daño que facilita la colonización de los hongos, proveyendo más sitios de infección y la subsecuente producción de micotoxinas [19,60].

Factores físicos: incluyen a la temperatura, la actividad del agua y la humedad relativa, tanto a campo como en post cosecha. Se han realizado una gran cantidad de estudios relacionados a múltiples combina-

ciones de temperaturas, actividades del agua, luz y sustratos sobre cepas de *Aspergillus* de las secciones Flavi, Circundati y Nigri, por muchos autores a lo largo de más de 40 años de investigación [61–65]. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de *Aspergillus* y la producción de micotoxinas son diferentes. *Aspergillus* tiene la capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas. A bajas temperaturas, las cantidades de aflatoxinas B y G son aproximadamente iguales; a temperaturas más elevadas la producción de aflatoxina B es predominante [66]. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* crecen desde un mínimo de temperatura de 10–12°C a 43–48°C; con un óptimo de entre 32°C y 33°C. Las aflatoxinas se producen a temperaturas de entre 12°C y 40°C, siendo el óptimo rango de producción entre 25°C y 30°C [18,55,63,67]. Se ha establecido la influencia de la temperatura sobre la vía de síntesis de las aflatoxinas. Los genes implicados en la biosíntesis de las aflatoxinas se expresan más a 28°C que a 37°C pero los genes *afl-R* y *afl-S* de la vía de síntesis no son afectados en su expresión a los 37°C, lo que indica que la inhabilidad de producir aflatoxinas por *Aspergillus* a 37°C no es causada por la no ocurrencia de la transcripción, sino probablemente a que a altas temperaturas AFLR no es funcional [68]. Para comprender mejor el efecto de la temperatura sobre la biosíntesis de las micotoxinas Yu y col. estudiaron el transcrito de *Aspergillus flavus* bajo condiciones de temperaturas diferentes [69]. Este enfoque permitió cuantificar la abundancia de transcripción de más del 80% de los genes que son expresados diferencialmente a los 30°C y 37°C. En promedio, la abundancia de transcripción para los genes de la biosíntesis aflatoxina fue 3300 veces mayor a 30°C que a 37°C. Los resultados son consistentes con la opinión de que las altas temperaturas afecta negativamente a la producción de aflatoxinas bajando la transcripción de los dos principales reguladores de la transcripción *afl-R* y *afl-S*.

En el caso de *Aspergillus ochraceus*, éste crece a temperaturas de entre 8°C y 37°C, con un óptimo de entre 24°C y 37°C. La OTA se produce entre 12°C y 37°C, siendo su óptimo de 24°C a 31°C. Los *Aspergillus* de la sección Nigri crecen entre un mínimo de 6–8°C y un máximo de 45–47°C, con un óptimo de 30–37°C [55,70]. *Aspergillus carbonarius* crece de 10°C a 42°C; la producción de OTA por *Aspergillus carbonarius* es posible entre 8°C y 37°C, con un óptimo a 20°C [55]. Otros autores afirman que *Aspergillus carbonarius* produce OTA en CYA en un rango de temperaturas de 15°C a 20°C mientras que *A. niger* lo hace de 20°C a 25°C a los 30 días de incubación [71].

Bennett y col estudiaron el efecto de la luz blanca en la producción de aflatoxinas en PDA, no encontrando diferencias significativas entre las cepas contrastadas bajo diferentes tiempos de exposición a la luz. Posteriormente los mismos autores estudiaron el efecto de la luz blanca sobre la producción de aflatoxinas, antraquinonas y esclerocios, y determinaron que la luz no tiene efecto sobre la síntesis de aflatoxinas pero que cepas expuestas a luz blanca continua no produjeron esclerocios [64]. Sin embargo, otros autores afirman que la luz tiene efecto inhibitorio en la síntesis de aflatoxinas. Indican que en *A. parasiticus* la producción de aflatoxinas está regulada en respuesta a la luz, pero que en el *cluster* de genes de las aflatoxinas no se han determinado los genes responsables de la respuesta en cascada a la luz.

En lo referente a la influencia de la luz en la producción de ocratoxinas, los resultados son también contradictorios. Aziz & Moussa indican que la producción de ocratoxinas en *Aspergillus ochraceus* fue considerablemente más alta en la luz que en la oscuridad [72], mientras que Belli y col. afirman que en *Aspergillus ochraceus* no hubo efecto significativo de la luz sobre la producción de OTA [22].

Actividad del agua (a_w): tiene un impacto significativo en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. El efecto de la actividad del agua está directamente relacionado con la temperatura. La humedad relativa mínima para el desarrollo de hongos aflatoxigénicos es de 85%, no existiendo un límite superior de humedad para la producción de estas toxinas. En el caso de los ocratoxigénicos, la humedad necesaria es menor [59,66]. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* crecen óptimamente a 0.99 de a_w . La mínima para *A. flavus* es específicamente de 0.996 a_w siendo la a_w mínima para su crecimiento de 0.80 a 0.83, aunque se reporta hasta 0.88 para *A. flavus* a 33°C; 0.82 a 25°C, 0.81 a 30°C y 0.80 a 37°C. Las aflatoxinas se producen entre 0.95 a 0.99, aunque se han reportado valores de 0.82 de a_w para *A. flavus* [55,73,74]. *Aspergillus ochraceus* crece desde valores de 0.77 de a_w y produce OTA a una mínima de 0.80 de a_w . Para *A. carbonarius*, la óptima tanto para crecimiento como para producción de OTA está entre 0.93 a 0.98 de a_w , dependiendo de la cepa [55,75]. *Aspergillus niger* se crece desde 0.77 a_w a 35°C [76].

Los hongos son capaces de crecer en un amplio rango de pH, normalmente entre 3 y 8, siendo su óptimo de 5. El cambio del valor del pH de un sustrato puede alterar la respuesta del hongo al resto de los fac-

tores. *Aspergillus* tolera mal los valores de pH muy bajos (2–3) y tolera mejor valores de pH alcalinos [55]. Esteban y col. reportaron cepas de la sección Nigri que crecieron desde pH 2 a 3 hasta pH 10 en CYA y YES [71]. *A. ochraceus* se desarrolla bien en pH 3 a 10 y desde valores tan bajos como 2.2 [77]. La relación entre la producción de aflatoxinas B1/G1 es de 3.0 a pH de 3.5 mientras que a pH de 5.5 es de 0.5. *Aspergillus flavus* crece entre un rango de pH de 2.1 a 11.2, a 25, 30 y 37°C, con un crecimiento óptimo en un rango de 3.4 a 10 [77]. La producción de aflatoxina G es más dependiente del pH que la aflatoxina B, no produciéndose a valores de pH de 2.5. Se ha establecido mediante QPCR la influencia del pH en la expresión de 6 genes de la vía de síntesis de las aflatoxinas, habiéndose encontrado que la expresión de la mayoría de estos genes es inversamente proporcional a la acumulación de aflatoxinas [55]. En hongos filamentosos (v.g., *Aspergillus nidulans*) la expresión de genes regulados por el pH del ambiente se clasifica en 3 categorías: los que participan en la secreción de enzimas; los que participan en las permeasas de codificación; y los que codifican enzimas que participan en la síntesis de metabolitos exportados. La regulación del pH es mediada principalmente por siete genes *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, y *pali* [78]. Con excepción de *palB*, en los genes *pal* el análisis de las secuencias de aminoácidos de sus productos da muy pocas pistas de las funciones moleculares, sugiriendo que la vía de señalización es aún novel.

Las especies de *Aspergillus* son aerobias, y a niveles de 1% de oxígeno en el ambiente se detiene su desarrollo y por ende la producción de toxinas. Concentraciones de CO₂ mayores a 20% inhiben la germinación de las esporas. Concentraciones de 10% suprimen la producción de aflatoxinas. Concentraciones de oxígeno menores a 20% y mayores a 90% también inhiben la concentración de aflatoxinas y ocratoxinas [59,66,79–81]. Ácidos orgánicos (v.g., ácido propiónico, ácido sórbico) y sus sales son fungistáticos e inhiben el crecimiento de *Aspergillus* y la producción de toxinas. Aceites esenciales de plantas como *Cinnamomum zeylanicum* Blume y *Thymus vulgaris* han mostrado efecto fungistático sobre el hongo *A. flavus* [66].

La producción de aflatoxinas y OTA ha sido estudiada con relación a diferentes sustratos en lo referente a fuentes de carbono, nitrógeno, metales, etc. Se ha demostrado la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de aflatoxinas y ocratoxinas. Se ha descrito que para una determinada cepa de hongo micotoxigénico la cantidad de toxina que es producida es función del sustrato. Se ha demostrado que la

producción de OTA por *Aspergillus ochraceus* es superior en leguminosas que en cereales. En el mismo hongo se ha demostrado que no existe una influencia significativa entre el sustrato de origen de la cepa y la producción de OTA en medios sintéticos, en YES o en medios con café, cebada o uvas [55].

REGLAMENTACIÓN

En varias regiones y países del mundo se ha reglamentado el contenido máximo de micotoxinas permitido en alimentos, tanto frescos como procesados. Entre ellos se pueden citar el Reglamento de la Unión Europea que regula el contenido de aflatoxinas en alimentos [82]; el Reglamento Mundial de Micotoxinas que regula el contenido de micotoxinas en alimentos y raciones [83], entre otros.

Mundialmente, al menos 99 países tenían reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las raciones en el año 2003, un aumento de aproximadamente 30% comparado con 1995. La población total en estos países representa aproximadamente 87% de los habitantes del globo. En 1995, el 23% de la población mundial vivía en una región en la que no estaba vigente ningún reglamento conocido para las micotoxinas. Este porcentaje había disminuido al 13% en el año 2003, en razón de un ligero aumento en América Latina y Europa e incrementos más significativos en África y Asia/Oceanía [83]. El último reglamento propuesto por la Unión Europea para contenidos máximos de OTA permitidos en productos alimentarios es del año 2006. En la actualidad, se ha establecido una ingesta semanal tolerable de OTA de 120 ng/kg de peso corporal [82].

PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS

Las medidas de control de las micotoxinas son fundamentales y pueden ser clasificadas dentro de las categorías principales: prevención de la contaminación y del crecimiento fúngico y detoxificación de los compuestos tóxicos producidos por los hongos [84].

Prevención de la Contaminación y el Crecimiento Fúngico

La prevención de la contaminación por hongos toxigénicos y su crecimiento puede ser manejada por medio de la mejora de las prácticas agrícolas. Muchas

micotoxinas, en particular las aflatoxinas, pueden formarse durante el período de crecimiento de las plantas en el campo. Para prevenir esta contaminación, es necesario que se mejoren las prácticas agrícolas, entre otras, usando semillas de calidad y libres de hongos, impidiendo el ataque de los insectos y las enfermedades de las plantas [84,85].

Durante el proceso de cosecha es importante que se evite al máximo lesionar físicamente el cereal, pues el daño mecánico está invariablemente asociado con una rápida invasión de hongos. Otro factor importante en el proceso de cosecha es la limpieza de los cereales, pues los residuos que quedan adheridos pueden ser portadores de especies fúngicas micotoxigénicas. También, para prevenir la contaminación fúngica es importante implantar buenas prácticas de almacenamiento y buenas condiciones ambientales que impidan el ataque de los hongos [84,85].

La contaminación de las cosechas puede ser prevenida o disminuida usando ácidos como el ácido benzoico, ácido sórbico, ácido propiónico, ácido fórmico y ácido acético. Pequeñas concentraciones de estos fungicidas en los alimentos deben ser efectivas a un pH levemente superior al del producto. Por el contrario, la utilización de estos ácidos en bajas concentraciones puede llevar al riesgo de que se produzca un incremento en la capacidad toxigénica de determinados hongos [5,86,87].

El genoma de las plantas tiene influencia notable sobre las contaminaciones fúngicas y en la subsecuente biosíntesis de micotoxinas. De ahí la importancia de desarrollar nuevas variedades, mediante la ingeniería genética, capaces de resistir el ataque de los hongos o inhibir la producción de toxinas. El manejo de la llamada "resistencia" o tolerancia a ciertos hongos productores de micotoxinas se dificulta debido a que en muchos casos, como en *Aspergillus* o *Fusarium*, la resistencia es poligénica y cuantitativa [88,89].

El almacenamiento de las cosechas tiene un papel importante en la calidad físico-química y microbiológica de las mismas. Las especies fúngicas que se desarrollan en un ambiente dado dependen de la humedad, la temperatura, la presencia de microorganismos competidores y de la naturaleza y el estado fisiológico del producto. Estos y otros factores influyen decisivamente en el metabolismo fúngico y en la capacidad para que los hongos utilicen los alimentos para el crecimiento y producción de sus metabolitos [5,77,81].

El mejor método para controlar la contaminación de los alimentos por micotoxinas es la prevención, pero cuando el producto ya está contaminado y va a ser

usado como alimento, es necesario eliminar o disminuir esta contaminación. Un programa para evitar la producción de micotoxinas incluye la prevención de biosíntesis y metabolismo de toxinas en el campo y en el almacenamiento. La descontaminación después de la producción de micotoxinas se refiere al tratamiento post cosecha para remover, destruir o reducir el efecto tóxico. Es difícil impedir la formación de micotoxinas en el campo o en las bodegas. El monitoreo puede impedir que las micotoxinas se vuelvan una fuente significativa de riesgos para la salud, pues el conocimiento de la contaminación permite la adopción de medidas estratégicas para minimizar el riesgo. Las estrategias adoptadas en la pre o post cosecha serán apropiadas y dependerán principalmente de las condiciones climáticas de cada año en particular. El comprender los factores ambientales que promueven la infección, crecimiento y producción tóxica es un paso importante para un plan efectivo que busque minimizar la ocurrencia de micotoxinas en alimentos y en raciones.

La FAO estableció una serie de criterios para determinar si el proceso de descontaminación es apropiado o no; dentro de estos se deben tener en cuenta [87,90]:

- Destruir, inactivar o eliminar la toxina.
- No producir residuos tóxicos o carcinogénicos en los productos finales o en alimentos obtenidos a partir de animales que se alimentaron de una dieta detoxificada.
- Mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto.
- No alterar las propiedades tecnológicas importantes de forma significativa.
- Destruir todas las esporas y micelios fúngicos para que no puedan, en condiciones favorables, proliferar y producir nuevas micotoxinas.

CONCLUSIÓN

Los *Aspergillus* son un género que actualmente se ha tornado importante desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria y de la salud humana debido a su propiedad de producir micotoxinas, sobre todo aflatoxinas y ocratoxinas. La producción de aflatoxinas y ocratoxinas han sido reguladas por varios países. Es por tanto fundamental desde el punto de vista técnico el conocimiento de los *Aspergillus*. Su correcta identificación, el conocimiento de la biosíntesis de las toxinas producidas por ellos, permitirá la aplicación de medidas para la identificación de los principales puntos de riesgo de contaminación a nivel de campo, procesamiento de productos, transporte y vida de anaquel y a través de esto la disminución del riesgo de exposición a estas toxinas por los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Ing. For. César Cardozo Román, Director – DGICT-UNA; Dra. Inocencia Peralta López, Directora – CEMIT-DGICT-UNA; Lourdes Romero, Estudiante de Maestría en Biotecnología, CEMIT-DGICT-UNA; y Lourdes Martínez, Pablo Arrúa, Sara Nuñez, Iniciación Científica, CEMIT-DGICT-UNA

RECONOCIMIENTOS

No se ha recibido financiamiento externo para la realización de este trabajo. Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Lopez-Garcia R, Park D, Phillips T. Integrated mycotoxin management systems. *Food, Nutrition and Agriculture* 1999;23:38–48.
2. Goldblatt, L. A. Implications of mycotoxins. *Clin Toxicol* 1972;5:453–464.
3. Soriano JC, Burdaspal P. Aflatoxinas del grupo B y G. En: Soriano J (Ed). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos: Madrid. 2007; p. 396.
4. Bennett J, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16:497–516.
5. Fokunang C, Tembe-Fokunang E, Tomkins P, Barkwan S. Global impact of mycotoxins on human and animal health management. *Outlook on Agriculture* 2006;35:247–253.
6. Ruíz M, Font G. Toxicidad y evaluación de riesgos. En: Soriano J (Ed). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos; Madrid. 2007; p. 396.
7. Samson R, Pitt J. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. CRC Press: Holanda. 2000; p. 510.
8. Rodrigues P, Soares C, Kozakiewicz Z, Paterson R, Lima N, Venâncio A. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. En: A. Méndez-Vilas (Ed). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. FORMATEX: Badajoz. 2007; p. 527–534.
9. Geiser D, Klich M, Frisvad J, Peterson S, Varga J, Samson R. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 2007;59:1–10.
10. Rokas A, Payne G, Fedorova N, Baker S, Machida M, Yu J, et al. 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology* 2007;59:11–17.
11. Frisvad J, Larsen T, de Vries R, Meijer M, Houbraken J, Cabañes F, et al. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology* 2007;59:31–37.
12. Kurtzman CP, Horn BW, Hesseltine CW. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1987;53:147–158.
13. Ito Y, Peterson S, Wicklow D, Goto T. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 2001;105:233–239.
14. Peterson S, Ito Y, Horn B, Goto T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 2001;93:689–703.
15. Cabañes F, Bragulat M, Castellá G. Especies productoras de micotoxinas. En: Soriano, J (Ed). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos: Madrid. 2007; p. 396.
16. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 2007;59:53–66.
17. Samson R, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad J, Varga J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology* 2007;59:129–145.
18. Diener U, Cole R, Sanders T, Payne G, Lee L, Klich M. Epidemiology of Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 1987;25:249–270.
19. Giorni P. Impact of environmental and plant factors on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in Italy [Tesis]. Cranfield University: Roma. 2007; p. 281 p.
20. Leong S, Hocking A, Scott E. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology* 2006;110:209–216.
21. Leong S, Hocking A, Scott E. Survival and growth of *Aspergillus carbonarius* on wine grapes before harvest. *International Journal of Food Microbiology* 2006;111(Suppl 1):S83–S87.
22. Bellí N, Ramos A, Sanchis V, Marín S. Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiology* 2006;23:622–627.
23. Bellí N, Marín S, Sanchis V, Ramos A. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 2004;96:19–27.

24. Drusch S, Ragab W. Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits. *Journal of Food Protection* 2003;66:1514–1527.
25. Barkai-Golan R. Species of *Aspergillus* causing post-harvest fruit decay in Israel. *Mycopathologia* 1980;71:13–16.
26. Snowdon A. Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 2. Manson Publishing: Londres. 2002; p. 417.
27. Raper K, Fennell D. The genus *aspergillus*. Williams & Wilkins: Baltimore. 1965; p. 686.
28. Butler P. Acute and Chronic Effects of Aflatoxin on the Liver of Domestic and Laboratory Animals: A Review. *Cancer Research* 1969;29:250.
29. Butler W, Barnes J. Toxic effects of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea-pigs. *British Journal of Cancer* 1963;17:699.
30. Wogan G. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1966;30:460.
31. Vaamonde G, Patriarca A, Fernández Pinto V, Comerio R, Degrossi C. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus section flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 2003;88:79–84.
32. Bucio-Villalobos C, Guzmán-de-Peña D, Peña-Cabriales J. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001;18:83–87.
33. Varma SK, Verma RAB. Aflatoxin B1 production in orange (*Citrus reticulata*) juice by isolates of *Aspergillus flavus* link. *Mycopathologia* 1987;97:101–104.
34. Wicklow D, Cole R. Tremorgenic indole metabolites and aflatoxins in sclerotia of *Aspergillus flavus* : an evolutionary perspective. *Canadian Journal of Botany* 1982;60:525–528.
35. Payne G, Brown M. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual review of phytopathology* 1998;36:329–362.
36. Van der Merwe K, Steyn P, Fourie L. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *J Chem Soc* 1965;7083–7088.
37. Van der Merwe K, Steyn P, Fourie L, Scott DB, Theron J. Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965;205:1112–1113.
38. Van Walbeek W, Scott PM, Harwig J, Lawrence JW. *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Can J Microbiol* 1969;15:1281–1285.
39. Dirheimer G. Ochratoxine humaine et ses pathologies (I. national de la santé et de la recherche médicale (France). John Libbey Eurotext: Paris. 1993; p. 276.
40. López A, Soriano J. Ochratoxina A. En: Soriano J (Ed). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos: Madrid. 2007; p. 396.
41. Krogh P. Role of ochratoxin in disease causation. *Food and Chemical Toxicology* 1992;30:213–224.
42. Varga J, Kocsubé S, Péteri Z, Vágvölgyi C, Tóth B. Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins* 2010;2:1718–1750.
43. Yabe K, Nakamura M, Hamasaki T. Enzymatic Formation of G-Group Aflatoxins and Biosynthetic Relationship between G- and B-Group Aflatoxins. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3867–3872.
44. Linz J, Chanda A, Hong S, Whitten D, Wilkerson C, Roze L. Proteomic and Biochemical Evidence Support a Role for Transport Vesicles and Endosomes in Stress Response and Secondary Metabolism in *Aspergillus parasiticus*. *J Proteome Res* 2011;11:767–775.
45. Hong S, Linz J. Functional expression and subcellular localization of the aflatoxin pathway enzyme Ver-1 fused to enhanced green fluorescent protein. *Applied and environmental microbiology* 2008;74:6385.
46. Bhatnagar D, Cleveland T, Kingston D. Enzymological evidence for separate pathways for aflatoxin B1 and B2 biosynthesis. *Biochemistry* 1991;30:4343–4350.
47. Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich K. Aflatoxin biosynthesis. *Revista iberoamericana de micología* 2002;19:191–200.
48. Yu J, Chang P, Ehrlich K, Cary J, Bhatnagar D, Cleveland T, Payne G, Linz J, Woloshuk C, Bennett J. Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70:1253–1262.

49. Chang P. The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Molecular Genetics and Genomics* 2003;268:711–719.
50. Chang P, Skory C, Linz J. Cloning of a gene associated with aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Current Genetics* 1992;21:231–233.
51. Huff W, Hamilton P. Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: Ochratoxins-metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection* 1979;42:815–820.
52. Karolewicz A, Geisen R. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 2005;28:588–595.
53. O'Callaghan J, Caddick M, Dobson A. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 2003;149:3485–3491.
54. O'Callaghan J, Stapleton P, Dobson A. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology* 2006;43:213–221.
55. Sanchis V, Marín S, Ramos A. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. En Soriano J (Ed). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos: Madrid. 2007; p. 63–90.
56. Wicklow D, Hesseltine C, Shotwell O, Adams G. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 1980;70:761–764.
57. Nout M. Effect of *Rhizopus* and *Neurospora* spp. on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and accumulation of aflatoxin B1 in groundnut. *Mycological Research* 1989;93:518–523.
58. Cotty P. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 1994;84:1270–1277.
59. Moreno Martínez E, Gil M. 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, DF. 1991; p. 42.
60. Mazzani C, Luzón O, Chavarri M. *Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela. *Entomotropica* 2004;19:157–159.
61. Schindler A, Palmer J, Eisenberg W. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 1967;15:1006.
62. Joffe A, Lisker N. Effects of Light, Temperature, and pH Value on Aflatoxin Production In Vitro. *Applied Microbiology* 1969;18:517–518.
63. Northolt M, Verhulsdonk C, Soentoro P, Paulsch W. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Milk and Food Technology* 1976;39:170–174.
64. Bennett J, Dunn J, Goldsman C. Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 1981;41:488–491.
65. Holmquist G, Walker H, Stahr H. Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Food Science* 1983;48:778–782.
66. Moreno J. 2004. Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura [Tesis]. UNAM. Facultad de Estudios Superiores de Postgrado: Cuautitlán Izcali, Estado de México. 2004.
67. Lin Y, Ayres J, Koehler P. Influence of temperature cycling on the production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 1980;40:333–336.
68. O'Brien G, Georgianna D, Wilkinson J, Yu J, Abbas H, Bhatnagar D, et al. The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia* 2007;99:232–239.
69. Yu J, Fedorova N, Montalbano B, Bhatnagar D, Cleveland T, Bennett J, et al. Tight control of mycotoxin biosynthesis gene expression in *Aspergillus flavus* by temperature as revealed by RNA-Seq. *FEMS Microbiology Letters* 2011;322:145–149.
70. Panasenko VT. Ecology of microfungi. *The Botanical Review* 1967;33:189–215.
71. Esteban A, Abarca M, Bragulat M, Cabañes F. Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology* 2004;155:861–866.

72. Aziz N, Moussa L. Influence of white light, near-UV irradiation and other environmental conditions on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* and ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Nahrung* 1997;41:150–154.
73. Ayerst G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 1969;5:127–141.
74. Pitt J, Miscamble B. Water Relations of *Aspergillus flavus* and Closely Related Species. *Journal of Food Protection* 1995;58: 86–90.
75. Ramos AJ, Labernia N, Marín S, Sanchis V, Magan N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology* 1998;44:133–140.
76. Pitt J, Hocking A. *Fungi and Food Spoilage*. Springer: New York. 2009; p. 524.
77. Blackburn C. *Food spoilage microorganisms*. Woodhead: Cambridge. 2006; p. 712.
78. Peñalva M, Arst H. Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002;66:426–446.
79. Scussel V, Tanello A, Giordano B, Manfio D, Galvão S, Rodrigues M. Effect of oxygen reducing atmospheres on the quality and safety of stored shelled Brazil nut packs. *Julius-Kühn-Archiv* 2010;0:S560.
80. Magan N, Aldred D, Mylona K, Lambert RJW. Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2010;27:644–650.
81. Costa C, Lucera A, Conte A, Mastromatteo M, Speranza B, Antonacci A, Del Nobile M. Effects of passive and active modified atmosphere packaging conditions on ready-to-eat table grape. *Journal of Food Engineering* 2011;102:115–121.
82. CE (Comisión Europea). Reglamento (CE) Nº 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. 2006. Disponible en:
83. http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21290_es.htm
84. Van Egmond H, Jonker M. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. *Food & Agriculture Organization*: 2004; p. 47.
85. Requena F, Saume E, León A. Micotoxinas, riesgos y prevención. *Zoot Trop* 2005;23:393–410.
86. Udagawa S. Fungal spoilage of foods and its risk assessment. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005;46:11–15.
87. Bhat R, Miller J. Mycotoxins and food supply [Internet]. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.1991. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/u3550t/u3550t0e.htm>.
88. Suttajit M. Mycotoxin prevention and control in foodgrains - Prevention and control of mycotoxins. *FAO*. 1999. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E0q.htm>
89. Lin F, Xue S, Zhang Z, Zhang C, Kong Z, Yao G, et al. Mapping QTL associated with resistance to *Fusarium* head blight in the Nanda2419 x Wangshuibai population. II: type I resistance. *Theor Appl Genet* 2006;112:528–535.
90. Christians J, Cheema M, Vergara I, Watt C, Pinto L, Chen N, et al. Quantitative trait locus (QTL) mapping reveals a role for unstudied genes in *Aspergillus* virulence. *PLoS ONE* 2011;6:e19325.
91. López R, Park D, Phillips T. *Food, nutrition and agriculture 23 Integrated mycotoxin management systems*. *FAO, Document Repository*. *FAO: Roma*. 1999; p. 5.