



EVALUACIÓN DEL POTENCIAL AFLATOXIGÉNICO DE AISLADOS DE *Aspergillus flavus* EN MODELO DE MAÍZ *IN VITRO*

Evaluation of aflatoxigenic potential of *Aspergillus flavus* isolates in maize *in vitro*

Juliana MOURA-MENDES^{1*} ; Cinthia Carolina CAZAL-MARTINEZ^{1,2} ; Cinthia ROJAS^{1,2} ; Andrea Alejandra ARRUA^{1,2} 

¹ Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo 111421, Paraguay.

² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo 111421, Paraguay.

*For correspondence jmendes@rec.una.py

Received: 24th June 2021. Returned for revision: 30th November 2021. Accepted: 10th December 2021.

Associate Editor: Carolina Firacative

Citation/ citar este artículo como: Moura-Mendes, J., Cazal-Martínez C.C., Rojas, C. y Arrua, A.A. (2023). Evaluación del potencial aflatoxigénico de aislados de *Aspergillus flavus* en modelo de maíz *in vitro*. *Acta Biológica Colombiana*, 28(1), 135-142. <https://doi.org/10.15446/abc.v28n1.96919>

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos para salud humana y animal producidos por *Aspergillus flavus*, y que contaminan a los alimentos a lo largo de la cadena productiva. Conocer y caracterizar la población fúngica presente en los alimentos nos sirve para estimar riesgo y diseñar medidas para mitigarlo. Siendo así, el objetivo de este trabajo es caracterizar el potencial toxigénico de aislados de *Aspergillus* provenientes de maíz en modelos *in vitro*. Para tal fin, se utilizaron dos aislados de *A. flavus* (CCM-AS02, CCM-AS29) y uno de *Aspergillus luchuensis* (CCM-AS04) de la colección de cultivos CCM-UNA. Para evaluar la producción de aflatoxinas en medio de cultivo sintético, se sembraron los aislados en agar coco y agar extracto de levadura y se evaluó la presencia de fluorescencia bajo luz UV ($\lambda = 360$ nm). Para determinar el tipo de aflatoxina, se realizó cromatografía en capa delgada. Por último, se realizó la infección *in vitro* con los aislados en estudio, de maíz avatí-morotí, adquirido comercialmente y se determinó la concentración de aflatoxinas con la prueba de inmunoensayo rápido de flujo lateral Afla - V[®]-VICAM[®]. Con los resultados obtenidos se puede concluir que los aislados de *A. flavus* CCM-AS02 y CCM-AS29 provenientes de maíz son aflatoxigénicos en las condiciones ambientales que simulan las naturales y que coinciden con las predominantes en nuestro país, por ello, es necesario crear conciencia del riesgo que representa la contaminación de los granos de maíz con *Aspergillus* y aflatoxinas y la necesidad de tomar medidas preventivas de control de este hongo.

Palabras clave: Aflatoxinas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus luchuensis*, metabolitos secundarios, micotoxinas, Paraguay.

ABSTRACT

Aflatoxins are secondary metabolites toxic to human and animal health produced by *Aspergillus flavus*, and which contaminate food throughout the production chain. Knowing and characterizing the fungal population present in food helps us to estimate risk and design measures to mitigate fungal contamination. Thus, the objective of this work was characterizing the toxigenic potential of *Aspergillus* isolates from corn in *in vitro* models. For this purpose, two isolates of *Aspergillus flavus* (CCM-AS02, CCM-AS29) and one of *Aspergillus luchuensis* (CCM-AS04) from the CCM-UNA culture collection were used. To evaluate the production of aflatoxins in synthetic culture medium, the isolates were plated on coconut agar and yeast extract agar, and the presence of fluorescence was evaluated under UV light ($\lambda = 360$ nm). To determine the type of aflatoxin, a thin layer chromatography was performed. Finally, an *in vitro* infection was carried out with the isolates under study, from avatí-morotí maize, acquired commercially, and the aflatoxin concentration was determined with the Afla-V[®]-VICAM[®] lateral fluid rapid immunoassay kit. With the results obtained, it can be concluded that the isolates of *A. flavus* CCM-AS02 and CCM-AS29 from corn are aflatoxigenic under environmental conditions that simulate natural ones and that coincide with the predominant ones in our country, therefore, it is necessary to create awareness of the risk posed by the contamination of corn grains with *Aspergillus* and aflatoxins in our region and the need to take preventive measures to control this fungus.

Keywords: Aflatoxins, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus luchuensis*, secondary metabolites, mycotoxins, Paraguay.



INTRODUCCIÓN

Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios termoestables (> 300°C) producidos por los hongos cosmopolitas y ubicuos del género *Aspergillus*. Son difuranocumarinas que pueden causar intoxicaciones agudas y crónicas en humanos y animales, con comprobado efecto hepatotóxico, teratogénico, carcinogénico e inmunotóxico (IARC, 2012; Arrua *et al.* 2013; Benkerroum, 2019; Kumar *et al.* 2021), siendo las principales AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 y la AFM1, que es biotransformada a partir de la AFB1 en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y excretada por la leche (Kumar *et al.* 2017; Patriarca y Fernandez Pinto, 2017; Arrúa *et al.* 2021).

Aspergillus flavus es la principal especie productora de estas aflatoxinas, y posee la capacidad adaptativa de crecer y desarrollarse en diferentes sustratos y en amplio rango de pH, temperaturas (12° C - 48° C), siendo ideal 28° C - 37° C, en ambientes con humedad superior al 80 %. A pesar de esto, la producción de micotoxinas se da bajo condiciones específicas y es multifactorial, dependiendo de la capacidad toxigénica de la cepa, la microbiota asociada, la temperatura, humedad, actividad de agua y composición química del sustrato, disponibilidad de oxígeno y tiempo de almacenamiento (Arrua *et al.* 2013; Kumar *et al.*, 2017).

El maíz es un producto altamente susceptible a la contaminación por *Aspergillus* tanto en campo como durante el almacenamiento, y esto, representa el principal factor de riesgo de contaminación por aflatoxinas (Patriarca y Fernandez Pinto, 2017; Taniwaki *et al.*, 2019).

Un aspecto relevante de este estudio es que el maíz en Paraguay tiene relevancia social, económica y cultural, siendo ingrediente de platos tradicionales consumidos de manera regular por las familias, especialmente en el campo, como lo son el vori-vori, la sopa paraguaya, polenta, mbeju entre otros (Salhuana y Machado, 1999), por tanto el consumo de estos productos contaminados con *Aspergillus* y sus micotoxinas podría representar un riesgo para los consumidores, especialmente en países como Paraguay, donde los controles de micotoxinas son casi inexistentes o nulos. Es por estas razones que conocer las características del agente causal, en este caso, *A. flavus*, ayudará a diseñar estrategias de mitigación, reduciendo los niveles de contaminación fúngica y consecuentemente disminuyendo el riesgo de contaminación por sus micotoxinas (Perrone *et al.*, 2014; Probst y Cotty, 2012). Los aislados de *A. flavus* se destacan por la amplia variabilidad intra-especie que presentan, siendo así necesario además de identificarlos de forma correcta, caracterizar su capacidad de producir aflatoxinas (Okoth *et al.*, 2018; Probst *et al.*, 2014).

Para la detección de micotoxinas en alimentos u otras matrices es necesario seleccionar técnicas que posean alto grado de exactitud, precisión y reproducibilidad. Actualmente existen varios métodos normalizados de análisis que cumplen con estas exigencias, recomendados

por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales – AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (Lattanzio *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2015).

Las aflatoxinas tienen la ventaja de presentar fluorescencia natural, y esta característica, puede ser utilizada para su detección bajo luz ultravioleta (UV), este hecho, fue determinante en la detección y clasificación de las aflatoxinas. La AFB y AFG se denominan así por presentar fluorescencia *blue* (azul) y G, por presentar fluorescencia *Green* (verde), respectivamente, en el método de cromatografía en capa delgada – CCD (Shephard, 2009; Zhang *et al.*, 2018).

Para evaluar la capacidad aflatoxigénica se pueden ensayar diferentes sustratos, como medios de cultivo y sus diferentes composiciones, granos directamente *in vitro* o *in vivo* o bien utilizar técnicas cromatográficas e inmunoensayos para detección y cuantificación de las aflatoxinas (Probst y Cotty, 2012).

Considerando estos aspectos, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de producir aflatoxinas de aislados de *Aspergillus* en medios de cultivo sintéticos y en modelo *in vitro* con granos de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados fúngicos

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-UNA), Paraguay.

Aislados de *Aspergillus* provenientes de maíz avatí-morotí y que pertenecen a la Colección de Cultivos de Microorganismos de la Universidad Nacional de Asunción - CCM-UNA (FELACC, SI-70) fueron seleccionados para este estudio.

Se reactivaron dos aislados de *A. flavus* (CCM-AS02, CCM-AS29) y un aislado de *Aspergillus luchuensis* (CCM-AS04) que fueron cultivados en cajas de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) e incubados a 25 °C, por cinco días. Estos organismos, previamente identificados morfológicamente, mediante el uso de la clave de identificación de Klich, 2009 (Klich y Pitt, 2009) y molecularmente mediante la secuenciación parcial de ITS1,4 y calmodulina (CaM) (Samson *et al.*, 2014) poseen secuencias depositadas en GenBank (Tabla 1).

CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL AFLATOXIGÉNICO DE LOS AISLADOS DE *Aspergillus* SPP. EN MEDIOS DE CULTIVO:

Screening de aflatoxinas

Para el *screening* de la producción de aflatoxinas fueron sembrados explantes de 0,5 cm de diámetro en cajas de Petri con agar coco (AC) y agar extracto de levadura y

Tabla 1. Producción de aflatoxinas en medio de cultivo Agar-Coco (AC) y YES y determinación del tipo de aflatoxina por Cromatografía en Capa Delgada - CCD.

Aislados	Producción de AF		Tipo de AF	Identificación morfológica	Identificación molecular	
	AC	YES	CCD		ITS [#]	CaM [#]
CCM-AS02	I	-	-	<i>Aspergillus flavus</i>	MN478355	MN443160
CCM-AS04	I	-	-	<i>Aspergillus luchuensis</i>	ND	MN604190
CCM-AS29	I	+	AFB1	<i>Aspergillus flavus</i>	MN481413	MN604186

I: Inconclusa. + presencia de fluorescencia, - ausencia de fluorescencia bajo luz UV ($\lambda = 360$ nm). AFB1: Aflatoxina B1. ND: no determinado.

[#]número de acceso en Genbank

sacarosa (YES - por su nomenclatura en inglés *Yeast Extract Sucrose*) que se incubaron a 25 ± 2 °C por un periodo de siete días en ausencia de luz. La fluorescencia presentada por los crecimientos fúngicos fue visualizada bajo luz UV ($\lambda = 360$ nm) (Davis *et al.*, 1987; Sepúlveda y Piontelli, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2017).

Análisis cualitativo de la producción de aflatoxinas

Primeramente, fue sembrado 1 μ L de suspensión fúngica semilíquida de los aislados de *A. flavus* (CCM-AS02, CCM-AS29) y *A. luchuensis* (CCM-AS04) preparada con agar 0,2 % en cajas de Petri (90 mm) con el medio de cultivo YES. Se incubaron por siete días a 25 ± 2 °C en ausencia de luz (Filtenborg *et al.*, 1983).

Fue utilizado para el ensayo el método rápido de Filtenborg *et al.*, (1983), que se basa en la cromatografía en capa delgada (CCD) para determinar el tipo de aflatoxina producida y fue realizado de dos maneras:

a) Se aplicó directamente un explante de 5 mm de diámetro con micelio fúngico en la placa de CCD, previamente activada.

b) Se sembraron 10 μ L de los extractos obtenidos de la mezcla de tres explantes con micelio fúngico y 1 mL de cloroformo P.A. en la placa de CCD.

Se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel 60 G F₂₅₄ (20 x 20 cm, 0.25 mm espesor, Merck5721, Alemania). La fase móvil utilizada fue cloroformo: acetona (90:10, v:v). Los estándares de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 fueron utilizados en la concentración de 1 μ g/mL. Las placas fueron reveladas con luz UV ($\lambda = 360$ nm).

Por último, se calculó el factor de retención y se comparó, en cada corrida, con los estándares (Pildain *et al.*, 2005; Ritter *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2007). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Infección *in vitro* de maíz

Para evaluar el potencial aflatoxigénico de los aislados de *Aspergillus* en maíz *in vitro*, se preparó suspensión fúngica con agua destilada estéril de cada aislado (CCM-AS02, CCM-AS04 y CCM-AS29) equivalente a $1-5 \times 10^7$ esporas/mL, que fue cuantificada en cámara de Neubauer.

Los granos de maíz avatí-morotí, recién adquiridos del mercado fueron previamente esterilizados por autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos. Para el ensayo fueron colocados en frascos de vidrio, 10 g de maíz por repetición, cubiertos con una película delgada de polietileno (para reducir la pérdida de humedad del grano) y fueron realizadas pequeñas perforaciones para facilitar el intercambio gaseoso (Bucio-villalobos *et al.*, 2001; Moreno Martínez *et al.*, 2000), con un total de seis repeticiones por tratamiento.

Se inocularon las unidades experimentales con 1 mL de las suspensiones fúngicas más 4 mL de agua destilada estéril, y posteriormente, los frascos fueron incubados a 27 ± 3 °C por diez días. El tratamiento control fue realizado mediante adición de 5 mL de agua destilada estéril.

Cuantificación de aflatoxinas

El contenido de aflatoxinas totales (AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2) se determinó utilizando la prueba de inmunoensayo rápido de flujo lateral Afla-V[®]-VICAM[®] para granos de maíz, cuyo rango de cuantificación es 2 - 100 ppb y límite de detección de 2 ppb. La extracción de aflatoxinas totales se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación (VICAM, 2017). Se pesaron 5 g de granos de maíz, a los cuales se les adicionó una solución de 25 mL de metanol al 70 % y se agitaron por dos minutos.

Posteriormente, se filtró el sobrenadante y se transfirió 100 μ L del extracto de cada muestra a un microtubo de 2 mL. Se adicionó 100 μ L del Afla-V diluyente y se agitó en el vórtex. Por último, se transfirió 100 μ L de esta mezcla al Afla-V *strip test*, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura en el equipo Vertu[™] Lateral Flow Reader. En el caso de valores por encima del rango de cuantificación de la técnica, se realizaron diluciones con metanol al 70 % y se repitieron los pasos anteriores desde la utilización del Afla-V diluyente. Finalmente, se multiplicaron los resultados obtenidos por el factor de dilución para determinar la concentración de aflatoxinas de las muestras en ppb.

Análisis estadístico:

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) soportado por las múltiples comparaciones de

Tukey y fue considerado significativo cuando el $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados con GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows, GraphPad® Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

RESULTADOS

En la tabla 1 se visualizan los resultados obtenidos del *screening* de la producción de aflatoxinas en medio de cultivo AC y YES, sin embargo, con el medio de cultivo AC el resultado se consideró inconcluso ya que no fue posible distinguir la presencia/ausencia de fluorescencia bajo luz UV ($\lambda = 360\text{nm}$).

A. flavus CCM-AS29 produjo fluorescencia correspondiente con la producción de aflatoxinas, tabla 1. Con la técnica de CCD se pudo determinar que la aflatoxina producida corresponde con AFB1 por las dos técnicas ensayadas, tanto mediante el uso de explantes, como con el extracto (Fig. 1a y b). En los aislados *A. flavus* CCM-AS02 y *A. luchuensis* CCM-AS04 no se observó la producción de aflatoxinas en YES (Tabla 1), con ninguna de las técnicas de detección ensayadas en este estudio como se visualiza en las figuras 1c y d.

En cuanto a los resultados de la infección *in vitro* de maíz con los aislados de *A. flavus* (CCM-AS02, CCM-AS29) y *A. luchuensis* (CCM-AS04), se observa un incremento significativo de la producción de aflatoxinas ($p < 0,05$) en los grupos infectados con *A. flavus* CCM-AS02 ($70.500 \pm 446,1$ ppb) y CCM-AS29 ($55.570 \pm 1143,6$ ppb) cuando los mismos son comparados con el control que fue inoculado con agua destilada estéril ($15,6 \pm 1,3$ ppb) (Fig. 2). A su vez, el grupo

inoculado con *A. luchuensis* CCM-04 ($< \text{LOD} - 2$ ppb), no se observó la producción de aflatoxinas.

Es importante resaltar que el aislado CCM-AS02 no produjo aflatoxinas en el medio de cultivo sintético (YES), sin embargo, cuando se inoculó en granos de maíz se observaron concentraciones superiores de aflatoxinas totales ($70.500 \pm 446,1$ ppb) en comparación con CCM-AS29 ($55.570 \pm 1143,6$ ppb), el cual es productor de estos metabolitos en medio de cultivo.

DISCUSIÓN

A. flavus presenta como característica intrínseca la variabilidad en el potencial de producir aflatoxinas (Camiletti *et al.*, 2018; Okoth *et al.*, 2018; Thathana *et al.*, 2017), sin embargo, es conocido que en la población existen organismos no productores de la micotoxina, por lo que, determinar estas características, los factores y métodos ideales para que se den la producción de aflatoxinas, es crucial. En este estudio, como se pudo observar en los resultados obtenidos, en la tabla 1, con el medio de cultivo agar-coco, no fue conclusiva la presencia de fluorescencia bajo luz UV, contrario a lo descrito en la literatura (Davis *et al.*, 1987; Faria *et al.*, 2017); lo que se podría considerar como una limitación del estudio, y esto, podría atribuirse a las diferentes constituciones y formas de preparación del medio a base de coco que no se encuentra completamente unificado hasta la actualidad.

En la modificación utilizada por Monda *et al.* (2020), fue posible detectar fluorescencia por debajo de 1,75 ppb,

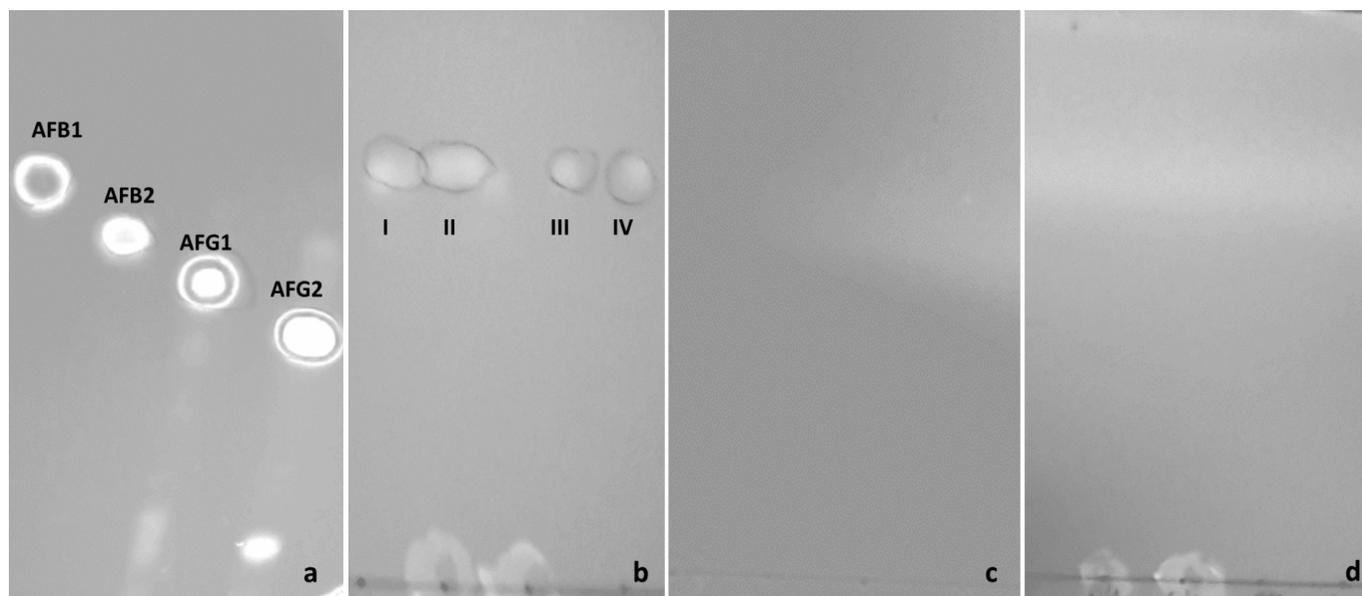


Figura 1. Cromatografía en capa delgada - CCD de los aislados de *Aspergillus* (explantes y extractos) para identificar las aflatoxinas producidas en medio de cultivo YES. Fase estacionaria sílica-gel 60 F_{254} y fase móvil cloroformo: acetona (90:10). **a:** Visualización de fluorescencia en la placa CCD (UV $\lambda = 360$ nm), comparada con los estándares AFB1, AFB2, AFG1, AFG2. **b:** Aflatoxina B1 - *Aspergillus flavus* CCM-AS29 (I, II- explantes; III y IV- extracto), **c:** Ausencia de bandas fluorescentes - *Aspergillus flavus* CCM-AS02, **d:** Ausencia de bandas fluorescentes - *Aspergillus luchuensis* CCM-AS04.

que es el límite de detección del método de comparación utilizado RIDASCREEN®, sin embargo, Abbas *et al.* (2004) y Thathana *et al.* (2017) relataron en sus trabajos que la sensibilidad de técnicas que utilizan medios de cultivo para verificar la fluorescencia de aflatoxinas es muy baja, recomendando la asociación con métodos cromatográficos.

En cuanto al medio de cultivo a base de extracto de levadura (YES), se pudo determinar tanto la presencia como ausencia de fluorescencia bajo luz UV y la clasificación del tipo de aflatoxina producida por cromatografía en capa delgada (CCD) coincidiendo con Astoreca *et al.* (2012) y Gqaleni *et al.* (1997), que mencionan que este medio de cultivo favorece la producción de aflatoxinas, esto, se puede atribuir a su formulación enriquecida con carbohidratos y otros nutrientes (Liu *et al.*, 2016).

La evidencia científica demuestra que los factores determinantes para estimar el riesgo potencial de contaminación por aflatoxinas en los alimentos son conocer la frecuencia fúngica y caracterizar el potencial de producción de aflatoxinas de los aislados en sus diferentes enfoques como molecular y fisiológico (Probst *et al.*, 2014). La matriz donde crecen y se desarrollan estos organismos es uno de los factores de mayor relevancia para la producción de micotoxinas. En nuestro trabajo se pudo verificar que *A. flavus* CCM-AS02 no solo presentó producción de aflatoxina cuando se analizó en su matriz de origen (granos de maíz – *in vitro*), sino que, fue más elevado del que se observó en el aislado CCM-AS29, cuyo potencial ya fue demostrado por cromatografía en capa delgada (CCD) (Tabla 1 y Fig. 1).

Según Probst y Cotty (2012) la técnica para evaluar la producción de aflatoxinas de *A. flavus* con el ensayo *in vitro* con el maíz esterilizado por autoclave es altamente correlativa con el modelo de infección *in vivo* (Probst y Cotty, 2012) y ha sido sobradamente predictiva con la producción de aflatoxinas, lo que respalda la extrapolación de estos resultados a condiciones de almacenamientos utilizados en nuestro país.

A su vez, los mismos autores mencionan la variabilidad entre aislados y reportan algunos organismos con capacidad de producir hasta 200 000 ppb de AFB1 mientras que otros, presentan niveles mucho menores (10 ppb). En este estudio, la producción de aflatoxinas por parte de los aislados ensayados varió entre 50 000 y 70 000 ppb (Fig. 2). La capacidad de producción de aflatoxinas determinada es preocupante, lo cual es un indicativo de riesgo, considerando estas concentraciones tan elevadas.

Otro factor importante en el estudio de hongos productores de micotoxinas es la coinfección de *A. flavus* con otras especies y si éstas son importantes para inhibir o potenciar la producción de aflatoxinas, por lo que se evaluó como grupo externo al aislado *A. luchuensis* CCM-AS04, siendo este el primer reporte de esta especie en granos de maíz en Paraguay (Tabla 1). Es importante recalcar que este aislado no es reportado como productor de aflatoxinas

(Hong *et al.*, 2013) lo que fue corroborado bajo las condiciones de nuestro estudio.

La cantidad de aflatoxinas totales presentes varió de 13 a 16 ppb, en el grupo control (Fig. 2), demostrando la contaminación natural previa con dicha micotoxina en el maíz comercializado en Asunción, y corroborando este hallazgo con trabajos anteriores realizados por este grupo de investigación que también determinó la presencia de aflatoxinas en maíz adquirido en diferentes establecimientos comerciales (datos no publicados).

Considerando que el límite máximo tolerable (LMT) por Mercosur y FDA (de las siglas en inglés, *Food and Drug Administration*, Estados Unidos), en granos de maíz es 20 ppb, los niveles determinados en el testigo con contaminación natural se encuentran dentro del rango permitido, sin embargo, esto representa un llamado de atención por el potencial riesgo, en especial para las personas vulnerables, como niños, embarazadas e inmunosuprimidos en general, sobre todo, considerando la toxicidad de las aflatoxinas (Arrúa *et al.*, 2021; Benkerroum, 2020; IARC, 2012; MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02, 2002). No obstante, si consideramos los LMT establecidos por la Unión Europea (Official Journal of the European Union, 2006) para aflatoxinas totales en maíz es de 10 ppb, las muestras testigos superan el límite tolerable.

La presencia de *Aspergillus* y aflatoxinas con alto potencial toxigénico contaminando maíz es una situación preocupante considerando el impacto económico directo e indirecto que puede representar. En cuanto a las pérdidas directas, se pueden resaltar la disminución del rendimiento de los granos, y la pérdida de mercados, como consecuencia de calidad industrial inferior y las restricciones a las exportaciones debido a los límites tolerables de aflatoxinas establecidos por los diferentes mercados internacionales. Las pérdidas indirectas, que muchas veces pasan desapercibidas, pero no por ello son de menor importancia, se relacionan principalmente a los efectos en la salud humana y animal ya que el grano no apto para comercialización para consumo humano, erróneamente se destina a alimentación animal, lo que lleva a un rechazo del alimento, baja del rendimiento, además de los efectos negativos en la salud animal y en casos extremos la muerte. Con relación a la salud humana se incrementan los gastos de la salud pública, debido al potencial carcinógeno de las aflatoxinas. y otras complicaciones graves que puede provocar. Los costos de disposición final de los granos contaminados, los retiros de los productos contaminados y las inversiones en investigación para el desarrollo de nuevas variedades, técnicas de diagnóstico y detección de micotoxinas entre otros aspectos, también son pérdidas importantes (IARC, 2012; P. Kumar *et al.*, 2017; Mahato *et al.*, 2019; Rushing y Selim, 2019).

Un aspecto fundamental a tener en cuenta es que la ingesta de alimentos contaminados con aflatoxinas afecta

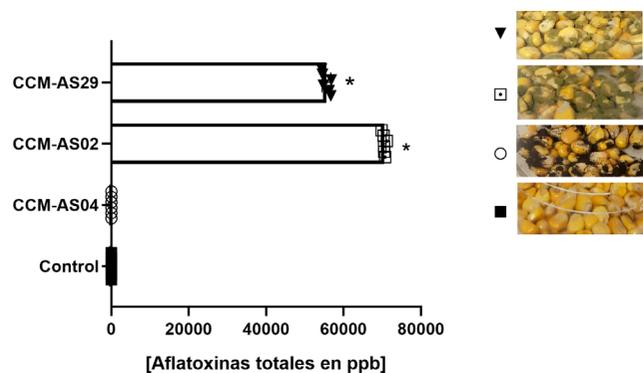


Figura 2. Determinación de la concentración de aflatoxinas en ppb en maíz avatí-morotí infectado por aislados de *Aspergillus flavus* CCM-AS02, CCM-AS29 y *Aspergillus luchuensis* CCM-AS04. Control: agua destilada estéril. LOD - 2 ppb. ANOVA post-test Tukey * $p < 0,05$.

directamente la seguridad alimentaria, considerando que uno de los aspectos esenciales para cumplirla es la inocuidad del alimento consumido; esto, sumado a la problemática de la falta de programas de vigilancia, prevención y control de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con micotoxinas en países en desarrollo como Paraguay y que tiene un impacto directo sobre todo en las poblaciones con mayor vulnerabilidad (Kumar *et al.*, 2021; Mahato *et al.*, 2019).

A pesar de que la evaluación de riesgos es multifactorial, este estudio y sus resultados representan datos preliminares para determinar la capacidad de producción de aflatoxinas de aislados de *Aspergillus* en Paraguay bajo las condiciones específicas ensayadas.

CONCLUSIONES

Los aislados de *A. flavus* CCM-AS02 y CCM-AS29 provenientes de *avatí-morotí* (maíz de consumo humano) demostraron poseer una alta capacidad de producción de aflatoxinas bajo las condiciones ensayadas, en medio de cultivo YES y en granos de maíz a temperatura de 27 ± 3 °C. Esto es una evidencia más de que es necesario alertar del riesgo que representa la contaminación de los granos de maíz con *Aspergillus* y aflatoxinas en Paraguay, marcando la importancia de establecer estrategias preventivas de control de este hongo en toda la cadena productiva del maíz.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Paraguay (CONACYT) que a través de fondos del Fondo de Excelencia para la Educación y la Investigación (FEI) financiaron el proyecto 14-INV-301: Identificación de cepas potencialmente toxigénicas de *Aspergillus* en variedades de maíces criollos.

REFERENCIAS

- Abbas, H. K., Zablotowicz, R. M., Weaver, M. A., Horn, B. W., Xie, W., & Shier, W. T. (2004). Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, *50*(3), 193–199. <https://doi.org/10.1139/w04-006>
- Arrúa, A. A., Arrua, P. D., Ulke, M. G., Quezada Viay, M. Y., Moreno Lara, J., Moura Mendes, J., Casal, C., Ferreira, F., Kohli, M. M., López Nicora, H., & Fernández Rios, D. (2021). Presencia de aflatoxina M1 en fórmulas lácteas infantiles comercializadas en el área metropolitana a Asunción, Paraguay. *Pediatría (Asunción)*, *48*(1), 37–43. <https://doi.org/10.31698/ped.48012021007>
- Arrua, A. A., Moura Mendez, J., & Fernández Rios, D. (2013). Aflatoxinas, un riesgo real. *Reportes Científicos de La FACEN*, *4*, 68–81.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A. J., & Marín, S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.002>
- Benkerroum, N. (2019). Retrospective and Prospective Look at Aflatoxin Research and Development from a Practical Standpoint. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*, 47. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193633>
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- Bucio-villalobos, C. M., Peña-Cabrales, J. J., & Guzmán-de-Peña, D. (2001). Producción de Aflatoxinas en Maíz in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *19*(2), 218–222.
- Camiletti, B. X., Moral, J., Asensio, C. M., Torrico, A. K., Lucini, E. I., Giménez-Pecchi, M. de la P., & Michailides, T. J. (2018). Characterization of Argentinian Endemic *Aspergillus flavus* Isolates and Their Potential Use as Biocontrol Agents for Mycotoxins in Maize. *Phytopathology*, *108*(7), 818–828. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0255-R>
- Davis, N. D., Iyer, S. K., & Diener, U. L. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(7), 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1593-1595.1987>
- Faria, C. B., Santos, F. C. dos, Castro, F. F. de, Sutil, A. R., Sergio, L. M., Silva, M. V., Machinski Junior, M., & Barbosa-Tessmann, I. P. (2017). Occurrence of toxigenic *Aspergillus flavus* in commercial Bulgur wheat. *Food Science and Technology*, *37*(1), 103–111. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09316>
- Filtenborg, O. L. E., Frisvad, J. C., & Svendsen, J. A. (1983). Simple Screening Method for Molds Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 45(2), 581–585. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09316>
- Gqaleni, N., Smith, J. E., Lacey, J., & Gettinby, G. (1997). Effects of Temperature, Water Activity, and Incubation Time on Production of Aflatoxins and Cyclopiazonic Acid by an Isolate of *Aspergillus flavus* in Surface Agar Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 1048–1053. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.09316>
- Hong, S., Lee, M., Kim, D., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraken, J., & Samson, R. A. (2013). *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063769>
- IARC. (2012). Aflatoxins. In *A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations* (Vol. 100F, pp. 225–244).
- Klich, M. A., & Pitt, J. I. (2009). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(1), 99–108. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(88\)80010-X](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(88)80010-X)
- Kumar, A., Pathak, H., & Bhadauria, S. (2021). Aflatoxin contamination in food crops : causes, detection, and management : a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(17), 9. <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00064-y>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Lattanzio, V. M. T., Guarducci, N., Powers, S., Ciasca, B., Pascale, M., & Von Holst, C. (2018). Validation of a lateral flow immunoassay for the rapid determination of aflatoxins in maize by solvent free extraction. *Analytical Methods*, 10(1), 123–130. <https://doi.org/10.1039/C7AY02249B>
- Liu, J., Sun, L., Zhang, N., Zhang, J., Guo, J., Li, C., Rajput, S. A., & Qi, D. (2016). Effects of Nutrients in Substrates of Different Grains on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7232858>
- Mahato, D. K., Lee, K. E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K. N., Kumar, P., & Kang, S. G. (2019). Aflatoxins in Food and Feed : An Overview on Prevalence , Detection and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10 (October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>
- MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02. (2002). *Reglamento Técnico Mercosur Sobre Límites Máximos de Aflatoxinas Admisibles en Leche, Maní y Maíz*. http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_025_002_RTM_Aflatoxinas_en_Lech-Maní-Maíz_Acta_2_02.PDF
- Monda, E., Masanga, J., & Alakonya, A. (2020). Variation in Occurrence and Aflatoxigenicity of *Aspergillus flavus* from Two Climatically Varied Regions in Kenya. *Toxins*, 12(34). <https://doi.org/10.3390/toxins12010034>
- Moreno Martínez, E., Vázquez Badillo, M., & Facio Parra, F. (2000). Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. *Agrociencia*, 34(4), 477–484.
- Official Journal of the European Union. (2006). *European Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 amending Regulation (EC) 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. (p. 24).
- Okoth, S., De Boevre, M., Vidal, A., Di Mavungu, J. D., Landschoot, S., Kyallo, M., Njuguna, J., Harvey, J., & De Saeger, S. (2018). Genetic and toxigenic variability within *Aspergillus flavus* population isolated from maize in two diverse environments in Kenya. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00057>
- Patriarca, A., & Fernandez Pinto, V. (2017). Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.011>
- Perrone, G., Haidukowski, M., Stea, G., Epifani, F., Bandyopadhyay, R., Leslie, J. F., & Logrieco, A. (2014). Population structure and Aflatoxin production by *Aspergillus Sect. Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiology*, 41, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.005>
- Pildain, M. B., Cabral, D., & Vaamonde, G. (2005). Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado de diferentes zonas. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 34(3), 3–19.
- Probst, C., Bandyopadhyay, R., & Cotty, P. J. (2014). Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.010>
- Probst, C., & Cotty, P. J. (2012). Relationships between in vivo and in vitro aflatoxin production: Reliable prediction of fungal ability to contaminate maize with aflatoxins. *Fungal Biology*, 116(4), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.02.001>
- Ritter, A. C., Hoeltz, M., & Noll, I. B. (2011). Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31(3), 623–628. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300011>
- Rodrigues, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 527–534.
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational

- exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81–100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Salhuana, W., & Machado, V. (1999). *Races of Maize in Paraguay* (Wilfredo Salhuana & Verónica Machado (eds.)). United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service and The Maize Program of the Paraguayan Ministry of Agriculture and Livestock.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., & Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Santos, L., Marin, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2013). Mycotoxin in Medicinal/Aromatic Herbs – a Review. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(2), 119–142.
- Sepúlveda, C. O. ., & Piontelli, E. L. (2005). Poblaciones de *Aspergillus* en Semillas de maíz y soja de Importación Argentina: Énfasis en la Sección flavi. *Boletín Micológico*, 20, 41–55. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2005.20.0.276>
- Shephard, G. S. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1215–1224. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2857-y>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Copetti, M. V., Teixeira, A. A., & Iamanaka, B. T. (2019). Understanding mycotoxin contamination across the food chain in Brazil: Challenges and opportunities. *Toxins*, 11(7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxins11070411>
- Thathana, M. G., Murage, H., Abia, A. L. K., & Pillay, M. (2017). Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potentials of *aspergillus flavus* isolated from maize and soil in Kenya. *Agriculture (Switzerland)*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/agriculture7100080>
- Turner, N. W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., Piletsky, S. A., Zhang, L., Dou, X., Zhang, C., Logrieco, A. F., & Yang, M. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). *Analytica Chimica Acta*, 901, 12–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.013>
- VICAM. (2017). *AFLA-V Test procedure*. <https://www.vicam.com/products/afla-v#>
- Zhang, L., Dou, X., Zhang, C., Logrieco, A. F., & Yang, M. (2018). A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins10020065>