



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE AFLATOXINAS,
ZEARALENONA Y DESOXINIVALENOL EN EL ARROZ
PRODUCIDO EN LAS PRINCIPALES ZONAS ARROCERAS DE
COLOMBIA**

LILIANA ROJAS CONTRERAS

**ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE AFLATOXINAS,
ZEARALENONA Y DESOXINIVALENOL EN EL ARROZ
PRODUCIDO EN LAS PRINCIPALES ZONAS ARROCERAS DE
COLOMBIA**

LILIANA ROJAS CONTRERAS

Tesis Doctoral

*Memoria presentada al Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de
Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*

Para optar al grado de Doctor en
Ciencia de los Alimentos

Dirigido por los Doctores Artur Xavier Roig Sagués y Ramón Ovidio García Rico

Bellaterra, 2020

Artur Xavier Roig Sagués, Catedrático de Universidad del Área de conocimiento de Nutrición y Bromatología del Departament de Ciència Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona (España), y **Ramón Ovidio García Rico**, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Pamplona (Colombia).

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “Estudio de la incidencia de aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol en el arroz producido en las principales zonas arroceras de Colombia”, presentada por Liliana Rojas Contreras para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra (España) y Pamplona (Colombia), a los 11 días de diciembre de 2020.

Artur Xavier Roig Sagués

Ramón Ovidio García Rico



A Dios, mi guía

A mis padres, Olga y Luis

A mis hermanos, Yaneth y Mauricio

A mis sobrinos Manuela y Juan David

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios Todopoderoso por ser mi guía, mi fortaleza y por enseñarme el camino a seguir, por todas sus bendiciones, infinitas gracias.

Expreso mis sinceros agradecimientos a mis directores de tesis, Dr. Artur X. Roig y Ramón Ovidio García Rico, por su constante apoyo y acompañamiento en el desarrollo del proyecto. Gracias por sus aportes, sugerencias y dedicación.

A la Doctora Marta Capellas, Coordinadora del Doctorado, por todo su apoyo y colaboración.

Al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. En especial al Dr. Gonzalo Jair Díaz, quien me incentivó a estudiar las micotoxinas, por su apoyo, ayuda y colaboración en la ejecución de esta investigación. De igual manera, a Sandra Milena Cepeda, gracias por su ánimo, su constante apoyo y colaboración.

A la Universidad de Pamplona, por la financiación del proyecto y por permitirme desarrollar parte de mi trabajo en sus instalaciones.

Al Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología – GIMBIO – de la Universidad de Pamplona, a los integrantes del mismo, por su compañía, por los buenos momentos, por todo su apoyo.

A los integrantes del Semillero de Investigación –SIMBIO-, especialmente a: Boris, Hussey, Roberth, Criss, Walter, Jhonner, Liceth, y Lina María.

A Angelita, mi amiga y compañera, por su constante apoyo, por su incondicionalidad, por estar presente en los momentos más difíciles, por ayudarme a resolver dudas, por todo, muchas gracias.

A Carlos Andrés, a Yesid, a Gabriel por su colaboración y apoyo.

A Gladys, por su acompañamiento en el estudio estadístico.

A mis padres, a Olguita por su constante apoyo y por todas sus oraciones y bendiciones; a Lucho, mi compañero de viajes y aventuras. Soy lo que soy por sus enseñanzas, muchas gracias por impulsarme a alcanzar mis sueños.

A mis hermanos Yaneth y Mauricio, por su apoyo, ánimo y colaboración. A Manuela y Juan David, mis sobrinos; por su compañía, alegría y constancia. Por darme fuerzas, los adoro.

A mi tía Flor, gracias por su constancia, por sus consejos y apoyo incondicional.

A todas las personas que me apoyaron en este proceso.

A todos mi profundo agradecimiento!

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa L.*) es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo, siendo Colombia el segundo productor de arroz de América Latina, después de Brasil. El arroz se clasifica como el tercer producto agrícola en extensión del país, después del café y el maíz. En el presente estudio se determinó la calidad del arroz cultivado y comercializado en Colombia, atendiendo a parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y toxicológicos (presencia de micotoxinas), y se planteó como objetivo general estudiar la incidencia de aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol en el arroz producido en las principales zonas arroceras de Colombia.

Durante el año 2017 se tomaron 62 muestras de arroz *paddy* cultivadas por sistemas “riego” y “secano”, procedentes de las principales zonas arroceras de Colombia. En el año 2018, el número de muestras recogidas fue de 58, provenientes de los dos sistemas de cultivo. Estas muestras se analizaron microbiológicamente (Coliformes Totales, *Escherichia coli* y Mohos y Levaduras) y se determinaron sus características fisicoquímicas (pH, actividad de agua - A_w - y contenido de humedad). Finalmente, las muestras fueron analizadas para la detección y cuantificación de aflatoxinas (AF) (B₁, B₂, G₁ y G₂), zearalenona (ZEA) y desoxinivalenol (DON). Para ello, se aplicaron técnicas analíticas estandarizadas reconocidas por la Asociación Oficial de Química Analítica de los Estados Unidos (AOAC).

De los resultados obtenidos, en las muestras recolectadas durante el año 2017, se observó una incidencia global del 46 % de Coliformes Totales (CT) en los granos procedentes del sistema “riego” de todas las zonas arroceras. En las muestras del sistema “secano”, la incidencia observada fue del 50 %. La incidencia de Mohos y Levaduras (M y L) fue alta,

osciló entre el 96 y el 100 %, independientemente del sistema de cultivo empleado. *Escherichia coli* presentó una incidencia del 8 % en el sistema “riego”, mientras que no se detectó su presencia en las muestras cultivadas por el sistema “secano”. En el arroz cultivado en el año 2018 por el sistema “riego” la carga microbiana, tanto de bacterias como de hongos, disminuyó considerablemente; sólo el 13 % de las muestras presentaron recuentos de CT. Los mohos estuvieron presentes en el 76 % de las muestras. En cuanto al sistema “secano”, el 23 % de las muestras presentaron contaminación con CT y el 54 % de M y L.

La presencia de hongos en el grano en cultivo fue muy elevada en todo el país, aunque en el año 2018, se apreció una disminución generalizada en la incidencia en todas las zonas arroceras.

Con relación a las variables fisicoquímicas, las muestras procedentes del sistema “riego”, presentaron durante 2017 valores promedio de pH entre 6,39 y 6,75, y de 0,65 y 0,74 de Aw, con unos valores de humedad entre 7,48 y 11,74 %. Las muestras cultivadas por el sistema “secano” evidenciaron valores promedios de pH entre 6,72 y 7,00, de 0,70 y 0,75 de Aw, y humedades comprendidas entre 6,87 y 10,09 %. En las muestras procedentes del sistema “riego” del año 2018, los valores de pH oscilaron entre 6,68 y 7,37, los de Aw entre 0,71 - 0,74, y los de humedad entre 7,78 y 10,12 %, mientras que las del sistema “secano” presentaron valores de pH entre 6,44 y 6,75, de 0,65 y 0,74 de Aw, y entre 7,11 y 8,39 % de humedad. Estas características fisicoquímicas y sus interacciones son los principales determinantes etiológicos en la regulación del crecimiento fúngico y la producción de metabolitos secundarios.

En el año 2017, la micotoxina de mayor incidencia en el país fue AF, seguida de ZEA. La zona más crítica por la presencia de AF fue la zona “Norte”. En el 2018, ZEA pasó a ser la micotoxina de mayor incidencia, especialmente en el sistema de cultivo “riego”. En contraste, DON fue la micotoxina de menor incidencia. Sin distinción del sistema de cultivo aplicado, en las muestras recolectadas durante los dos años, no se evidenció la presencia de AFG₁ y AFG₂.

En las muestras cultivadas por el sistema “riego”, se detectó la presencia de AF en el 15 % de las muestras, con concentraciones que variaron entre 0,1 µg/kg y 1,83 mg/kg, mientras que la ZEA se detectó en un 13 % de las muestras, con concentraciones entre 53,5 µg/kg y 2,57 mg/kg. No se detectó la presencia de DON en ninguna muestra. En las muestras procedentes del sistema “secano”, se observó la presencia de AF en un 43 % de las muestras (2,1 – 119,5 µg/kg) y ZEA en el 7 % (271,9 µg/kg). La incidencia de AF en el arroz cultivado por el sistema “riego” en el año 2018 se redujo en comparación con el año anterior, detectándose solo en un 2 % de las muestras (0,9 µg/kg). No obstante, se denotó una mayor incidencia de ZEA, presente en el 31 % de las muestras (98 µg/kg – 5,19 mg/kg). Fue destacable la aparición de DON en el 7 % de las muestras analizadas (0,87 – 5,86 mg/kg), procedentes de las zonas “Centro” y “Llanos Orientales” del país. En las muestras obtenidas por el sistema “secano”, se detectó la presencia de AF y de ZEA, pero no se detectó DON en ninguna zona. La incidencia de AF fue del 31 % (1,6 – 22,4 µg/kg) y la de ZEA del 15 % (67 µg/kg).

De los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de las muestras de arroz en cultivo correspondientes al muestreo del año 2017, *Aspergillus* fue el género aislado con mayor frecuencia (74 %) seguido de *Penicillium* (20 %). Se aislaron 19 cepas de moho aisladas del

arroz cultivado en el año 2017, caracterizándolas fenotípica y molecularmente; 17 de ellas correspondieron a *Aspergillus flavus*. El 52 % de las cepas presentaron fluorescencia UV en ALC y se verificó la capacidad aflatoxigénica de las mismas.

No se detectó la presencia ni de CT ni tampoco de *E. coli* en ninguna de las 16 muestras de arroz comercial analizadas, procedentes de las diferentes zonas arroceras de Colombia, pero sí se detectó la presencia de M y L. La incidencia de AF en estas muestras fue del 50 % (2,4 – 93,9 µg/kg) y la de DON fue del 6 % (128 µg/kg), superándose en el 31 % de las muestras el valor máximo permisible establecido por las legislaciones colombiana y europea. Sin embargo, no se evidenció la presencia de ZEA.

RESUM

L'arròs (*Oryza sativa L.*) és un dels cultius alimentaris més importants del món, sent Colòmbia el segon productor d'arròs d'Amèrica Llatina, després del Brasil. L'arròs es classifica com el tercer producte agrícola en extensió de país, després del cafè i el blat de moro. En el present estudi es va determinar la qualitat de l'arròs cultivat i comercialitzat a Colòmbia, atenent a paràmetres microbiològics, fisicoquímics i toxicològics (presència de micotoxines), i es va plantejar com a objectiu general estudiar la incidència d'aflatoxines, zearalenona i desoxinivalenol en l'arròs produït a les principals zones arrosseres de Colòmbia.

Durant l'any 2017 es van prendre 62 mostres d'arròs *paddy* cultivades per sistemes "reg" i "secà", procedents de les principals zones arrosseres de Colòmbia. L'any 2018, el nombre de mostres recollides va ser de 58, provinents dels dos sistemes de cultiu. Aquestes mostres es van analitzar microbiològicament (coliformes totals, *Escherichia coli*, i Fongs i Llevats) i es van determinar les seves característiques fisicoquímiques (pH, activitat d'aigua -Aw- i contingut d'humitat). Finalment, les mostres van ser analitzades per a la detecció i quantificació d'aflatoxines (AF) (B1, B2, G1 i G2), zearalenona (ZEA) i desoxinivalenol (DO). Per fer això, es van aplicar tècniques analítiques estandarditzades reconegudes per l'Associació Oficial de Química Analítica dels Estats Units (AOAC).

Dels resultats obtinguts, en les mostres recollides durant l'any 2017, es va observar una incidència global del 46% de coliformes totals (CT) en les mostres procedents de sistema "reg" de totes les zones arrosseres. En les mostres de sistema "secà", la incidència observada va ser del 50 %. La incidència de Fongs i Llevats (F i Ll) va ser alta, i va oscil·lar entre el

96 i el 100 %, sense importar el sistema de cultiu emprat. *Escherichia coli* va presentar una incidència de el 8 % en el sistema "reg", mentre que no es va detectar la seva presència en les mostres cultivades pel sistema "secà". En l'arròs conreat l'any 2018 pel sistema "reg" la càrrega microbiana, tant de bacteris com de fongs, va disminuir considerablement; només el 13 % de les mostres van presentar recomptes de CT. Els fongs van estar presents en el 76 % de les mostres. Pel que fa a el sistema "secà", el 23 % de les mostres van presentar contaminació amb CT, i el 54 % amb F i Ll.

La presència de fongs en el gra en cultiu va ser molt elevada a tot el país, tot i que l'any 2018, es va apreciar una disminució generalitzada en la incidència en totes les zones arrosseres.

En relació a les variables fisicoquímiques, les mostres procedents de sistema "reg", van presentar durant 2017 valors mitjans de pH entre 6,39 i 6,75, i de 0,65 i 0,74 d'Aw, amb uns valors d'humitat entre 7,48 i 11,74 %. Les mostres cultivades pel sistema "secà" van evidenciar valors mitjans de pH entre 6,72 i 7,00, de 0,70 i 0,75 de Aw, i humitats compreses entre 6,87 i 10,09 %. En les mostres procedents de sistema "reg" de l'any 2018, els valors de pH van oscil·lar entre 6,68 i 7,37, els de Aw entre 0,71 - 0,74, i els d'humitat entre 7,78 i 10,12 %, mentre que les de sistema "secà" van presentar valors de pH entre 6,44 i 6,75, de 0,65 i 0,74 d'Aw, i entre 7,11 i 8,39 % d'humitat. Aquestes propietats fisicoquímiques i les seves interaccions són els principals determinants etiològics en la regulació del creixement fúngic i de la producció de metabòlits secundaris.

L'any 2017, la micotoxina de major incidència al país va ser AF, seguida de ZEA. La zona més crítica per la presència d'AF va ser la zona "Nord". Al 2018, ZEA passar a ser la micotoxina de major incidència, especialment en el sistema de cultiu "reg". En contrast, DO

va ser la micotoxina de menor incidència. Sense distinció de sistema de cultiu aplicat, en les mostres recollides durant els dos anys, no es va evidenciar la presència de AFG₁ i AFG₂.

En les mostres cultivades pel sistema "reg" en 2017, la presència d'AF va correspondre al 15 % de les mostres, amb concentracions que van variar entre 0,1 mg/kg i 1,83 mg/kg, mentre que la ZEA es va detectar en un 13 % de les mostres, amb concentracions entre 53,5 mg/kg i 2,57 mg/kg. No es va detectar la presència de DO en cap mostra. En les mostres procedents de sistema "secà", es va observar la presència d'AF en un 43 % de les mostres (2,1 - 119,5 mg/kg) i ZEA en un 7 % (271,9 mg/kg). La incidència d'AF en l'arròs conreat pel sistema "reg" l'any 2018 es va reduir en comparació amb l'any anterior, amb presència només en un 2 % de les mostres (0,9 mg/kg). No obstant això, es va denotar una major incidència de ZEA, present en el 31 % de les mostres (98 µg/kg - 5,19 mg/kg). En aquest cas, va ser destacable l'aparició de DO en el 7 % de les mostres analitzades (0,87 - 5,86 mg / kg), procedents de les zones "Centre" i "Plans Orientals" del país. En les mostres obtingudes pel sistema "secà" es va detectar la presència d'AF i de ZEA, però no es va observar DO en cap zona. La incidència d'AF va ser del 31 % (1,6 - 22,4 mg / kg) i la de ZEA del 15 % (67 mg / kg).

Dels aïllaments fúngics obtinguts a partir de les mostres d'arròs en cultiu corresponents al mostreig de l'any 2017, *Aspergillus* va ser el gènere amb més freqüència (74 %) seguit de *Penicillium* (20 %). Es van aïllar 19 soques de fongs aïllades de l'arròs conreat l'any 2017, caracteritzant-les fenotípicament i molecularment. Dissent d'elles van correspondre a *Aspergillus flavus*. El 52 % de les soques van presentar fluorescència UV a ALC i es va verificar la seva capacitat aflatoxigènica.

No es va detectar la presència ni de CT ni tampoc d'*E. Coli* en cap de les 16 mostres d'arròs comercial analitzades, procedents de les diferents zones arrosseres de Colòmbia, però sí es va detectar la presència de F i Ll. La incidència d'AF en aquestes mostres va ser del 50 % (2,4 - 93,9 mg/kg) i la de DO del 6 % (128 mg/kg), superant-se en el 31 % de les mostres el valor màxim permisible establert per les legislacions colombiana i europea. No es va evidenciar la presència de ZEA en cap de les mostres analitzades.

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa L.*) is one of the most important food crops in the world, with Colombia being the second largest rice producer in Latin America, after Brazil. Rice has been classified as the third largest agricultural product in the country, behind coffee and corn, respectively. In the present study, the quality of rice grown and commercialized in Colombia was determined, taking into account microbiological, physicochemical, and toxicological parameters (presence of mycotoxins); furthermore, the general objective of this inquiry was to study the incidence of aflatoxins, zearalenone, and deoxynivalenol in rice produced in the main rice-growing areas of Colombia.

During 2017, 62 samples of *paddy* rice grown by “irrigation” and “dry” systems were taken, from the main rice-growing areas of Colombia. In 2018, the number of samples collected was 58, from the two cultivation systems. These samples were microbiologically analyzed (Total Coliforms, *Escherichia coli* and Molds and Yeasts) and their physicochemical characteristics (pH, water activity -Aw- and moisture content) were determined. Finally, the samples were analyzed for the detection and quantification of aflatoxins (AF) (B₁, B₂, G₁ and G₂), zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON). For this reason, standardized analytical techniques recognized by the Official Association of Analytical Chemistry of the United States (AOAC) were conducted.

The results obtained from the samples collected during 2017, a global incidence of 46 % of Total Coliforms (CT) was observed in the grains from the "irrigation" system all over the rice-growing areas. Regarding the “dry” sample system, the observed incidence was about the 50 %. The incidence of Molds and Yeasts (M and L) was high, ranging between 96 and

100 %, regardless of the culture system used. *Escherichia coli* presented an incidence of 8 % in the "irrigation" system, while its presence was not detected in the samples grown by the "dry" system. In the rice cultivated in 2018 by the "irrigation" system, the microbial load (both of bacteria and fungi) decreased considerably, in which only 13 % of the samples had CT counts. Molds were present in 76 % of the samples. Concerning the "dry" system, 23 % of the samples presented contamination with CT and 54 % with M and L.

The presence of fungi in cultivated grain was very high throughout the country, although in 2018 there was a generalized decrease in the incidence in all rice-growing areas.

In relation to the physicochemical variables, the samples from the "irrigation" system presented during 2017 average pH values between 6,39 and 6,75, and of 0,65 and 0,74 of Aw, with values of humidity between 7,48 and 11,74 %. The samples cultivated by the "dry" system showed average values of pH between 6,72 and 7,00, of 0,70 and 0,75 of Aw, and humidity between 6,87 and 10,09 %. In the samples from the "irrigation" system in 2018, the pH values ranged between 6,68 and 7,37, those of Aw between 0,71 – 0,74, and those of humidity between 7,78 and 10, 12 %, while those of the "dry" system presented pH values between 6,44 and 6,75, of 0,65 and 0,74 of Aw, and between 7,11 and 8,39 % moisture. These physicochemical characteristics and their interactions are the main etiological determinants in the regulation of fungal growth and the production of secondary metabolites.

In 2017, the mycotoxin with the highest incidence in the country was AF, followed by ZEA. The most critical area for the presence of AF was the "North" one. In 2018, ZEA became the mycotoxin with the highest incidence, especially in the "irrigation" cultivation system. In contrast, DON was the mycotoxin with the lowest incidence. Regardless of the cultivation

system applied, in the samples collected during the two years, the presence of AFG₁ and AFG₂ was not evidenced.

In the samples cultivated by the “irrigation” system, the presence of AF was detected in 15 % of the samples, with concentrations that varied between 0,1 µg/kg and 1,83 mg/kg, while the ZEA was detected in 13 % of the samples, with concentrations between 53,5 µg/kg and 2,57 mg/kg. The presence of DON was not detected in any sample. In the samples from the “dry” system, the presence of FA was observed in 43 % of the samples (2,1 – 119,5 µg/kg) and ZEA in 7 % (271,9 µg/kg). The incidence of AF in rice cultivated by the “irrigation” system in 2018 was reduced compared to the previous year, being detected only in 2 % of the samples (0,9 µg/kg). However, a higher incidence of ZEA was found present in 31 % of the samples (98 µg/kg - 5.19 mg/kg). The appearance of DON was remarkable in 7 % of the samples analyzed (0,87 – 5,86 mg/kg), coming from the "Central" and "Llanos Orientales" areas of the country. In the samples obtained by the “dry” system, the presence of AF and ZEA was detected, but DON was not detected in any area. The incidence of AF was 31 % (1,6 – 22,4 µg/kg) and that of ZEA was 15 % (67 µg/kg).

About the fungal isolates obtained from the cultured rice samples corresponding to the sampling of the year 2017, *Aspergillus* was the genus isolated with the highest frequency (74 %) followed by *Penicillium* (20 %). 19 strains of mold isolated from rice grown in 2017 were isolated, characterizing them phenotypically and molecularly; 17 of them corresponded to *Aspergillus flavus*. 52 % of the strains showed UV fluorescence in ALC and their aflatoxigenic capacity was verified.

The presence of CT or *E. coli* was not detected in any of the 16 commercial rice samples analyzed, from the different rice-growing areas of Colombia, but the presence of M and L was detected. The incidence of AF in these samples were 50 % (2,4 – 93,9 µg/kg) and that of DON was 6 % (128 µg/kg), exceeding the maximum permissible value established by Colombian legislation in 31 % of the samples and European. However, the presence of ZEA was not evidenced.

ABREVIACIONES

AF	Aflatoxinas
AFB₁	Aflatoxina B ₁
AFB₂	Aflatoxina B ₂
AFG₁	Aflatoxina G ₁
AFG₂	Aflatoxina G ₂
AFM₁	Aflatoxina M ₁
ALC	América Latina y del Caribe
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
Aw	Actividad del agua
BS	Biosensores
CCD	Cromatografía de capa delgada
CE	Captura electrónica
CG	Cromatografía de Gases
CGL	Cromatografía de gas líquido
CHC	Carcinoma hepatocelular
DAD	Arreglo de diodos
DFL	Dispositivo de flujo lateral
DL	Dosis oral letal
DON	Desoxinivalenol
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción enzimática
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
FID	Ionización de llama
FL	Fluorescente
Ha	Hectáreas
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IDTP	Ingesta diaria tolerable provisional
IDMTP	Ingesta diaria máxima tolerable provisional
ISO	Organización Internacional para la Normalización

LMP	Límite máximo permitido
MOE	Morbilidad obstétrica extrema
MS	Masa
MSPS	Ministerio de Salud y Protección Social (Colombia)
MH	Millones de hectáreas
MT	Millones de toneladas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PFL	Polarización fluorescente
SPNN	Sistema de parques naturales
TLC	Cromatografía de capa fina
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VHB	Hepatitis B
ZEA	Zearalenona

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	vii
RESUM	xi
ABSTRACT	xv
ABREVIACIONES.....	xix
Introducción.....	1
Capítulo I. Revisión bibliográfica	4
1. Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	5
1.1 Origen del arroz	5
1.2 Morfología de la planta de arroz.....	6
1.3 Clasificación, morfología y fisiología del arroz	9
1.3.1 Clasificación del arroz	9
1.3.2 Morfología del grano de arroz	10
1.3.2.1 Dimensiones de las partes del arroz	11
1.3.2.2 Características físicas del grano de arroz	11
1.3.3 Fisiología del arroz.....	12
1.4 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de arroz.....	13
1.5 Características químicas del grano de arroz	15
1.6 Producción de arroz en el mundo	17
2. Arroz en Colombia	18
2.1 Principales zonas productoras de arroz.....	19
2.2 Sistemas de producción	20
2.2.1 Sistema riego.....	20
2.2.2 Sistema secano	22
2.3 Área sembrada en Colombia.....	23
2.4 La cadena de arroz paddy verde en Colombia.....	25
3. Micobiota del arroz	26
3.1 Hongos productores de micotoxinas en cereales de espiga.....	27
3.1.1 Género <i>Aspergillus</i>	28
3.1.1.1 Características macroscópicas	29
3.1.1.2 Características microscópicas.....	29
3.1.1.3 <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	31

3.1.1.4 Características de <i>Aspergillus flavus</i>	33
3.1.2 Género <i>Fusarium</i>	33
3.1.2.1 Caracterización morfológica	35
3.1.2.2 <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe (telemorfo <i>Gibberella zeae</i>).....	36
3.1.2.3 Caracterización molecular	36
4. Micotoxinas.....	38
4.1 Aflatoxinas (AF).....	39
4.1.1 Clasificación de las aflatoxinas.....	40
4.1.2 Características químicas y propiedades físicas de las aflatoxinas	41
4.1.3 Biosíntesis de las aflatoxinas	43
4.1.4 Biotransformación de las aflatoxinas.....	44
4.1.5 Toxicidad	47
4.1.6 Estudios de evaluación de exposición a las aflatoxinas en arroz.....	48
4.1.6.1 Contexto Internacional	48
4.1.6.2 Contexto Nacional.....	50
4.1.7 Métodos de análisis de aflatoxinas.....	51
4.1.8 Legislación para el contenido de aflatoxinas presentes en el arroz	53
4.1.8.1 Legislación Internacional	53
4.1.8.2 Legislación Colombiana.....	53
4.1.9 Estudios relacionados con la presencia de aflatoxinas en arroz.....	54
4.1.9.1 Contexto Internacional	54
4.1.9.2 Contexto Nacional.....	58
4.2 Tricotecenos.....	58
4.2.1 Biosíntesis de Tricotecenos.....	59
4.2.2 Desoxinivalenol (DON)	61
4.2.2.1 Toxicocinética	62
4.2.2.2 Toxicología.....	63
4.2.2.3 Mecanismo de toxicidad.....	64
4.2.2.4 Detoxificación	65
4.2.2.5 Métodos de detección de Desoxinivalenol.....	66
4.2.2.6 Legislación para el contenido de Desoxinivalenol en cereales	67
4.2.2.7 Estudios relacionados con la presencia de Desoxinivalenol en arroz	67

4.3 Zearalenona (ZEA)	68
4.3.1 Toxicología	69
4.3.2 Síntesis de la Zearalenona	71
4.3.3 Detoxificación	71
4.3.3.1 Métodos Físicos	71
4.3.3.2 Métodos Biológicos	72
4.3.4 Métodos de detección para Zearalenona	72
4.3.5 Legislación para el contenido de Zearalenona en cereales	72
4.3.6 Estudios sobre contaminación de Zearalenona en arroz	73
4.3.6.1 Contexto Internacional	73
5. Factores que afectan la producción de micotoxinas	74
5.1 Factores biológicos	74
5.2 Factores físicos	75
5.3 Factores químicos	76
5.4 Factores que condicionan la presencia de aflatoxinas	76
5.4.1 Temperatura y humedad	77
5.4.2 El hongo y la microbiota asociada	79
5.4.3 Sustrato	80
Capítulo II. Objetivos	81
2. Objetivos	82
2.1 Objetivo General	82
2.2 Objetivos Específicos	82
Capítulo III. Metodología	83
3. Metodología	84
3.1 Población de estudio	84
3.1.1 Selección de las hectáreas a muestrear	84
3.1.1.1 Tamaño de muestra	84
3.2 Métodos de análisis	87
3.2.1 Análisis Microbiológico	87
3.2.1.1 Preparación de las muestras	87
3.2.1.2 Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i>	87
3.2.1.3 Determinación de Mohos y Levaduras	88
3.2.2 Determinación de variables fisicoquímicas	89

3.2.2.1 Determinación de pH.....	89
3.2.2.2 Determinación de la Actividad Acuosa (<i>A_w</i>).....	89
3.2.2.3 Determinación de Humedad (%H).....	89
3.2.3 Análisis de Micotoxinas.....	89
3.2.3.1 Método de análisis de Aflatoxinas (AF) de ocurrencia natural (B ₁ , B ₂ , G ₁ Y G ₂).	90
3.2.3.1.1 Procedimiento General.....	90
3.2.3.2 Método de análisis de Zearalenona (ZEA) de ocurrencia natural.	92
3.2.3.3 Determinación de Desoxinivalenol (DON) mediante Cromatografía líquida de alta eficiencia/extracción en fase sólida.	94
3.2.4 Evaluación de la capacidad toxigénica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp.	96
3.2.4.1 Aislamiento de hongos filamentosos.....	96
3.2.4.2 Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas	96
3.2.4.3 Análisis cualitativo de la producción de Aflatoxinas.....	97
3.2.4.4 Verificación cuantitativa de la capacidad aflatoxigénica.....	98
3.2.4.5 Identificación Molecular	98
3.2.4.5.3 Identificación en bases de datos	100
3.3 Análisis Estadístico.....	101
Capítulo IV. Resultados	102
4. Resultados	103
4.1 Arroz en cultivo (<i>paddy</i>).....	103
4.1.1 Características microbiológicas del arroz en cultivo	103
4.1.1.1 Muestreo 2017.....	103
4.1.1.2 Muestreo 2018.....	104
4.1.2 Características fisicoquímicas del arroz en cultivo.....	105
4.1.2.1 Muestreo 2017.....	105
4.1.1.2 Muestreo 2018.....	106
4.1.3.1 Incidencia de Aflatoxinas (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂) en el arroz en cultivo.....	108
4.1.3.2 Incidencia de Aflatoxinas Totales, Zearalenona y Desoxinivalenol en el arroz en cultivo.....	110
4.2 Arroz comercial.....	112
4.2.1 Características microbiológicas del arroz comercializado en Colombia.....	112
4.2.3 Características fisicoquímicas del arroz comercializado en Colombia	113

4.2.4 Incidencia de micotoxinas en el arroz comercializado en Colombia	113
4.3 Evaluación de la capacidad toxigénica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp.....	114
4.4 Análisis cualitativo de la producción de Aflatoxinas.....	116
4.4.1 Verificación cuantitativa de la capacidad aflatoxigénica	116
4.5 Identificación Molecular	117
Capítulo V. Discusión.....	119
5. DISCUSIÓN.....	120
5.1 Arroz en cultivo (<i>Paddy</i>) 2017 – 2018	120
5.1.1 Características microbiológicas	120
5.1.1.1 Coliformes Totales (CT) y <i>Escherichia coli</i>	120
5.1.1.3 Mohos y Levaduras (M y L).....	122
5.1.2 Características fisicoquímicas.....	124
5.1.2.1 pH	124
5.1.2.2. Actividad de Agua - Aw -	125
5.1.2.3 Humedad	127
5.1.3 Análisis de la incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona y Desoxinivalenol en el arroz en cultivo en Colombia (2017 – 2018)	128
5.1.3.1 Incidencia de Aflatoxinas en el arroz en cultivo	128
5.1.3.2 Incidencia de Zearalenona (ZEA) en el arroz en cultivo.....	131
5.1.3.3 Incidencia de Desoxinivalenol (DON) en el arroz en cultivo	133
5.2 Arroz comercial	135
5.2.1 Características microbiológicas del arroz comercializado en Colombia.....	135
5.2.2 Características fisicoquímicas del arroz comercializado en Colombia	136
5.2.3 Incidencia de micotoxinas en el arroz comercializado en Colombia	137
5.3 Diversidad fúngica asociada al grano de arroz en cultivo.....	138
5.3.1 Análisis de la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp..	139
5.4 Correlación entre la incidencia de micotoxinas, las zonas arroceras y los grupos de microorganismos presentes en el arroz cultivado en Colombia, durante los años 2017 y 2018	140
5.4.1 Correlación entre la incidencia de micotoxinas, las zonas arroceras y los grupos de microorganismos presentes en las muestras de arroz comercial	145
Capítulo VI. Conclusiones	146
Capítulo VII. Referentes Bibliográficos	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y aspectos de producción de los grupos de arroz. Tomado de Parsons & Berlijn (2003).	10
Tabla 2. Clasificación de los granos de arroz según su longitud. Tomado de CIAT (2005)	12
Tabla 3. Composición aproximada del arroz <i>paddy</i> y de sus fracciones de elaboración a una humedad de 14 %. Tomado de Juliano (1994).	16
Tabla 4. Contenido de Vitaminas y Minerales del arroz <i>paddy</i> y de sus fracciones de elaboración a una humedad de 14 %. Tomado de Juliano (1994).....	16
Tabla 5. Contenido de aminoácidos del arroz <i>paddy</i> y de sus fracciones de elaboración al 14 % de humedad. Tomado de Juliano (1994)	17
Tabla 6. Área sembrada, cosechada, producción y rendimiento de arroz mecanizado según principales departamentos productores, I semestre (2017 – 2018). Tomado de DANE – Fedearroz – ENAM I Sem (2018)	24
Tabla 7. Clasificación actual del género <i>Aspergillus</i> . Adaptada de Gams <i>et al.</i> (1985)	30
Tabla 8. <i>Aspergillus</i> productores de aflatoxinas y sus extrolitos quelantes. Adaptado de Varga <i>et al.</i> (2011).	32
Tabla 9. Propiedades físicas y químicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos. Adaptado de (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la OMS, 1983 y Urrego & Díaz, 2006).	43
Tabla 10. Comparativo de las regulaciones sobre el límite máximo de aflatoxinas permitido en arroz. Tomado de Reglamento 165/2010 U.E, FDA, MSPS (2014).	54
Tabla 11. Estudios de contaminación del arroz con aflatoxinas realizados en el ámbito internacional.	55
Tabla 12. Estudios de contaminación del arroz con aflatoxinas realizados en el ámbito nacional.....	58
Tabla 13. Métodos y porcentaje de reducción de DON en alimentos. Tomado de Soriano (2007)	65
Tabla 14. Estudios de contaminación de arroz con Desoxinivalenol realizados en el ámbito internacional	67
Tabla 15. Adsorción <i>in vitro</i> de ZEA por diversos adsorbentes. Tomado de Soriano (2007)	71

Tabla 16. Estudios de contaminación de arroz con Zearalenona realizados en el ámbito internacional	73
Tabla 17. Influencia de la temperatura (T) y la actividad de agua (Aw) en el crecimiento de hongos toxigénicos y producción de algunas micotoxinas <i>in vitro</i> . Tomado de Vaamonde (1987)	76
Tabla 18. Distribución de áreas sembradas por sistema de cultivo y zona arrocera en Colombia. Tomado de DANE - Fedearroz - ENAM I SEM., 2017 - 2018.....	84
Tabla 19. Distribución de las muestras por zona arrocera y sistema de cultivo.....	85
Tabla 20. Proceso de muestreo del arroz comercial	87
Tabla 21. Secuencia de los iniciadores usados en la amplificación de las regiones ITS para la identificación de los aislamientos.....	99
Tabla 22. Programa de PCR utilizado para la amplificación del ITS	100
Tabla 23. Resultados de los análisis microbiológicos practicados a las muestras de arroz cultivado en 2017	104
Tabla 24. Resultados de los análisis microbiológicos practicados a las muestras de arroz cultivado en 2018	105
Tabla 25. Resultados de las variables fisicoquímicas de las muestras de arroz cultivado en 2017	106
Tabla 26. Resultados de las variables fisicoquímicas obtenidas en las muestras de arroz cultivado en 2018	107
Tabla 27. Incidencia de Aflatoxinas (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂) presentes en muestras de arroz cultivado en Colombia – Año 2017.....	108
Tabla 28. Incidencia de Aflatoxinas (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂) presentes en muestras de arroz cultivado en Colombia - Año 2018	109
Tabla 29. Incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona (ZEA) y Desoxinivalenol (DON) en el arroz cultivado en Colombia – Año 2017	110
Tabla 30. Incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona (ZEA) y Desoxinivalenol (DON) en el arroz cultivado en Colombia – Año 2018.....	111
Tabla 31. Resultados de los análisis microbiológicos practicados a las muestras de arroz comercial.	112
Tabla 32. Resultados de las variables fisicoquímicas del arroz comercial.....	113
Tabla 33. Incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona (ZEA) y Desoxinivalenol (DON) en el arroz comercializado en Colombia	114

Tabla 34. Verificación de la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos.	117
Tabla 35. Incidencia de Mohos y Levaduras en el arroz comercial	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hipótesis propuesta por Chang (1976) sobre el origen del arroz.	6
Figura 2. Estructura del grano de arroz.	11
Figura 3. Cadena productiva del arroz en Colombia.....	25
Figura 4. Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i>	30
Figura 5. Fotografía al microscopio electrónico donde se muestra la ornamentación de las esporas de (a) <i>Aspergillus parasiticus</i> (b) <i>Aspergillus flavus</i> (c) y la cabezuela conidial de <i>Aspergillus parasiticus</i>	31
Figura 6. Macroconidia de especies de <i>Fusarium</i> . A-D) variación de la forma y longitud de las macroconidias. E-H) variación de la célula basal de la macroconidia. I-L) variación de la célula apical de la macroconidia.....	35
Figura 7. Estructura química de las principales aflatoxinas.....	40
Figura 8. Biotransformación de las aflatoxinas.....	45
Figura 9. Metabolismo principal de la AFB1 con sus metabolitos reactivos y biomarcadores más importantes. Citocromos: 1A2, CYP1A2, 3A4, CYP3A4, 3A5, CYP3A5; GST, glutation S-transferasa; AFAR, aflatoxina aldehído reductasa; aflatoxina S-G, conjugado aflatoxina-glutation.....	47
Figura 10. Ruta biosintética propuesta para los tricotecenos producidas por <i>Fusarium</i> . Los genes codificadores de enzimas se indican al lado de cada línea que señala una etapa de la síntesis. Las líneas segmentadas indican las etapas en las cuales aún no se ha asignado un gen. El recuadro verde identifica los tricotecenos de tipo B.	61
Figura 11. Estructura química de Desoxinivalenol.	62
Figura 12. Síntesis de DON.....	63
Figura 13. Metodologías analíticas empleadas para determinar DON en cereales.....	66
Figura 14. Estructura Química de Zearalenona.....	68
Figura 15. Cluster de genes involucrados en la biosíntesis de Zearalenona.	71
Figura 16. Principales zonas arroceras de Colombia, señalando los sitios de muestreo de arroz en cultivo y de arroz comercial	86
Figura 17. Cromatograma estándar de Aflatoxinas.....	91
Figura 18. Curvas de Calibración de los Estándares de Aflatoxinas	92
Figura 19. Cromatograma estándar de Zearalenona.....	94
Figura 20. Cromatograma estándar de Desoxinivalenol.	96
Figura 21. Caracterización macroscópica y microscópica de <i>A. flavus</i>	115

Figura 22. Distribución de las cepas fúngicas obtenidas a partir de las muestras de arroz durante el 2017	115
Figura 23. Resultados de la producción de Aflatoxinas por la cepa <i>A. flavus</i> en agar leche de coco y fluorescencia emitida por exposición UV 365nm	116
Figura 24. Electroforesis en gel de los amplicones usados para la identificación molecular. Se muestra la corrida electroforética de la región ITS de 14 aislados. Se indica el tamaño de las bandas de interés del marcador de peso molecular.	118
Figura 25. Incidencia de Coliformes Totales en arroz en cultivo 2017 – 2018	121
Figura 26. Incidencia de Mohos y Levaduras en arroz en cultivo 2017 – 2018	123
Figura 27. pH del arroz en cultivo 2017 – 2018.....	125
Figura 28. Aw del arroz en cultivo 2017 – 2018.....	126
Figura 29. % de Humedad del arroz en cultivo 2017 – 2018.....	127
Figura 30. Incidencia de Aflatoxinas en las zonas arroceras de Colombia 2017 – 2018	129
Figura 31. Incidencia de Zearalenona en las zonas arroceras de Colombia (2017 – 2018)	132
Figura 32. Incidencia de Desoxinivalenol en las zonas arroceras de Colombia 2017 – 2018	134
Figura 33. Características fisicoquímicas del arroz comercial.....	136
Figura 34. Incidencia de micotoxinas en arroz comercial.....	138
Figura 35. Relación de la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos	140
Figura 36. Plano factorial del ACC. Zonas arroceras, incidencia de micotoxinas, y grupos de microorganismos en el arroz en cultivo 2017 – 2018.....	141
Figura 37. Incidencia de micotoxinas 2017 – 2018, sistema riego	143
Figura 38. % Humedad 2017 – 2018.....	143
Figura 39. Incidencia de micotoxinas 2017 – 2018, sistema seco.....	144
Figura 40. Plano factorial del ACC. Zonas arroceras, incidencia de micotoxinas, y grupos de microorganismos en el arroz comercial.	145

La seguridad alimentaria es un aspecto prioritario no sólo para consumidores, sino también para los productores de la industria de los alimentos, cada vez se hace necesario garantizar la calidad de los alimentos y de igual manera el contenido de sustancias nocivas como es el caso de las micotoxinas. Los cambios climáticos, entre los que se destacan la alta humedad relativa, los cambios de temperatura ambiental, las épocas de sequía y de lluvias, junto con deficientes prácticas de almacenamiento son condiciones que favorecen la proliferación de hongos y con ellos, la producción de micotoxinas.

El arroz, es un cereal de alto consumo a nivel nacional y mundial, haciendo parte de la dieta humana básica, su contaminación con especies micotoxigénicas es un problema que afecta a diversos eslabones de la cadena agroalimentaria, por un lado, ocasiona pérdidas en la agricultura (reduciendo la productividad y calidad de la cosecha), y a nivel industrial, puesto que los hongos pueden producir alteraciones y además acumular micotoxinas en el producto. El ingreso de estas toxinas en la cadena alimentaria supone un importante problema de salud pública.

Las micotoxinas son metabolitos producidos de forma natural en el metabolismo secundario de algunos géneros de hongos que ejercen efectos tóxicos en el hombre y en los animales, cuya gravedad depende de la micotoxina implicada y del grado de exposición, estado nutricional y edad del animal y/o del hombre, así como de posibles efectos sinérgicos con otros agentes tóxicos. La presencia de micotoxinas en alimentos y piensos puede causar efectos adversos para la salud en humanos y animales, que van desde trastornos gastrointestinales y renales hasta inmunodeficiencia y cáncer.

Las más importantes a nivel agrícola son las toxinas producidas por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Causan grandes pérdidas económicas en los cultivos de cereales y en procesos de alimentación. Existe una variedad muy amplia de micotoxinas que puede afectar a la salud humana, dependiendo del hongo que las produce, y cuya presencia depende de muchos factores como el tipo de alimento, la humedad y la temperatura. Es por ello, que hay micotoxinas que se forman principalmente en el campo (durante el cultivo), otras durante la cosecha y otras durante el almacenamiento (o en varias etapas a la vez). Una vez presentes en el alimento, se dificulta el proceso de descontaminación, resisten los procesos de secado, molienda y procesado. Además, debido a su estabilidad térmica, no suelen desaparecer mediante los procesos térmicos.

El establecimiento de límites máximos en la legislación es la medida de gestión más eficaz para reducir la exposición a un contaminante en la población general. La OMS alienta a las autoridades nacionales a supervisar y garantizar que los niveles de micotoxinas en los alimentos que se comercializan en sus países sean lo más bajos posible y cumplan con los niveles máximos, las condiciones y las legislaciones nacionales e internacionales.

La exposición a micotoxinas debe mantenerse tan baja como sea posible para proteger a las personas. Las micotoxinas no sólo representan un riesgo para la salud humana y animal, sino que también afectan la seguridad alimentaria y la nutrición al reducir el acceso de las personas a alimentos saludables. La OMS alienta a las autoridades nacionales e internacionales a supervisar y garantizar que los niveles de micotoxinas en los alimentos que se comercializan en sus países sean lo más bajos posible y cumplan con los niveles máximos, las condiciones y las legislaciones nacionales e internacionales.

Capítulo I
Revisión Bibliográfica

1. Arroz (*Oryza sativa* L.)

El arroz, planta monocotiledónea del género *Oryza*, comprende 23 especies de las cuales se cultivan dos: *Oryza sativa* L., originaria del trópico húmedo de Asia y *Oryza glaberrima* Steud, originaria de África Occidental. A ellas pertenecen las más de 2.000 variedades cultivadas en el mundo, a excepción del continente Antártico (FAO, 2004; Blanco, 2014).

Su cultivo comenzó hace casi 10.000 años, en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical (Franquet & Borrás, 2004). Se trata de un cereal considerado como alimento básico en muchas culturas culinarias (en especial la cocina asiática), así como en algunas partes de América Latina. Ocupa el tercer lugar a nivel mundial en cuanto al área sembrada de cereales para el consumo humano, después del trigo y el maíz (MADR, 2010).

1.1 Origen del arroz

El arroz es una gramínea anual, originaria del sur de la India, donde hay condiciones muy favorables para el cultivo (González, 1985). En esa región abundan muchas especies silvestres relacionadas con el cultivo en las zonas ribereñas y deltas de los ríos, donde en un principio el arroz era recolectado (Luque, 2009). No obstante, su cultivo comenzó en China, en los valles de los ríos Hang-Ho y Yang Tse-Kiang, hacia el siglo XV antes de Cristo. En la actualidad, gracias al resultado de los análisis con carbono 14, realizados a granos de arroz descubiertos en excavaciones ubicadas en Pengtoushan, se sabe que el arroz se cultivó a partir de los años 8200 - 7800 a.C. en Hunan (Moquete, 2010). Anteriormente, se habían encontrado pruebas del cultivo del arroz, hace 6000 años a. C., en la provincia de Zhejiang, cerca de Hangzhou (Jin *et al.*, 2014).

Actualmente, se discuten dos hipótesis (Figura 1) que explican, el origen de las especies cultivadas; estos estudios, proponen que la especie ancestral de *O. sativa* puede ser *O. nivara* (*Asia perennis*) del sur y el sureste de Asia. En cuanto que, *O. glaberrima*, puede ser *África perennis* vía *O. breviligulata*, proveniente del África tropical (Acevedo *et al.*, 2006).

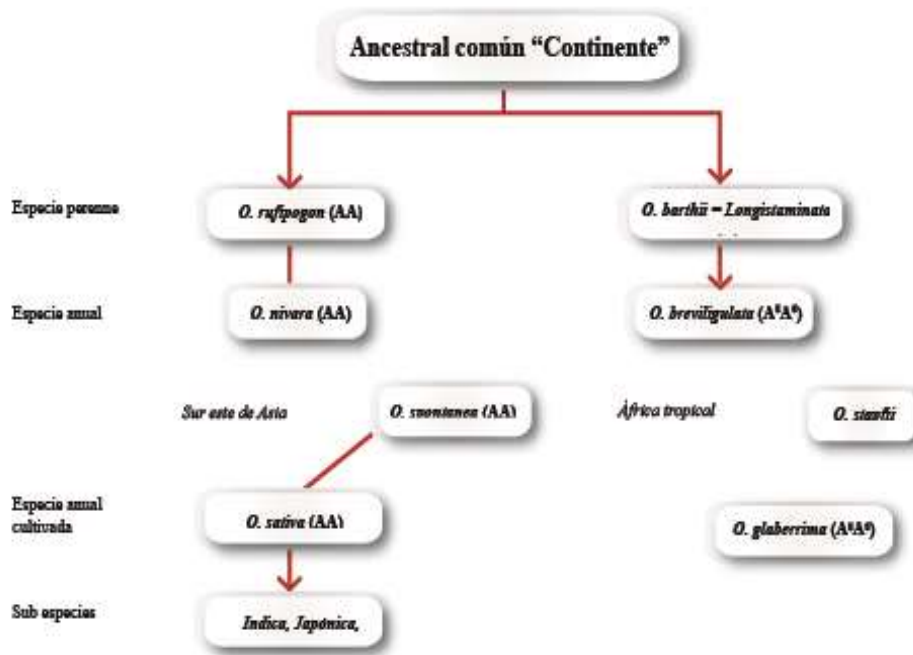


Figura 1. Hipótesis propuesta por Chang (1976) sobre el origen del arroz.
Adaptado de Acevedo *et al.* (2006).

De las dos especies, *O. sativa* es la de mayor importancia económica, ya que es cultivada ampliamente en todo el mundo, incluyendo Asia, América del Norte y Suramérica, Unión Europea, Oceanía y Centro-este de África. La otra especie cultivada, *O. glaberrima*, se cultiva solamente en el oeste de África (Acevedo *et al.*, 2006).

1.2 Morfología de la planta de arroz

El arroz es una gramínea anual, de tallos redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es en panícula. El tamaño de la planta varía de 0.4 m (enanas) hasta más de 7.0 m (flotantes) (CIAT, 2005).

Las principales partes de la planta de arroz son las siguientes:

Raíz. Las raíces son delgadas, fibrosas y fasciculadas. Tiene dos tipos de raíces: las **seminales**, que se originan de la radícula y son de naturaleza temporal y las raíces **adventicias** secundarias, que tienen una libre ramificación y se forman a partir de los nudos inferiores del tallo joven. Estas últimas substituyen a las raíces seminales (Franquet & Borràs, 2004).

Tallo. Es erecto, cilíndrico, hueco y de 60 – 120 cm de longitud. Se forma por la alternación de nudos y entrenudos, puede tener hasta veinte nudos (Franquet & Borràs, 2004). En el nudo o región nodal se forman una hoja y una yema, esta última puede desarrollarse y formar una macolla. La yema se encuentra entre el nudo y la base de la vaina de la hoja (CIAT, 2005).

Macolla. Ramificaciones aéreas procedentes de las yemas laterales de los nudos hipógeos del tallo principal; luego de los tallos primarios, secundarios y terciarios. La planta puede producir segundas y terceras macollas, a partir de las yemas de los nudos inferiores. El tallo con sus hojas forma una macolla. Estas se desarrollan en orden alterno en el tallo principal. Cada macolla está delimitada a una zona de 3 a 5 cm del suelo (Parsons, 2003).

El tallo principal tiene 15 entrenudos y una macolla primaria sale del cuarto nudo, contando desde abajo, el número de macollas será de 11 ($15 - 4$); si la macolla sale del quinto nudo, el número de entrenudos será de 10 ($15 - 5$) y así sucesivamente para las demás macollas.

Las macollas primarias se producen sobre la cuarta semana después del trasplante. Las macollas secundarias y terciarias se desarrollan dentro de la cuarta semana (Parsons & Berlijn, 2003). El número promedio de macollas/planta es de diez a más de treinta. El conjunto de macollas y el tallo principal forman la planta.

Hojas. Las hojas son alternas, envainadoras, con el limbo lineal, agudo, largo y plano (Franquet & Borràs, 2004). La primera hoja que aparece en la base del tallo principal o de las macollas se denomina prófalo, no tiene lámina y está constituido por dos brácteas aquilladas. Los bordes del prófalo aseguran por el dorso las macollas jóvenes a la original. En cada nudo se desarrolla una hoja, la superior debajo de la panícula es la hoja bandera (CIAT, 2005).

Flores. Son de color verde blanquecino, dispuestas en espiguillas, cuyo conjunto constituye una panoja grande, terminal, estrecha y colgante después de la floración. Cada espiguilla es uniflora y está provista de una gluma con dos valvas pequeñas, algo cóncavas, aquilladas y lisas, la glumilla tiene dos valvas aquilladas (Franquet & Borràs, 2004). Las flores de la

planta de arroz están agrupadas en una inflorescencia denominada panícula. La panícula está situada sobre el nudo apical del tallo, denominado nudo ciliar, cuello o base de la panícula; frecuentemente tienen la forma de un aro ciliado. El nudo ciliar o base de la panícula generalmente carece de hojas y yemas, pero allí pueden originarse la primera o las cuatro primeras ramificaciones de la panícula, y se toma como punto de referencia para medir la longitud del tallo y la de la panícula (CIAT, 2005).

El entrenudo superior del tallo, en cuyo extremo se encuentra la panícula, se denomina pedúnculo. Su longitud varía considerablemente según la variedad de arroz; en algunas variedades puede extenderse más allá de la hoja bandera o quedar encerrada en la vaina de ésta. El raquis o eje principal de la panícula es hueco, de sus nudos nacen las ramificaciones. Las protuberancias en la base del raquis se denominan pulvínulos paniculares (CIAT, 2005).

En cada nudo del eje principal nacen, individualmente o por parejas; ramificaciones, las cuales a su vez dan origen a ramificaciones secundarias de donde brotan las espiguillas (CIAT, 2005).

Tanto el peso como el número de espiguillas por panícula cambian según la variedad. La panícula se mantiene erecta durante la floración, pero luego se dobla debido al peso de los granos maduros (CIAT, 2005).

La espiguilla es la unidad básica de la inflorescencia y está unida a las ramificaciones por el pedicelo. Teóricamente, la espiguilla del género *Oryza* se compone de tres flores, pero sólo una se desarrolla (CIAT, 2005). Una espiguilla consta de dos *lemmas* estériles, la raquilla y la florecilla. Las *lemmas* estériles envuelven la flor por debajo de la raquilla. La raquilla es el eje que sostiene la flor.

La flor consta de seis estambres y un pistilo. Los estambres son filamentos delgados que sostienen las anteras alargadas y bífidas, las cuales contienen los granos de polen (CIAT, 2005).

En el pistilo se distinguen el ovario, el estilo y el estigma. El ovario es de cavidad simple y contiene un sólo óvulo. El estilo es corto y termina en un doble estigma plumoso (CIAT, 2005).

Grano o semilla. La semilla de arroz es un ovario maduro, seco e indehisciente. El grano con cáscara se conoce como arroz *paddy*; el grano descascarado de arroz (cariósido), con el pericarpio parduzco, se conoce como arroz-café; el grano de arroz sin cáscara con un pericarpio rojo, es denominado “arroz rojo” (Franquet & Borràs, 2004).

1.3 Clasificación, morfología y fisiología del arroz

El arroz, pertenece a la familia *Poaceae* de las gramíneas y al género *Oryza*, este género comprende varias especies (Franquet & Borràs, 2004). Se cultiva ampliamente en los cinco continentes, en regiones pantanosas de clima templado o cálido y húmedo (DND, 2003). Tiene una forma ovoide, aplanada, su color varía de amarillo a café translucido.

1.3.1 Clasificación del arroz

Las variedades de arroz pertenecientes a la especie (*O. sativa*) han evolucionado en tres subespecies ecogeográficas:

Índica. Originaria de India, es la más antigua, presenta un grano largo y cristalino. De esta subespecie derivan Alena, Basmati, Clavel, Doñana, Gladio, Puntal y Thaibonnet, entre otras variedades de grano largo, preferidas en el norte de Europa (Blanco, 2014).

Japónica. Originaria de China, más adecuada a zonas templadas y caracterizadas por un grano corto, redondo y perlado. De esta subespecie derivan: Bahía, Bomba, Delta, Fonsa, Ganao, Guadiamar, Guara, Lido, Loto, Puebla, Puntal, Senia, Susan, Thainato y Ullal. Es el arroz que se cultiva en las regiones subtropicales de Japón, Corea, zona del Mediterráneo, oeste de los Estados Unidos y parte de Sur América (Durán, 2015). Sus granos son cortos y anchos, su contenido de amilosa es bajo, haciéndolo pegajoso y con tendencia a desintegrarse en la cocción (CIAT, 2005).

Javánica. Grano largo y ancho. Se cultiva principalmente en Burma e Indonesia (Parsons & Berlijn, 2003). En la Tabla 1, se muestran las características y aspectos de producción que presentan los grupos de arroz.

Tabla 1. Características y aspectos de producción de los grupos de arroz. Tomado de Parsons & Berlijn (2003).

CARÁCTER	ÍNDICA	JAPÓNICA	JAVÁNICA
Ciclo vegetativo	Largo	Corto	Muy largo
Tolerancia a contratiempos	Alta	Moderada	Baja
Acame	Susceptible	Resistente	Resistente
Respuesta a fertilización	Baja	Alta	Baja
Color de la planta	Verde claro	Verde oscuro	Verde claro
Macollas	Numerosas	Algunas	Pocas
Grano	Largo/delgado	Corto/grueso	Ancho/grueso
Peso de panoja	Ligero	Pesado	Pesado
Rendimiento	Medio	Alto	Bajo

1.3.2 Morfología del grano de arroz

El grano de arroz (arroz con cáscara o *paddy*) se compone de una cubierta protectora exterior, la cáscara y la cariósida o fruto del arroz (arroz integral o pardo, llamado también arroz descascarillado). El arroz integral o pardo se compone de las capas exteriores: pericarpio, tegumento o cubierta seminal y nucela; del germen o embrión; y del endospermo. Éste se compone de la capa de aleurona, consistiendo el endospermo propiamente dicho en la capa de subaleurona y en el endospermo amiláceo o interno. La capa de aleurona contiene al embrión. El pigmento de color pardo del arroz integral, lo contiene el pericarpio que constituye la capa más externa del grano (Gómez, 1978; Juliano, 1994). La capa de aleurona, varía de 1 a 5 capas celulares, más espesas en la parte dorsal que en la parte ventral, y más gruesa en los arroces de grano corto que los de grano largo. Las células de la aleurona y del embrión son ricas en compuestos proteínicos, que contienen fitatos, y compuestos grasos (Juliano, 1994).

Las células del endospermo, son de pared delgada y están envueltas en amiloplastos que contienen gránulos de almidón compuesto. Las dos capas de las células más exteriores (las subaleuronas) son ricas en proteínas y lípidos y tienen amiloplastos y gránulos de almidón (Juliano, 1994). En la Figura 2, se observa la morfología del grano de arroz, donde se pueden diferenciar sus partes.

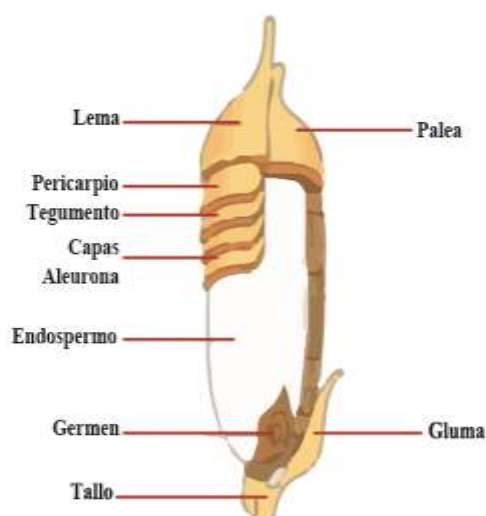


Figura 2. Estructura del grano de arroz.
Tomado de Olmos (2006).

1.3.2.1 Dimensiones de las partes del arroz

La cascarilla o gluma constituye el 20 % del peso del arroz integral o pardo, aunque sus valores van desde 16 a 28 %. La distribución del peso del arroz pardo es la siguiente: pericarpio, 1 - 2 %; aleurona, nucela y cubierta seminal 4 - 6 %; germen, 1 %; escutelo 2 %; y endospermo, 90 - 91 % (Juliano, 1994). Tiene dimensiones de 5 - 10 mm por 1,5 - 5 mm de largo y ancho (Rodríguez, 2007).

1.3.2.2 Características físicas del grano de arroz

Las propiedades físicas del grano de arroz como longitud, anchura, transparencia, grado de elaboración, color y envejecimiento del arroz elaborado son indicadores de la calidad del grano. El color de la cariósida está determinado por cinco genes, y puede ser blanco, que es el más frecuente, rojo o casi negro (Juliano, 1994). El contenido de amilosa del almidón del arroz es el principal factor para su aceptabilidad. Guarda relación directa con la expansión del volumen y la absorción de agua durante la cocción y con la dureza o consistencia, blancura y opacidad del arroz cocido (Juliano, 1994). De otro lado, el grosor y la longitud del grano (Tabla 2), pueden tener importancia comercial, según el mercado consumidor de que se trate.

Tabla 2. Clasificación de los granos de arroz según su longitud. Tomado de CIAT (2005)

GRANO DE ARROZ	TAMAÑO
Extralargo	7,6 mm o más
Largo	7,5 mm a 6,6 mm
Medio	6,5 mm a 5,6 mm
Corto	5,5 mm o menos

1.3.3 Fisiología del arroz

El crecimiento de la planta de arroz es un proceso fisiológico continuo que comprende un ciclo completo desde la germinación hasta la madurez del grano. El desarrollo de la planta es un proceso de cambios fisiológicos y morfológicos que tienen lugar en la misma y modifican su funcionamiento. Los cambios cuantitativos y cualitativos están relacionados con la edad de la planta y dependen, en mayor o menor grado, de la interacción de la planta con el ambiente (Zamalloa, 2008). La planta de arroz tiene tres fases de crecimiento bien diferenciadas, dentro de las cuales ocurren a su vez 10 etapas de desarrollo.

Fase Vegetativa. Por lo general dura de 55 a 60 días en las variedades de período intermedio. Comprende desde la germinación de la semilla, emergencia, macollamiento, hasta la diferenciación del primordio floral (Fernández *et al.*, 1985). Esta fase diferencia unas variedades de otras, según sea la precocidad o tardanza de la misma en alcanzar su respectivo ciclo de cultivo. En esta fase es cuando se determina en gran parte, el número de espigas por planta o por unidad de superficie, debido principalmente al macollamiento de las plantas, lo cual es uno de los tres componentes de rendimiento de una plantación de arroz (Degiovanni *et al.*, 2004; Zarate, 2011).

Fase Reproductiva. Incluye el período desde la formación del primordio floral, embuchamiento (14 - 7 días antes de la emergencia de la panícula), hasta la emergencia de la panícula (floración). Se caracteriza por la aparición de los órganos reproductivos de la planta (Olmos, 2006). Esta fase dura entre 35 y 40 días. Normalmente, la duración de la fase reproductiva en las variedades cultivadas, varía muy poco. En esta fase se determina el

número de granos por panícula, que es también otro de los tres componentes de rendimiento en la producción de un cultivo de arroz (Zarate, 2011).

Fase de maduración. Abarca desde la emergencia de la panícula (floración), el llenado y desarrollo de los granos (estado lechoso y pastoso) hasta la cosecha (madurez del grano) y dura de 30 a 40 días (Olmos, 2006). Esta fase también varía muy poco de una variedad a otra. Y se considera que en esta fase se determina el peso del grano a la madurez, por lo que es el tercero de los componentes de rendimiento en una plantación de arroz (Zarate, 2011).

El ciclo vegetativo y reproductivo de las variedades de arroz varía de 120 a 140 días desde la germinación hasta a la cosecha del grano, aunque actualmente se encuentran variedades de arroz con 105 días a la cosecha con rendimientos aceptables. Cuando las temperaturas son bajas durante la fase vegetativa, el período de desarrollo del cultivo puede alargarse por unos días más hasta 5 meses (150 días) (Zarate, 2011).

1.4 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de arroz

Clima. Se trata de un cultivo tropical y subtropical, aunque la mayor producción a nivel mundial se concentra en los climas húmedos tropicales, también se puede cultivar en las regiones húmedas de los subtrópicos y en climas templados y mediterráneos (Zarate, 2011). El cultivo se extiende desde 49 - 50° de latitud norte a 35° de latitud sur. El arroz se cultiva desde el nivel del mar hasta los 2.500 metros de altitud. Las precipitaciones condicionan el sistema y las técnicas de cultivo, sobre todo cuando se cultiva en tierras altas, donde están más influenciadas por la variabilidad de las mismas (Franquet & Borràs, 2004).

Temperatura. El arroz necesita para germinar temperaturas mínimas comprendidas entre 10 a 13 °C, considerándose su óptimo entre 30 y 35 °C, el crecimiento del tallo, hojas y raíces tiene un mínimo exigible de 7 °C, considerándose su óptimo en los 23 °C. Con temperaturas superiores a ésta, las plantas crecen más rápidamente, pero los tejidos se hacen demasiado blandos e inconsistentes, siendo más susceptibles a los ataques de enfermedades (Zarate, 2011). Por encima de 40 °C no se produce la germinación.

La panícula, usualmente llamada “espiga” por el agricultor, comienza a formarse unos treinta días antes del espigado, y siete días después de comenzar su formación alcanza unos 2

milímetros. A partir de 15 días antes del espigado se desarrolla la espiga rápidamente y es éste el período más sensible a las condiciones ambientales adversas (Franquet & Borràs, 2004).

La floración tiene lugar el mismo día del espigado, o al día siguiente durante las últimas horas de la mañana. Las flores abren sus glumillas durante una o dos horas si el tiempo es soleado y las temperaturas altas. Un tiempo lluvioso y con temperaturas bajas perjudica la polinización (Franquet, 2018).

El mínimo de temperatura para florecer se considera de 15 °C. El óptimo de 30 °C. Por encima de 50 °C no se produce la floración. La respiración alcanza su máxima intensidad cuando la espiga está en zurrón, decreciendo correlativamente después del espigado. Las temperaturas altas de la noche intensifican la respiración de la planta, por lo que el consumo de las reservas acumuladas durante el día por la función clorofílica es mayor. Por esta razón, las temperaturas bajas durante la noche favorecen la maduración de los granos (Franquet, 2018).

La transpiración depende de la humedad y de la temperatura ambiente; la respiración, alcanza también su máximo en el momento en que la espiga se encuentra en zurrón para decrecer después del espigado (Franquet & Borràs, 2004).

Radiación solar. Las necesidades de radiación solar para el cultivo de arroz varían con los diferentes estados de desarrollo de la planta. Una baja radiación solar durante la fase vegetativa, afecta los rendimientos y sus componentes, mientras que en la fase reproductiva existe una marcada disminución en el número de granos (Zarate, 2011). Durante el periodo de llenado a maduración del grano, se reducen drásticamente los rendimientos por disminución en el porcentaje de granos llenos (INIAP, 2010).

Una radiación de 300 cal/cm² por día durante la fase reproductiva hace posibles rendimientos de 5 t/ha. Muchos investigadores coinciden en que, una temperatura alta y abundante radiación solar, son necesarias para el arroz, no obstante, un concepto universal es que, una alta disponibilidad de agua, es el requisito más crítico en su producción (INIAP, 2010).

Precipitación. Considerado el factor más importante por ser una planta hidrófila. Requiere un buen suministro de agua durante la germinación, macollamiento, prefloración, floración, y en la primera mitad de la fase de maduración. Por esta razón, las plantaciones inundadas producen mejores rendimientos. Las plantas pueden crecer en terrenos inundados con la ventaja de poder almacenar el oxígeno producido en la fotosíntesis, en sacos especiales ubicados en las raíces (Rodríguez, 2004).

Suelo. El cultivo tiene lugar en una amplia gama de suelos, variando la textura desde arenosa a arcillosa. Se suele cultivar en suelos de textura fina y media, propia del proceso de sedimentación en las amplias llanuras inundadas y los deltas de los ríos (Franquet, 2018). Los suelos de textura fina dificultan las labores, pero son más fértiles al tener mayor contenido de arcilla, materia orgánica y suministrar más nutrientes. Por tanto, la textura del suelo juega un papel importante en el manejo del riego y de los fertilizantes químicos y orgánicos (Franquet & Borràs, 2004, Franquet, 2018).

pH. La mayoría de los suelos tienden a cambiar su pH hacia la neutralidad pocas semanas después de la inundación. El pH de los suelos ácidos aumenta con la inundación, mientras que para los suelos alcalinos o básicos ocurre justamente lo contrario (Franquet, 2018). El pH óptimo para el arroz es 6,6; con este valor la liberación microbiana de nitrógeno y fósforo de la materia orgánica y la disponibilidad de fósforo son altas y además, las concentraciones de sustancias que interfieren en la absorción de nutrientes, tales como: aluminio, manganeso, hierro, dióxido de carbono y ácidos orgánicos, están por debajo del nivel tóxico (Franquet & Borràs, 2004).

1.5 Características químicas del grano de arroz

Este cereal proporciona el 20 % del suministro de energía alimentaria del mundo, superior al trigo y maíz que aportan 19 y 5 %, respectivamente (FAO, 2004). El arroz constituye una buena fuente de tiamina, riboflavina y niacina.

Entre las fracciones del grano de arroz, el salvado posee el máximo contenido energético y proteico y la cáscara el mínimo. En la Tabla 3, se muestra la composición aproximada del arroz con cáscara y de sus fracciones de elaboración a una humedad de 14 %.

Tabla 3. Composición aproximada del arroz *paddy* y de sus fracciones de elaboración a una humedad de 14 %. Tomado de Juliano (1994).

FRACCIONES	PROTEÍNA * (g)	GRASA (g)	FIBRA (g)	CENIZA (g)	CARBOHIDRATOS (g)	ENERGÍA (Kcal)	DENSIDAD (g/ml)
Arroz <i>paddy</i>	5,8 – 7,7	1,5 – 2,3	7,2 – 10,4	2,9 – 5,2	64 – 73	378	1,17 – 1,23
Arroz integral	7,1 – 8,3	1,6 – 2,8	0,6 – 1,0	1,0 – 1,5	73,0 – 87,0	363 - 385	1,31
Arroz elaborado	6,3 – 7,1	0,3 – 0,5	0,2 – 0,5	0,3 – 0,8	77,0 – 89,0	349 – 373	1,44 – 1,46
**Salvado de arroz	11,3 – 14,9	15,0 – 19,7	7,0 – 11,4	6,6 – 9,9	34,0 – 62,0	399 – 476	1,16 – 1,29
***Cáscara de arroz	2,0 – 2,8	0,3 – 0,8	34,5 – 45,9	13,2 – 21,0	22,0 – 34,0	265 - 332	0,67 – 0,74

* (N * 5,95), ** Salvado de arroz se refiere a las capas de pericarpio, tegumento y aleurona. *** Cáscara de arroz incluye a las capas externas del grano (palea y lema).

En relación a las vitaminas y minerales (Tabla 4), las vitaminas del grupo B se concentran en las capas de salvado al igual que el α -tocoferol (Vitamina E) y fósforo, el arroz elaborado pierde gran contenido de riboflavina (Vitamina B₂) llevándose la mayor parte el salvado de arroz (Rodríguez, 2007).

Por otro lado, el salvado de arroz, es la fracción que presenta más vitaminas y el arroz elaborado es el que se queda con la menor cantidad. En atención a los minerales, el mayor contenido lo constituye el fósforo del cual la mayor parte queda retenida en el salvado, quedando una pequeña parte en el arroz elaborado. Con respecto al calcio, la mayor cantidad se queda en la cáscara del arroz y la menor cantidad se ve reflejada en el arroz elaborado (Rodríguez, 2007).

Tabla 4. Contenido de Vitaminas y Minerales del arroz *paddy* y de sus fracciones de elaboración a una humedad de 14 %. Tomado de Juliano (1994).

FRACCIONES	PROTEÍNA * (g)	GRASA (g)	FIBRA (g)	CENIZA (g)	CARBOHIDRATOS (g)	ENERGÍA (Kcal)	DENSIDAD (g/ml)
Arroz <i>paddy</i>	5,8 – 7,7	1,5 – 2,3	7,2 – 10,4	2,9 – 5,2	64 – 73	378	1,17 – 1,23
Arroz integral	7,1 – 8,3	1,6 – 2,8	0,6 – 1,0	1,0 – 1,5	73,0 – 87,0	363 - 385	1,31
Arroz elaborado	6,3 – 7,1	0,3 – 0,5	0,2 – 0,5	0,3 – 0,8	77,0 – 89,0	349 – 373	1,44 – 1,46
**Salvado de arroz	11,3 – 14,9	15,0 – 19,7	7,0 – 11,4	6,6 – 9,9	34,0 – 62,0	399 – 476	1,16 – 1,29
***Cáscara de arroz	2,0 – 2,8	0,3 – 0,8	34,5 – 45,9	13,2 – 21,0	22,0 – 34,0	265 - 332	0,67 – 0,74

En la Tabla 5, se presenta el contenido de aminoácidos, donde se aprecia que todas las fracciones de arroz tienen un alto contenido de leucina, fenilalanina +, tirosina, y valina; dentro de estas fracciones las que presentan menores valores son el salvado de arroz, cáscara de arroz y arroz elaborado, respectivamente.

Tabla 5. Contenido de aminoácidos del arroz *paddy* y de sus fracciones de elaboración al 14 % de humedad. Tomado de Juliano (1994).

FRACCIONES	HISTIDINA	ISOLEUCINA	LEUCINA	LISINA	METIONINA + CISTEINA	FENILALANINA + TIROSINA	TREONINA	TRIPTÓFANO	VALINA
Arroz <i>paddy</i>	1,5 – 2,8	3,0 – 4,8	6,9 – 8,8	3,2 – 4,7	4,5 – 6,2	9,3 – 10,8	3,0 – 4,5	3,0 – 4,5	4,6 – 7,0
Arroz integral	2,3 – 2,5	3,4 – 4,4	7,9 – 8,5	3,7 – 4,1	4,4 – 4,6	8,6 – 9,3	3,7 – 3,8	3,7 – 3,8	4,8 – 6,3
Arroz elaborado	2,2 – 2,6	3,5 – 4,6	8,0 – 8,2	3,2 – 4,0	4,3 – 5,0	9,3 – 10,4	3,5 – 3,7	3,5 – 3,7	4,7 – 6,5
**Salvado de arroz	2,7 – 3,3	2,7 – 4,1	6,9 – 7,6	4,8 – 5,4	4,2 – 4,8	7,7 – 8,0	3,8 – 4,2	3,8 – 4,2	4,9 – 6,0
***Cáscara de arroz	1,6 – 2,0	3,2 – 4,0	8,0 – 8,2	3,8 – 5,4	3,5 – 3,7	6,6 – 7,3	4,2 – 5,0	4,2 – 5,0	5,5 – 7,5

1.6 Producción de arroz en el mundo

El arroz (*Oryza sativa L.*) es considerado uno de los cereales más importantes del mundo, además de ser un producto básico, posee la mayor extensión de tierra cultivada y el mayor número de personas dedicadas a su producción (Chica *et al.*, 2016).

El cultivo de arroz ocupa 165 millones de hectáreas (mh) en el mundo. India, país con la mayor extensión, 43,7 mh; seguido por China, 31 millones e Indonesia con 14 millones. La mayor extensión en América está ubicada en Brasil, con 2,2 mh; seguida de Estados Unidos con 1,1 millones. Colombia registra 532 mil hectáreas (FAO, 2017).

Los principales productores de arroz *paddy* son los países asiáticos, China e India proporcionan la mitad de la producción mundial. Al sumar el escalafón mundial y en su orden con otros países asiáticos: Indonesia, Bangladesh, Vietnam, Tailandia, Myanmar y Filipinas, se evidencia el 82 % de la producción (Becerra *et al.*, 2019). Colombia ocupa el puesto 25 del escalafón mundial y su aporte a la producción es de 0,3 %, es un participante minoritario en el mundo (Becerra *et al.*, 2019).

En cuanto a la productividad medida a través del rendimiento por hectárea (ha), el promedio mundial es de 4,6 toneladas de arroz *paddy* por ha. El país más productivo es Australia con 10,2 toneladas por ha, seguido por Egipto con 9,4; Estados Unidos con 8,4; Uruguay con 8,2; Colombia ocupa el puesto 34 con 4,8 toneladas por ha, revelando una pérdida en eficiencia relativa del país frente al mundo (FAOSTAT, 2017).

Colombia ha perdido terreno en el desempeño relativo de la productividad frente al mundo y los países arroceros, el país refleja problemas en el progreso y desarrollo de sus sistemas

productivos; una posible explicación de la pérdida de productividad por hectárea habría que buscarla en las fallas internas en la investigación, la adaptación y la adopción de tecnologías funcionales a las condiciones del trópico (Becerra *et al.*, 2019).

2. Arroz en Colombia

Fray Pedro Simón, afirmó que, en Colombia, en el valle del Magdalena hubo siembras en 1850, específicamente en Mariquita (Tolima). En el municipio de Prado (Tolima) se cultivó hace 300 años, y en 1778 lo introdujeron los Jesuitas a San Jerónimo (Antioquía) (Fedearroz, 2013). Hacia 1908, se reportan las primeras siembras a escala comercial en la zona de los Llanos y en 1928 en la costa pacífica en el bajo Atrato (Fedearroz, 2013).

En Colombia, hay gran demanda y consumo de arroz, lo que ha llevado a que el país se convierta en el segundo productor de arroz en América Latina, después de Brasil. El arroz es el tercer producto agrícola en extensión, después del café y el maíz (AGRONET, 2014), representando el 13 % del área cosechada en el país y el 30 % de los cultivos transitorios (Espinal *et al.*, 2005). Su producción representa el 11 % del volumen de la producción agrícola nacional y en términos de valor, representa el 7,68 % de la actividad agrícola y el 3,9 % del total agropecuario (MADR, 2010; Grisp, 2013).

La producción de arroz en Colombia, genera alrededor de 500 mil empleos directos e indirectos, en más de 215 municipios, de 23 departamentos, los cuales dependen en un 90 % de esta actividad (Fedearroz, 2014). Según el III Censo Nacional Arrocerero, existen aproximadamente 21.800 productores, en 26.733 UPA (Unidades Productoras de Arroz), distribuidas en las zonas productoras del país (Fedearroz, 2008). Tradicionalmente, Colombia ha satisfecho su demanda interna con producción propia y realiza importaciones ocasionales en pequeños volúmenes; sin embargo, desde 2012, año en que entra en vigencia el TLC con EU, algunos problemas fitosanitarios, el cambio climático, junto a la posibilidad de importar mayores volúmenes desde el primer año del tratado, ha marcado una tendencia de crecimiento de las importaciones y una disminución del área cultivada, por el desestímulo que el tratado ha generado entre los productores (Chica *et al.*, 2016).

2.1 Principales zonas productoras de arroz

El arroz es un cultivo semestral tropical y subtropical, se cultiva desde el nivel del mar hasta los 1.500 metros de altitud (DANE, 2017). Las precipitaciones condicionan el sistema y las técnicas de cultivo, especialmente cuando se cultivan en tierras altas, donde están más influenciadas por la variabilidad de las mismas.

En relación a las condiciones de clima y suelo, el arroz requiere para su óptimo crecimiento y desarrollo una temperatura promedio de 20 a 38 °C, humedad relativa de 54 a 87 %. El cultivo demanda alta capacidad de absorción y retención de agua, baja permeabilidad y moderada compactación, lo que determina que sean suelos de texturas finas a medias como las arcillosas o franco arcillosas, permitiendo un moderado drenaje y oxigenación, especialmente para arroz riego, además un buen contenido de materia orgánica, baja concentración de elementos o sustancias nocivas como aluminio, sodio y sales solubles y con un pH entre 4 y 7 (DANE, 2017).

En el país, las siembras se realizan en cinco zonas productoras dadas las condiciones agrológicas y geográficas: zona Norte comprende los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Chocó, Córdoba, La Guajira, Magdalena, y Sucre, predomina el sistema riego; la zona del Bajo Cauca o Caribe húmedo correspondiente a la parte baja del río Cauca principalmente, hacen parte de ella los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Antioquia, Chocó, predomina el sistema de secano; la zona Centro con los departamentos de Caquetá, Huila, Tolima y Valle del Cauca; en la zona Llanos Orientales se encuentran los departamentos del Meta y Casanare, se presentan los sistemas de producción riego y secano y zona Santander integrada por Norte de Santander y Santander, predomina el sistema riego (DANE & Fedearroz, 2017). Cada zona arrocera presenta particularidades de clima, suelo, infraestructura y nivel tecnológico, características que influyen en los sistemas de siembra y en los rendimientos de cada región (Fedearroz, 2014).

Colombia al ser un país sin estaciones, puede obtener sus cultivos en cualquier periodo del año, lo que favorece la producción de arroz y es un punto a favor comparando con otros países.

La oferta de arroz está determinada por dos grandes cosechas anuales, la producción del primer semestre del año (siembra del segundo semestre del año inmediatamente anterior), y la producción del segundo semestre del año (siembra del primer semestre del mismo año) (Diagnóstico del mercado del arroz en Colombia, 2012). El mayor volumen de producción de arroz *paddy* se obtiene en los meses de enero, febrero, julio, agosto, septiembre y diciembre, en los cuales se cosecha cerca del 70 % de la producción anual nacional. Aproximadamente, tres cuartas partes de la oferta pertenecen a la Zona Centro (Tolima, Huila) y a los Llanos Orientales (Meta y Casanare) (Hernández, 2005; DANE, 2014).

El arroz se produce en zonas cuyas características ecológicas están determinadas por el tipo de suelo, la disponibilidad de agua, la temperatura, la luz y la atmósfera (Becerra *et al.*, 2019). La disponibilidad del agua determina en alto grado la distribución regional de la producción arroceras y los sistemas de producción del arroz (riego y seco) (Becerra *et al.*, 2019).

2.2 Sistemas de producción

En Colombia, existen dos sistemas de siembra del cultivo del arroz: mecanizado y manual. El primero, como su nombre lo indica, emplea maquinaria (tractores, combinadas y aviones) para la realización de diferentes labores en el proceso productivo (preparación del suelo, siembra, control de malezas y plagas, fertilización o recolección), es el más importante según el área sembrada (participación del 94 %) y está distribuido por todo el país, su producción se comercializa totalmente (Espinal *et al.*, 2005; DANE & Fedearroz, 2017). Por el contrario, el manual o chuzo, emplea mano de obra en todas las actividades, se siembra en pequeñas áreas y generalmente se destina a autoconsumo familiar o como forma de pago por las labores agrícolas (Espinal *et al.*, 2005). Por su parte, el arroz mecanizado se divide en arroz riego y seco.

2.2.1 Sistema riego

Es aquel en que el recurso hídrico es provisto por bombeo o gravedad, ya sea que el agua provenga de distritos de riego públicos o privados, suministrada por el hombre de acuerdo a los requerimientos del cultivo (Cadena, 2018).

Este sistema se caracteriza por el uso intensivo de agua y fertilizantes, y exige además buena preparación del terreno (arada, rastrillada, nivelada y la construcción de caballones), el uso de insumos modernos (semillas mejoradas, plaguicidas, mecanización, etc.) y la aplicación aérea de algunos de ellos, con el fin de obtener altos rendimientos.

El arroz, tiene etapas durante el ciclo del cultivo que son más sensibles a la falta de humedad en el suelo, principalmente después del trasplante, en el macollamiento, durante la iniciación y desarrollo del primordio floral, en la floración y durante el desarrollo de la panícula, hasta dos semanas antes de la cosecha. Es decir, que en un cultivo de arroz con riego los factores que principalmente determinan la productividad son la radiación solar y la temperatura ambiental (SAG, 2003).

El riego para que sea efectivo en la productividad del cultivo, no solamente implica aplicar un suministro adecuado y controlado de agua de buena calidad, sino que también de un desagüe eficiente cuando haya agua en exceso o drenar el terreno para efectuar algunas labores agrícolas como la preparación de tierras o la cosecha de la plantación.

A pesar de que este sistema de cultivo es más costoso, dentro de las ventajas que presenta se encuentra la garantía de asegurar la producción. En la actualidad, los periodos de lluvia son erráticos y no se ajustan al ciclo o a la demanda crítica en las etapas de desarrollo del cultivo. Se recomienda que, los productores de las zonas con menos de 1.000 mm de precipitación pluvial, se dediquen a otros cultivos, por las pérdidas que puede ocasionar una siembra de arroz sin riego suplementario (SAG, 2003).

Otra de las ventajas de un cultivo de arroz riego, consiste en una mejor disponibilidad de nutrientes, además de que los daños por plagas y enfermedades se reducen significativamente.

El sistema de cultivo riego requiere una topografía plana del terreno, ya que, en este caso, el costo de la infraestructura se reduce debido a un menor movimiento de suelo. Las pendientes del terreno de 0,5 a 2 % resultan ser favorables, ya que permiten diseños con recambios de agua de parcela a parcela y evita a la vez la construcción de canales profundos de drenaje,

además de que el recambio de agua puede ser de melga a melga, reduciendo así las pérdidas de suelo y de nutrientes fuera del terreno (SAG, 2003).

Para el sistema riego, la producción anual se ha mantenido relativamente constante y ha oscilado entre 1,1 y 1,6 millones de t, gracias a la disponibilidad de agua, a través de los distritos de riego, durante todo el año. El crecimiento promedio anual entre 2000 y 2018 asciende a 0,28 % (Duque *et al.*, 2019).

2.2.2 Sistema seco

Depende de las precipitaciones para el suministro de agua conllevando a una estacionalidad de las épocas de siembra (Espinal *et al.*, 2005). Este sistema de producción no incluye labores mecanizadas y generalmente usa el producto para atender el autoconsumo familiar y los excedentes los comercializa localmente para completar las necesidades básicas de la familia (Espinal *et al.*, 2005).

Actualmente, solo una cuarta parte de la superficie se cultiva por este sistema. El arroz seco se localiza en tierras planas y de colonización, pero no utiliza riego, sino que aprovecha las aguas lluvias, generalmente se realiza en regiones en las que llueve considerablemente (1.800 a 2.500 milímetros anuales) y se aprovechan esos volúmenes de agua para lograr la producción.

En las zonas de colonización se utiliza como agente civilizador del suelo para establecer posteriormente pastizales, lo cual trae como consecuencias la escasa incorporación de tecnología moderna, el uso de variedades regionales de bajo rendimiento y el empleo intensivo de mano de obra. Según la tecnología usada se pueden distinguir dos modalidades: manual, con rendimientos promedios de 1.6 toneladas por hectárea, y seco mecanizado con rendimientos que alcanzan 4.1 toneladas por hectárea.

El sistema seco manual se siembra generalmente en explotaciones de tamaño pequeño (41 ha en promedio) mientras que el arroz seco mecanizado se siembra en explotaciones medianas (29,5 ha).

Para el sistema seco, la producción refleja una alta estacionalidad, teniendo en cuenta la dependencia al régimen de lluvias del país en las diferentes zonas arroceras. La producción ha oscilado entre 0,5 y 11,1 mt. El crecimiento promedio anual entre 2000 y 2018 asciende a - 0,38 % (Duque *et al.*, 2019).

2.3 Área sembrada en Colombia

En el 2017, se sembraron en Colombia 595.375 hectáreas de arroz, 277.414 por el sistema riego y 317.961 por el seco. El consumo per cápita promedio de los años 2000 a 2017 fue de 41,5 kg promedio para el sector urbano y 45,15 kg para el rural (DANE – Fedearroz, 2017).

El área sembrada de arroz mecanizado en Colombia, durante el primer semestre de 2018, disminuyó 19,4 % (333.778 ha) frente al mismo periodo de 2017. El área sembrada se concentró en los departamentos de Casanare, Tolima, Meta y Huila con 253.095 ha (ENAM, 2018).

El área cosechada durante el mismo periodo, creció 2,6 % (4.526 ha) frente al mismo periodo de 2017. La mayor variación positiva la presentó el grupo resto de departamentos (9,5 %) al cosechar 6.811 ha más con respecto al mismo periodo del año anterior, seguido por el departamento del Meta (4,9 %) al cosechar 687 ha más frente al mismo periodo de 2017 (ENAM, 2018).

La producción nacional de arroz mecanizado en *paddy* verde creció 3,1 % respecto al primer semestre de 2017 (Tabla 6) y alcanzó las 1.020.738 toneladas; explicado principalmente por las contribuciones de la producción en los departamentos de resto departamentos (4,6 puntos porcentuales) y Tolima (2,5 puntos porcentuales) (ENAM, 2018).

El área sembrada en el primer semestre de 2018 fue de 333.778 ha, la zona que registró la mayor área sembrada correspondió a Llanos con 188.663 ha con una participación de 56,5 %, seguida de la zona Centro con 75.902 ha y una participación de 22,7 % (DANE, 2018; ENAM, 2018). La zona Centro registró una contribución positiva a la variación del área sembrada de 0,4 puntos porcentuales, mientras que la zona Llanos presentó una contribución negativa de 13,7 puntos porcentuales (DANE, 2019; Fedearroz, 2019).

Tabla 6. Área sembrada, cosechada, producción y rendimiento de arroz mecanizado según principales departamentos productores, I semestre (2017 – 2018). Tomado de DANE – Fedearroz – ENAM I Sem (2018)

DEPARTAMENTO	ÁREA SEMBRADA			ÁREA COSECHADA ³			PRODUCCIÓN ²			RENDIMIENTO		
	2017-I	2018-I	VARIA CIÓN (%)	2017-I	2018-I	VARIA CIÓN (%)	2017-I	2018-I	VARIA CIÓN (%)	2017-I	2018-I	VARIA CIÓN (%)
	Área (ha)	Área (ha)		Área (ha)	Área (ha)		Tonelada (t)	Tonelada (t)		t/ha	t/ha	
TOTAL NACIONAL	414.059	333.778	-19,4	175.920	180.446	2,6	989.959	1.020.738	3,1	5,6	5,7	0,5
META	68.052	52.063	-23,5	14.018	14.705	4,9	74.395	71.252	-4,2	5,3	4,8	-8,7
CASANARE	161.882	129.562	-20,0	18.331	16.326	-10,9	107.814	93.031	-13,7	5,9	5,7	-3,1
TOLIMA	53.099	55.251	4,1	52.032	54.421	4,6	366.957	391.267	6,6	7,1	7,2	1,9
HUILA	17.190	16.219	-5,6	19.759	16.403	-17,0	138.878	117.562	-15,3	7,0	7,2	2,0
RESTO DEPARTAMENTOS ¹	113.836	80.683	-29,1	71.781	78.592	9,5	301.915	347.626	15,1	4,2	4,4	5,2

¹ Resto Departamentos: Antioquia, Arauca, Atlántico, Bolívar, Caquetá, Cauca, Cesar, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, La Guajira, Guaviare, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Santander, Sucre, Vichada y Valle del Cauca.

² Producción total de arroz *paddy* verde. La producción es el resultado de multiplicar el área cosechada por el rendimiento (t/ha) estimado en el mismo periodo.

³ El área cosechada corresponde al área sembrada del semestre anterior.

Nota: Para el primer semestre de 2018, se perdieron 869,67 hectáreas.

Nota: El área cosechada del primer semestre 2018 se calcula a partir de la resta de las áreas sembradas del semestre directamente anterior y las áreas perdidas del semestre de estudio; las diferencias en estos datos se deben al redondeo de los decimales.

Por su parte, el rendimiento a nivel nacional presentó un crecimiento de 0,5 %, frente al primer semestre del año anterior, al pasar de 5,6 t/ha a 5,7 t/ha. El mayor rendimiento en el primer semestre de 2018 se registró en los departamentos de Tolima y Huila con 7,2 t/ha cada uno, mientras que el departamento que registró la mayor disminución en el rendimiento fue Meta con 8,7 % frente al mismo periodo del año anterior (ENAM, 2018). Durante el primer semestre de 2018, en las zonas arroceras de Bajo Cauca, Santanderes y Costa Norte se registraron 870 hectáreas sembradas perdidas. La causa principal de área sembrada perdida fue por sequía (773 ha) donde la zona más afectada fue Bajo Cauca con 472 hectáreas perdidas.

En cuanto a la producción comparado entre zonas y por sistemas, aunque relacionada directamente con el área depende de su rendimiento en relación a eficiencia en su uso. El rendimiento, definido como el número de toneladas producidas en una hectárea de arroz sembrado, es diferente entre sistemas. El sistema riego siempre ha tenido mayores rendimientos por hectárea que el sistema seco. Esto se debe a que, el cultivo responde con mayor productividad dada la disponibilidad de agua en las diferentes fases de crecimiento de la planta aumentando los granos recolectados (Becerra *et al.*, 2019).

2.4 La cadena de arroz *paddy* verde en Colombia

El esquema de producción y comercialización de la cadena arrocerca (Figura 3) se entiende de acuerdo con las actividades productivas de cada uno de los integrantes de este mercado. De esta manera, en primer lugar, se encuentra la producción agrícola, que corresponde a la siembra y cosecha del arroz *paddy* verde por parte de los agricultores. Este producto constituye la materia prima de todo el proceso productivo. Posteriormente, tiene lugar el proceso industrial desarrollado por los molinos (Palacio, 2015). Una vez el arroz *paddy* verde llega al molino es sometido a procesos de limpieza y reducción del porcentaje de humedad con el objeto de prepararlo para el almacenamiento y la trilla. Dejando como principal producto el arroz blanco y subproductos como la cascarilla de arroz y el arroz integral. La cascarilla de arroz se considera como desecho, aunque en ocasiones es usada como combustible para el proceso de secamiento o como sustrato en viveros y cultivos (Palacio, 2015). El arroz integral, que también puede destinarse directamente al consumo humano, es sometido a un proceso de pulimento, a partir del cual se obtienen el arroz blanco y la harina de pulimento o salvado de arroz. Esta última, se utiliza generalmente como materia prima en la industria de alimentos balanceados para animales (Espinal *et al.*, 2005).

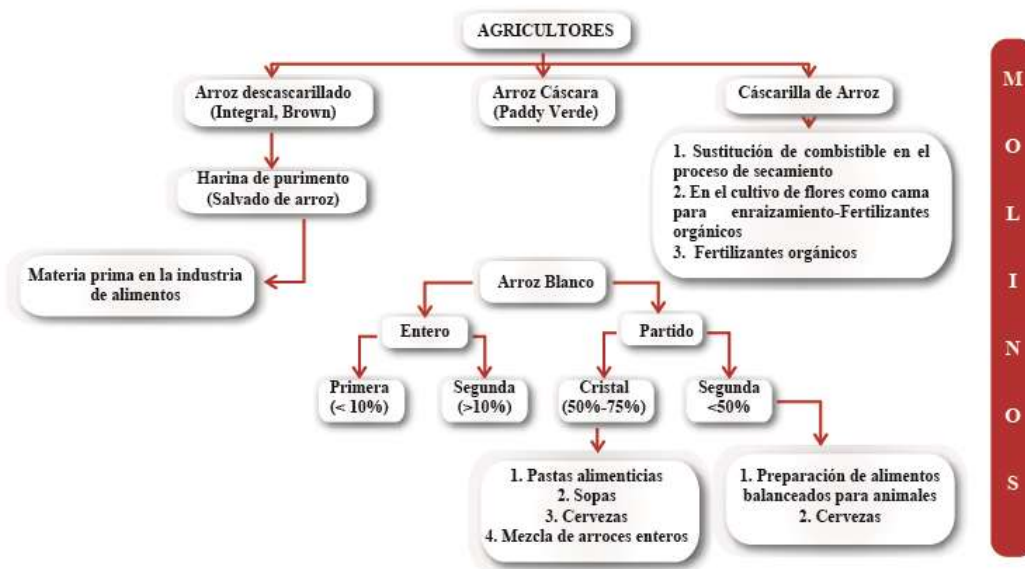


Figura 3. Cadena productiva del arroz en Colombia
Tomado de Espinal *et al.* (2005)

Por último, el arroz blanco entero se destina directamente al consumo humano o se muele para obtener harina de arroz. Suele hacerse una distinción entre el arroz blanco de primera,

el cual tiene un porcentaje de grano partido inferior al 10 % y el de segunda, con un porcentaje de grano partido superior al 10 % (Espinal *et al.*, 2005).

Cuando el porcentaje de grano partido es superior al 10 %, este arroz blanco es clasificado en: arroz partido grande o cristal, vendido como insumo para la fabricación de pastas alimenticias, sopas y cervezas. Y, en segundo lugar, el arroz partido pequeño, que tiene tamaños inferiores a un cuarto de grano, se utiliza en la preparación de concentrados para animales y cerveza (Palacio, 2015).

La demanda de arroz *paddy* corresponde principalmente a la de la industria arrocera que se compone principalmente de la molinería de arroz, y es una de las actividades industriales más dinámicas con respecto a las demás industrias nacionales. Esta industria, se caracteriza porque las materias primas utilizadas tienen una alta participación dentro de la producción bruta y porque sus costos de producción son bajos, conseguidos principalmente con economías de escala, austeridad y eficiencia. Los molinos más grandes del país se encuentran ubicados en la zona de Tolima - Huila, y en los Llanos Orientales (principalmente Meta y Casanare), esta ubicación corresponde a la disponibilidad de materia prima, en la medida en que en estos departamentos se concentra la producción de arroz *paddy* (DANE, 2014).

En Colombia, existen 47 empresas dedicadas a la comercialización de arroz con sus procesos de producción (siembra, cosecha y distribución). En los departamentos de Tolima y Huila se ubican las ocho empresas más importantes en términos de ventas, reconocimiento, capacidad y producción (Superintendencia de Sociedades, 2014).

3. Micobiota del arroz

La biodiversidad de la micobiota presente en el arroz se encuentra en relación directa con el ambiente climático en el que se produce el cereal, con el que se elabore y con las condiciones de conservación. Las esporas de los hongos, es decir, los órganos responsables de su propagación, se alojan inevitablemente en cualquier parte; la germinación y el desarrollo vegetativo del micelio se verifica bajo condiciones térmicas y de humedad diferentes para cada especie de hongo; las condiciones medias idóneas para la vegetación de los microorganismos más comunes y perjudiciales son los siguientes: humedad relativa superior al 90 % y temperatura comprendida entre los 20 y 40 °C (Franquet & Borrás, 2004).

En su desarrollo, los hongos consumen, por su actividad enzimática, sustancias alimenticias a expensas del arroz y producen agua; por su actividad metabólica aumentan la temperatura de la masa de arroz, originando la aparición de sabores y olores desagradables y produciendo sustancias tóxicas llamadas micotoxinas.

En cualquier caso, el arroz conservado y mantenido con un máximo del 14,5 % de humedad se encuentra absolutamente protegido; en este no se producen micotoxinas, salvo inmisiones indeseables de agua u otras contaminaciones accidentales (Franquet & Borrás, 2004).

Por tanto, la prevención de tal contaminación, requiere un control cuidadoso de las condiciones de almacenamiento y la garantía de que los granos de arroz no están contaminados desde la cosecha (Ok *et al.*, 2014).

3.1 Hongos productores de micotoxinas en cereales de espiga

Los hongos productores de micotoxinas están ampliamente difundidos en el medio ambiente y son contaminantes frecuentes de los alimentos, especialmente de origen vegetal (González, 2005). Las especies toxicogénicas de mayor importancia pertenecen a tres géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Abarca *et al.*, 2000). También producen micotoxinas ciertas especies de *Alternaria*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Diplodia*, *Trichothecium*, *Phomopsis*, *Cladosporium*, *Byssochlamys*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia* y *Myrothecium*. Estos organismos son capaces de crecer sobre una gran variedad de sustratos bajo diversas condiciones ambientales (Andino & Castillo, 2010).

La mayoría de los productos agrícolas son susceptibles de la invasión por mohos durante alguna de las etapas de producción, procesado, transporte o almacenamiento. Sin embargo, la presencia de propágulos de estos mohos en un alimento no implica necesariamente la presencia de micotoxinas, sino que indica un riesgo potencial de contaminación (Cómbita & Mildenberg, 2009). También es importante tener en cuenta que las diferentes cepas de una especie dada difieren en su capacidad de producir micotoxinas y es común encontrar cierta proporción de aislamientos no toxicogénicos. Por otra parte, la ausencia de hongos toxicogénicos no garantiza que el alimento esté libre de micotoxinas, pues las toxinas pueden

persistir aun cuando el hongo haya perdido su viabilidad (Northolt & Van Egmond, 1982; Silvestre, 1995).

3.1.1 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita) (Alcalá *et al.*, 2008). Link, en 1809, describió la especie de *Aspergillus flavus* como una especie asexual que sólo produce esporas o conidios asexuales y estructuras asexuales de hibernación denominados esclerocios (Paterson & Lima, 2011).

El género *Aspergillus* está constituido por cerca de 350 especies agrupadas en diversos subgéneros y agrupadas en diferentes secciones (Samson *et al.*, 2014; Frisvad y Larsen, 2015).

La taxonomía tradicional del género se basa principalmente en sus caracteres fenotípicos y fisiológicos, los cuales han aportado satisfactorias delimitaciones de las especies, sin embargo, existen variaciones morfológicas en algunas secciones que han llevado a controversias en sus esquemas taxonómicos. Basándose en estudios moleculares como la secuenciación de genes beta-tubulina o calmodulina los estudios taxonómicos han sido ampliamente revisados y reclasificados en los últimos años (Yu *et al.*, 2010; Paterson & Lima, 2011; Yu, 2012). Estos estudios han permitido una identificación más precisa de las especies, no obstante, seguirán dándose modificaciones en la nomenclatura de *Aspergillus* (Ehrlich, 2014).

Hasta hace poco, se creía que todos los miembros de este género se reproducían de forma asexual, no obstante, estudios moleculares recientes han permitido la identificación de individuos que se reproducen sexualmente debido a que presentan un sistema de reproducción heterotálico (Varga *et al.*, 2014). Estos se clasifican en el orden de los *Eurotiales* y dentro del filo *Ascomycota* (Amaike & Keller, 2011; Paterson & Lima, 2011).

Los criterios morfológicos utilizados para la clasificación de las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos, se basan en la utilización de medios de cultivos diferenciales y temperaturas de incubación que permitan el desarrollo de características útiles en su

identificación (Rodríguez *et al.*, 2007). Las características macro y micromorfológicas, utilizadas en la clasificación a nivel de especie en estos hongos incluyen: el diámetro de las colonias, coloración del anverso y reverso de las colonias, presencia de esclerocios, gotas de exudado y pigmento difusible, textura de las colonias, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula, medidas de los estipes, vesículas, métulas y fiálides, ornamentación y color de las conidias, de las células de Hülle y de las ascosporas (Rodríguez *et al.*, 2007).

3.1.1.1 Características macroscópicas

Son de gran relevancia en la clasificación subgenérica, como el color de los conidios, que se observan en los diferentes medios de cultivo; el color puede variar desde negro, blanco, amarillo, ocre, azul verde, o una mezcla de ellos. Las colonias pueden producir gotas de líquidos en su superficie, ya sea incoloras o con diferentes tonalidades, de igual forma pigmentos de varios colores en el reverso de la colonia (Abarca, 2000; Rodríguez, 2007). El diámetro de las colonias (en mm), es otra característica fisiológica de gran utilidad, atendiendo a que las especies del género pueden variar en su potencial para crecer a diferentes temperaturas y actividad de agua en medios estandarizados.

3.1.1.2 Características microscópicas

Aspergillus es un género mitospórico caracterizado por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre ellos se encuentran las células conidiógenas o fiálides que originan las esporas asexuales o conidios (Figura 4) (Kirk *et al.*, 2001). Los miembros de éste género presentan los conidióforos en posición vertical sencilla, debido al estípote que los sostiene; terminan en una hinchazón claviforme llamada vesícula, tienen fiálides en el ápice o irradiando desde el vértice o toda la superficie (uniseriados), algunas especies presentan esterigmas (biseriados) y contienen varias esporas o conidios unicelulares, globosos, de varios colores (Barnett & Hunter, 2000).

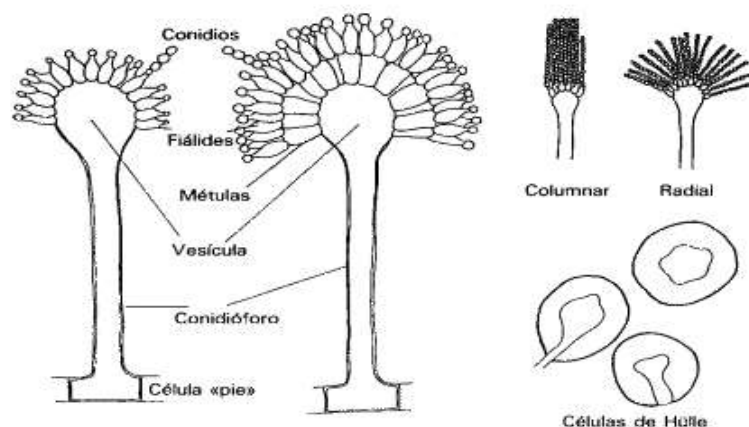


Figura 4. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus*. Adaptado de Samson (1996) y Minter *et al.* (1985).

La clasificación del género *Aspergillus* en subgéneros y secciones (Tabla 7) se basa fundamentalmente en cuatro características: presencia de teleomorfo, presencia o ausencia de méculas, disposición de las méculas o fiálides sobre la vesícula y coloración de las colonias (Abarca, 2000).

Tabla 7. Clasificación actual del género *Aspergillus*. Adaptada de Gams *et al.* (1985)

SUBGÉNERO	SECCIÓN	SINÓNIMO ^a	ESPECIE TIPO	TELEOMORFO
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	Grupo <i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	Grupo <i>A. restrictus</i>	<i>A. restrictus</i>	--
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	Grupo <i>A. fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	Grupo <i>A. cervinus</i>	<i>A. cervinus</i>	--
<i>Ornati</i>		Grupo <i>A. ornatus</i>	<i>A. ornatulus</i>	<i>Warcupiella</i> , <i>Sclerocleista</i> , <i>Hemicarpensteles</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	Grupo <i>A. clavatus</i>	<i>A. clavatus</i>	--
<i>Nidulantes</i>	<i>Nidulantes</i>	Grupo <i>A. nidulans</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Versicolores</i>	Grupo <i>A. versicolor</i>	<i>A. versicolor</i>	--
	<i>Usti</i>	Grupo <i>A. ustus</i>	<i>A. ustus</i>	--
	<i>Terrei</i>	Grupo <i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	--
	<i>Flavipedes</i>	Grupo <i>A. flavipes</i>	<i>A. flavipes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Wentii</i>	Grupo <i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	--
	<i>Flavi</i>	Grupo <i>A. flavus</i>	<i>A. flavus</i>	--
	<i>Nigri</i>	Grupo <i>A. niger</i>	<i>A. niger</i>	--
	<i>Circumdati</i>	Grupo <i>A. ochraceus</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Candidi</i>	Grupo <i>A. candidus</i>	<i>A. candidus</i>	--
	<i>Cremeri</i>	Grupo <i>A. cremeus</i>	<i>A. cremeus</i>	<i>Chaecosartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	Grupo <i>A. sparsus</i>	<i>A. sparsus</i>	--
		Grupo <i>A. sparsus</i>		

^a: grupos establecidos por Raper & Fennell (1965).

Las especies toxicogénicas más importantes y más estudiadas dentro de este género son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, considerados como los principales productores de aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987; Smith 2005; Ruíz & Font, 2007).

También se citan como productores de aflatoxinas: *Aspergillus pseudotamarii* produce AFB₁, AFB₂ y Ácido ciclopiazónico (Ito *et al.*, 2001) y *Aspergillus bombycis* produce AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ (Peterson *et al.*, 2001), esto no ha podido ser confirmado a nivel de laboratorio (Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Cabañes *et al.*, 2007).

3.1.1.3 *Aspergillus* sección *Flavi*

Aspergillus, sección *Flavi*, incluye 22 especies agrupadas en siete subtipos. Dentro de esta sección se clasifican especies productoras de aflatoxinas, como: *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, se encuentran dentro del subgénero *Circumdati* (Varga *et al.*, 2011). En esta sección también se incluye a los hongos no toxigénicos *A. tamarii*, *A. sojae* y *A. orizae*. Pertenecen a los *Hyphomycetes*, División-Forma *Deuteromycota* (Kurtzman *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 2007).

La separación de las especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* se realiza por la presencia de méticas y fiálides. *A. parasiticus* presenta fiálides uniseriadas mientras que, *A. flavus* presenta fiálides uni y biseriadas. Debido a que estas características se presentan muy variables dentro de las especies, actualmente se considera la ornamentación de la conidia como punto principal en la separación (Figura 5).

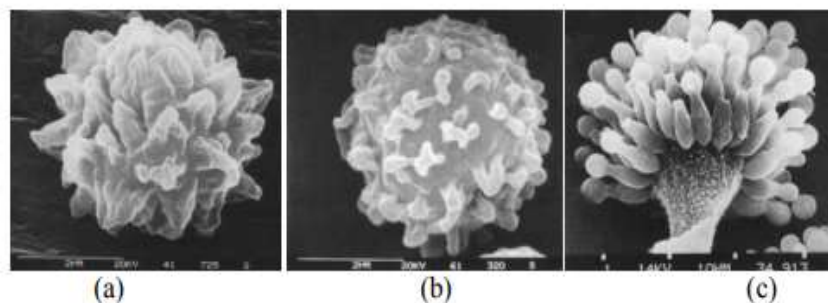


Figura 5. Fotografía al microscopio electrónico donde se muestra la ornamentación de las esporas de (a) *Aspergillus parasiticus* (b) *Aspergillus flavus* (c) y la cabezuela conidial de *Aspergillus parasiticus*. Tomado de Rodríguez *et al.* (2007).

Los miembros de esta sección presentan cabezas conidiales en tonos amarillo verdoso y esclerocios de color marrón oscuro. Varias especies de esta sección han sido descritas teniendo en cuenta sólo aspectos morfológicos como: diámetro, color y textura de la colonia, tamaño y textura de conidios y conidióforos. No obstante, la clasificación por especie se dificulta por la gran similitud en sus características morfológicas (Klich, 2002).

Las conidias de *A. flavus* tienen cabezuelas esféricas a elípticas y son finas a moderadamente ásperas, mientras que *A. parasiticus* presenta cabezuelas más esféricas y equinuladas a espinosas. La separación de *A. nomius* se complica, porque presenta características morfológicas similares a *A. flavus*, excepto que difiere en la producción de pequeños esclerocios en forma de bala, mientras que los de *A. flavus* son más globosos. No obstante, no hay claridad si las cepas de *A. nomius* frescas produzcan esclerocios. La diferencia fundamental entre las tres especies se da en la producción de aflatoxinas B, G y ácido ciclopiazónico (Rodríguez *et al.*, 2007).

Ciertas especies suponen un riesgo potencial para la salud ya que producen micotoxinas (Varga *et al.*, 2011). La presencia de extrolitos (compuestos químicos), ha sido otro buen aporte en la determinación de las especies, cada aislamiento de *Aspergillus* presenta un perfil específico que agrega una importante información para la presencia de micotoxinas (Tabla 8).

Tabla 8. *Aspergillus* productores de aflatoxinas y sus extrolitos quelantes. Adaptado de Varga *et al.* (2011).

ESPECIES	AFLATOXINAS		ÁCIDO CYCLOPIAZÓNICO	ÁCIDO KÓJICO	ÁCIDO ASPERGÍLICO
	B ₁	G ₁			
<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> (<i>Petromyces</i>)					
<i>A. bombyces</i>	+	+	-	+	-
<i>A. flavus</i>	+	-	+	+	+
<i>A. nomius</i>	+	+	-	+	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	+	+
<i>A. parvisclerotigenus</i>	+	±	+	+	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+	+	-
<i>A. toxicarius</i>	-	+	-	+	+

3.1.1.4 Características de *Aspergillus flavus*

Generalmente, las colonias de *A. flavus*, presentan conidios de color verde oscuro y verde oliva, en ocasiones superpuestos con áreas de color amarillo grisáceo a amarillo oliva; micelio blanco; cuando los esclerocios están presentes, de color marrón oscuro a negro, de tamaño y forma variable; en ocasiones presenta exudado incoloro, marrón opaco o color naranja. La colonia presenta una textura variable, de lanosa a flocosa, especialmente en la zona central (Klich, 2002).

Microscópicamente las cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales; estipes rugosos, hialinos o de color marrón pálido, alcanzan tamaños entre 400 – 800 x 8 – 17 μm de largo. Las vesículas presentan forma esférica a alargada, con diámetro promedio entre 20 – 45 μm de ancho. Las métulas alcanzan un tamaño entre 8 – 10 x 5 – 7 μm ; generalmente, las fiálides tienen una longitud de 7 – 12 x 3 – 4 μm . Los conidios presentan forma globosa a elipsoidal, lisos o rugosos, miden entre 3 – 6 μm (Klich, 2002).

Ehrlich (2014), confirmó la existencia de dos variantes de *A. flavus* que incluyen aislamientos aflatoxigénicos y no aflatoxigénicos de cepas presentes en el suelo, clasificadas como: *A. flavus* cepa S (esclerocio < 400 micras) y *A. flavus* cepa L (esclerocio > 400 micras) y la capacidad de producir aflatoxinas (AF) se ha asociado al tamaño de su esclerocio, cepas de S producen mayor cantidad de AF en comparación a las cepas L (Krijgsheld *et al.*, 2013).

El hábitat natural de *A. flavus* es el suelo (Cotty, 1994). Crece muy bien en productos agrícolas especialmente en granos almacenados como el maíz y arroz, donde es saprófito porque su principal fuente de sustrato es la materia orgánica (Ehrlich & Cotty, 2004). Es un microorganismo oportunista que coloniza fácilmente un sustrato cuando hay una fuente de carbono y nitrógeno.

3.1.2 Género *Fusarium*

Es uno de los géneros fúngicos más importantes a nivel mundial, ha sido reconocido como un modelo de patogénesis multi-hospedero por su capacidad de infectar tanto a plantas como a humanos y animales (Ortoneda *et al.*, 2004). Comprende un amplio y diverso grupo de especies de distribución mundial, pueden ser organismos saprófitos que suelen colonizar

sustratos vegetales y constituirse como verdaderos patógenos en cultivos como plátano, avena, arroz, entre otros, y causar graves repercusiones económicas para el sector agrícola, pues de 101 cultivos de importancia económica a nivel mundial, más de 80 pueden ser atacados por *Fusarium* spp. (Leslie & Summerell, 2006).

El género *Fusarium* tiene una amplia distribución en el mundo y gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico (Reyes *et al.*, 2012). Su ocurrencia es cosmopolita. Ha sido reportado como un patógeno emergente que puede ocasionar afecciones tanto en humanos como en animales (Olivares *et al.*, 2005). En humanos, se ha encontrado que la mayoría de los afectados son pacientes inmunosuprimidos, en los que se da una infección a nivel sistémico, razón por la que se reconoce como una causa importante de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. Además, puede causar enfermedades alérgicas y micotoxicosis en pacientes inmunocompetentes por la ingestión de alimentos contaminados por toxinas del patógeno. En cuanto al sector pecuario, se han reportado lesiones superficiales y micotoxicosis en los animales, lo cual ha llegado a generar abortos y disminución en su crecimiento (Desjardins & Proctor, 2007; Nucci & Anaissie, 2007; Fagbamila *et al.*, 2010).

Dentro de este género, se han reconocido 16 especies filogenéticamente diferentes (Starkey *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2008; Yli-Mattila *et al.*, 2009; Sarver *et al.*, 2011) capaces de producir micotoxinas, en particular tricotecenos del tipo B (Proctor *et al.*, 1995; Jansen *et al.*, 2005). Las principales especies productoras son: *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* (Foroud & Eudes, 2009).

F. graminearum crece, de manera óptima, a temperatura de 25 °C y una actividad de agua (A_w) de 0,88; *F. culmorum* lo realiza a temperatura de 21 °C y una A_w de 0,87.

***Fusarium* spp.** crece rápidamente en agar papa dextrosa a 25 °C, produciendo un micelio algodonoso e incoloro al principio, una vez madura adquiere un color crema o amarillo pálido, bajo ciertas condiciones adquiere una tonalidad rosa pálido, rojo o púrpura (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

3.1.2.1 Caracterización morfológica

Este hongo produce un micelio septado hialino que produce tres tipos de esporas asexuales llamadas: microconidios, macroconidios y clamidosporas (Figura 6).

La forma y tamaño de las esporas son características principales para el reconocimiento de *Fusarium* spp. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios.

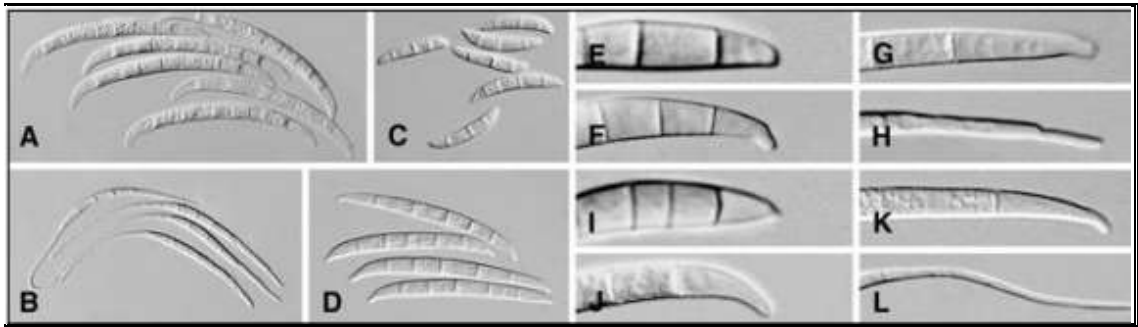


Figura 6. Macroconidia de especies de *Fusarium*. A-D) variación de la forma y longitud de las macroconidias. E-H) variación de la célula basal de la macroconidia. I-L) variación de la célula apical de la macroconidia.

Tomado de Summerbell *et al.* (2003).

Los microconidios, son producidos en el micelio aéreo solo o en cadenas, tiene de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre se producen los dos tipos de esporas. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Booth, 1971 citado por Carrillo, 2003).

Las macroconidias son esporas típicas de *Fusarium* spp., están constituidas por 3 o 5 células, que se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. Pueden producirse en el micelio aéreo ya sea en monofiálides o polifiálides. El último tipo de esporas son las clamidosporas, constituidas por una o dos células, son esporas redondas de pared gruesa lisa o rugosa y contienen un material lipídico que le permite al hongo vivir en situaciones adversas (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

3.1.2.2 *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae*)

Esta especie presenta las siguientes características: esporodoquios escasos, si están presentes son de color naranja pálido. El macroconidio es relativamente delgado en forma de hoz de 2,5 x 35 - 63 µm, puede contener entre 5 a 6 septos, se caracterizan por presentar una célula basal con forma de pie bien desarrollada. Microconidios ausentes.

Las clamidosporas son globosas, miden entre 10 a 12 µm de diámetro. Es un hongo homotálico (el único dentro de este género) y sus peritecios son de color negro. Se forman a partir de un estroma de forma ovoide y papilado. La temperatura óptima para que se forme esta estructura es de 29 °C, y requiere alta humedad relativa e incidencia de luz UV. El teleomorfo de esta especie es *Gibberella zeae*.

3.1.2.3 Caracterización molecular

A nivel de diagnóstico molecular se han desarrollado varias pruebas para la identificación y detección de *Fusarium* spp., la mayoría de ellas se basan en la técnica PCR con primers específicos. La PCR ofrece sensibilidad y especificidad como herramienta para detectar, identificar y cuantificar especies de *Fusarium*, así: ensayos de PCR fueron desarrollados para *F. graminearum* (Schilling *et al.*, 1996; Niessen & Vogel, 1998; Nicholson *et al.*, 1998), *F. culmorum* (Schilling *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 1998), *F. poae* (Parry & Nicholson, 1996), *F. cerealis* (Yoder & Christianson, 1998) y *F. avenaceum* (Schilling *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1998).

La aplicación del concepto de especies filogenéticas para *Fusarium* puede en algunas ocasiones clarificar las dificultades taxonómicas. Muchos estudios filogenéticos en hongos son basados a partir de secuencias de DNA obtenidas de aislamientos caracterizados. Entre los primers mayormente empleados se encuentran: ITS, β-tubulina, citocromo oxidasa y actina, entre otros.

Amplificación de ITS's. Los primers ITS (Internal transcribed spacer) son empleados para la identificación del género *Fusarium* (Sreenivasa *et al.*, 2007). Los genes de RNA ribosomal (rDNA) poseen características adecuadas para la detección de patógenos a nivel de especie.

Estos rDNA son altamente estables y exhiben un mosaico de regiones diversas y conservadas dentro del genoma (Hibbet, 1992 citado por Abd-Elsalan *et al.*, 2003). Estos también se

encuentran en múltiples copias, con más de 200 copias por genoma haploide (Bruns *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1992 citados por Abd-Elsalan *et al.*, 2003) dispuestos en tándem, donde cada repetición consiste en una subunidad pequeña 18S (SSU), y los genes de las subunidades grandes 5.8S y 28S (LSU). Las regiones ITS han sido usadas acertadamente para generar primers específicos capaces de diferenciar especies de hongos relacionadas cercanamente.

Los primers ITS-Fu-f y ITS-Fu-r fueron diseñados comparando secuencias alineadas de las regiones de los ITS a partir de un amplio rango de especies de *Fusarium* (Kamel *et al.*, 2003). Estos primers muestran buena especificidad para el género *Fusarium*, y su producto de amplificación es de aproximadamente 389bp (Kamel *et al.*, 2003).

Amplificación de β -tubulina. La β -tubulina es una proteína del citoesqueleto, altamente conservada a través de la evolución de los eucariotes (Gong *et al.*, 2007). A partir de las secuencias del gen nuclear de la β -tubulina se diseñaron una serie de primers que codifican fragmentos específicos del mismo.

Amplificación de la citocromo oxidasa. La citocromo oxidasa es una enzima óxido reductasa que interviene en la cadena transportadora de electrones. Los primers AHy fueron diseñados a partir de las secuencias de *Fusarium oxysporum* para amplificar un fragmento de 567bp de Cox1 (Gilmore *et al.*, 2007).

Amplificación de actina. La actina es una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos. El gen que codifica para la actina es conservado a través de los eucariotas. Por lo tanto, éste ha recibido gran atención como un gen de “reloj molecular” para estudios de filogenia de organismos. Típicamente, la actina es un gen altamente expresado, haciendo valioso el promotor de este gen en la fusión de genes heterólogos.

Los primers utilizados corresponden a secuencias de oxioligonucleotidos sintetizados basados en secuencias de ORF (open reading frame). Weiland *et al.* (2000), emplearon los primers diseñados para la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la proteína de actina en su identificación de los patógenos fúngicos que atacan la caña de azúcar; con estos primers identificaron patógenos del género *Fusarium*.

4. Micotoxinas

Derivan de las palabras griegas: *mikes* (hongo) y *toxina* (veneno), son metabolitos secundarios tóxicos producidos por ciertos hongos filamentosos, durante su fase estacionaria siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Atanda *et al.*, 2012; Santini & Ritieni, 2013), que cuando se ingieren, inhalan o absorben pueden causar efectos adversos en la salud o incluso la muerte en humanos y animales (Khan *et al.*, 2008; McLaughlin *et al.*, 2009; Stoev, 2013). Pueden contaminar productos agrícolas, antes de la cosecha (en campo) o posteriores a ella (almacenamiento, transporte, procesamiento) (Jin *et al.*, 2010; Kana *et al.*, 2013).

Las micotoxinas son moléculas pequeñas, de peso molecular menor a 700 Da. La mayor parte de ellas se originan en la ruta policetónica, resultantes de reacciones de condensación, que en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos (Gimeno & Martins, 2011). Aunque existen otras rutas biosintéticas más complejas y las mismas relacionadas con un menor número de especies fúngicas productoras de la toxina (Moss, 1991; Zain, 2011; Zaki *et al.*, 2012). 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 (Soriano, 2007).

Una misma cepa toxigénica puede producir diferentes micotoxinas y una micotoxina puede ser sintetizada por diferentes hongos. Estos metabolitos poseen una estructura química y una actividad biológica muy variada. Existen alrededor de 400 micotoxinas, de las cuales las más importantes por sus efectos adversos sobre la salud humana y animal son: aflatoxinas, ocratoxina A, fumonisinas, tricotecenos, zearalenona y patulina (Bräse *et al.*, 2009).

La contaminación por micotoxinas en el arroz es causada por la presencia de especies fúngicas que tienen una capacidad potencial para producir estos metabolitos secundarios, el desarrollo de estos hongos en el grano ocurre en campo, durante su formación, o en almacenamiento, si en esta última etapa no es adecuadamente tratado durante el procesamiento del grano. La presencia o ausencia de éstas depende de diferentes factores como: sus interacciones con otros organismos en el sustrato donde coexisten, el área de producción, su climatología, prácticas agrícolas y poscosecha, entre otros.

Diferentes estudios a nivel mundial han indagado sobre los diversos tipos, frecuencia y ocurrencia de estos metabolitos en dicho cereal, donde las principales micotoxinas que se han identificado en el arroz son: aflatoxinas, desoxinivalenol, citrinina, fumonisinas, zearalenona, patulina, esterigmatocistina; sus niveles varían ampliamente en las diferentes muestras analizadas.

La contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad alimentaria, en atención a su carácter inevitable e imprevisible (López & Park, 1999). Debido a la importancia del arroz como elemento básico de la dieta humana, se hace necesario llevar a cabo más investigaciones sobre este tema.

4.1 Aflatoxinas (AF)

La palabra aflatoxina proviene de la primera letra “A” que denota al género *Aspergillus*, seguida de las tres letras “FLA” correspondiente a la especie *flavus* y el sustantivo “toxina” que significa veneno (Ellis *et al.*, 1991).

Las aflatoxinas constituyen un grupo muy relacionado de metabolitos heterocíclicos sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, encontradas principalmente en productos agrícolas en regiones tropicales y subtropicales (Payne & Brown, 1998; Lesczynska *et al.*, 2000; Mugal *et al.*, 2017). Aunque también son producidas por otras especies de *Aspergillus*, como: *Emericella* spp. (Reiter *et al.*, 2009).

Dentro de cada especie aflatoxigénica, se han evidenciado importantes diferencias cualitativas y cuantitativas en las habilidades toxigénicas entre las diferentes cepas. Por ejemplo, sólo alrededor de la mitad de las cepas de *A. flavus* sintetizan AF (Klich & Pitt, 1988), llegando a producir más de 106 mg/kg (Cotty *et al.*, 1994).

Hay más de 20 aflatoxinas conocidas, sin embargo, únicamente las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se originan de manera natural en sustratos contaminados por *Aspergillus* aflatoxigénicos (Inan *et al.*, 2007). Mientras que, las AFM₁ y AFM₂ son los metabolitos hidroxilados de AFB₁ y AFB₂ (Giray *et al.*, 2007; Paterson & Lima, 2010).

Las AFB₂, AFG₁ y AFG₂ son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB₁ (Forouharmeh *et al.*, 2013) en (Rangel, 2019).

Las demás aflatoxinas (P₁, Q₁, aflatoxicol, etc.) ocurren como productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Smith *et al.*, 1991). Las toxinas tipo B se caracterizan por la fusión de un anillo ciclopentanona a un anillo lactona de la estructura cumarina, mientras las toxinas G contienen un anillo lactona fusionado en lugar del anillo ciclopentanona (Figura 7).

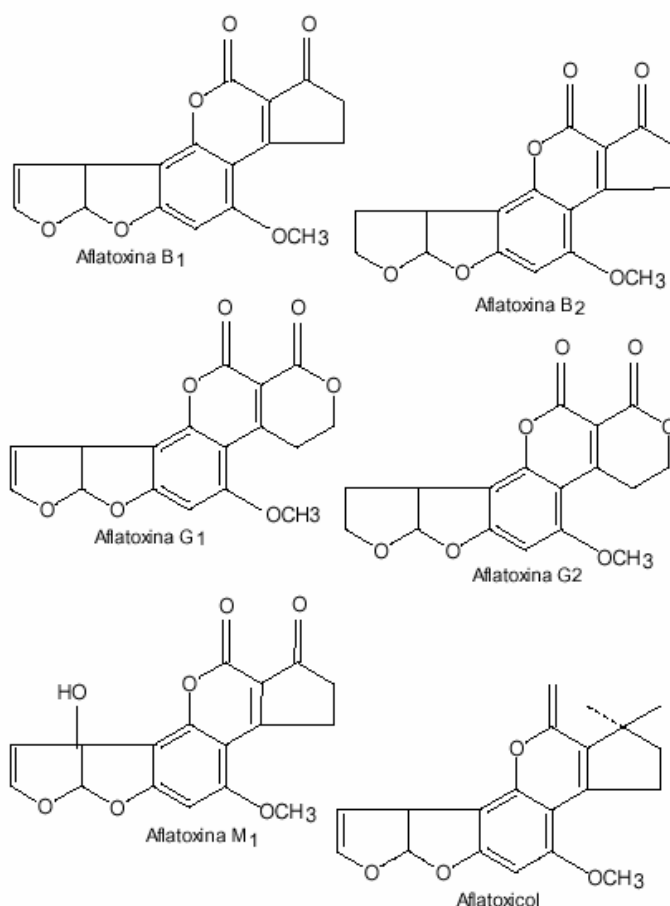


Figura 7. Estructura química de las principales aflatoxinas Tomado de FAO (1991).

4.1.1 Clasificación de las aflatoxinas

Las AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂, son las más importantes y son halladas usualmente juntas, en diferentes proporciones, en los alimentos contaminados por *A. flavus* o *A. parasiticus*. La AFB₁, es la más frecuente y tóxica. La nomenclatura hace referencia a sus propiedades físicoquímicas, ya que las de tipo B presentan fluorescencia azul (blue) y las de tipo G

fluorescencia verde (green) cuando se les observa bajo luz ultravioleta a 365 nm (De Jimeno *et al.*, 1980). El subíndice 1 indica mayor movilidad cromatográfica que el 2. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B₁ 268 - 269 °C, B₂ 286 - 289 °C, G₁ 244 - 246 °C, G₂ 237 - 240 °C, M₁ 299 °C, M₂ 330 °C) (Detroy, 1971).

Existen varios derivados hidroxilados de las AFB₁ y AFB₂, conocidos como AFM₁ y AFM₂, respectivamente, se excretan en la leche de animales que consumieron alimentos contaminados con aflatoxinas. Las AFM₁ y AFM₂ son igualmente activas y eso constituye un riesgo para la salud humana. Estos derivados hidroxilados, pueden estar presentes en leche líquida y en polvo (Blunden *et al.*, 1991).

4.1.2 Características químicas y propiedades físicas de las aflatoxinas

Las principales características químicas y físicas que presentan las AF son:

- Baja solubilidad en agua (10 – 30 µg/ml).
- Solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo, acetona, debido a que los cristales de aflatoxinas no tienen las mismas propiedades de la AF naturales.
- Relativamente inestables al estado de sustancia pura, a la luz y al aire.
- Susceptibles a la hidrólisis alcalina.
- Son afectadas al tratarse con amoníaco o con soluciones de hipoclorito de sodio.
- (pH>10.5).
- Son termo-resistentes.
- Estables en un rango de pH entre 3 y 10.

Las AF son libremente solubles en disolventes moderadamente polares (por ejemplo en cloroformo y metanol) y especialmente en dimetilsulfóxido (disolvente empleado habitualmente como vehículo en la administración de aflatoxinas a animales experimentales); la hidrosolubilidad de las AF registra una amplitud de 10 – 20 mg/litro.

En estado puro las AF son sumamente estables a temperaturas elevadas, cuando se calientan en aire. Son resistentes al calor durante una amplia gama de temperaturas, incluidas las alcanzadas durante condiciones comerciales de procesamiento (Sirot *et al.*, 2013). Sin embargo, son relativamente inestables, cuando se exponen a la luz, particularmente a la

radiación ultravioleta y al aire en una placa de cromatografía de capa delgada, especialmente cuando se disuelven con sustancias altamente polares. Las soluciones de cloroformo y benceno son estables por muchos años si se mantienen en lugar oscuro y frío.

En las condiciones ordinarias de cocción y en el calentamiento del proceso de pasteurización hay poca o ninguna destrucción de AF. Sin embargo, el tostado del maní reduce apreciablemente las concentraciones de AF que pueden ser destruidas totalmente con un tratamiento drástico como el calentamiento en autoclave en presencia de amoníaco o el tratamiento con hipoclorito.

La presencia de un anillo de lactona en la molécula de las AF las hace susceptibles a la hidrólisis alcalina (De Iongh *et al.*, 1962). Esta característica es importante por cuanto, todo proceso de elaboración de alimentos que incluya tratamiento alcalino puede reducir la contaminación de los productos; si bien la presencia de proteínas, el pH y la duración del tratamiento pueden modificar los resultados (Beckwith *et al.*, 1975). Sin embargo, si el tratamiento alcalino es leve, la acidificación invertirá la reacción, reconstituyendo la aflatoxina original. La descontaminación de granos enteros de maíz con una humedad del 16 %, mediante amoníaco al 2 % durante una hora a 55 atmósferas de presión y 40 – 45 °C destruye hasta el 93 % de las toxinas (Martínez *et al.*, 1994).

El tratamiento de un sustrato contaminado con hipoclorito de sodio al 0,5 - 1 % a pH 4 degrada las AFB₁ y AFG₁ a cualquier temperatura, mientras que la cantidad de B₂ y G₂ decrece al calentar, desapareciendo ambas a 100 °C. El tratamiento con bisulfito de sodio al 1 % tiene poco efecto sobre la AFB₁ a 20 °C pero solamente persiste el 10 % a 100 °C. Igual cantidad residual se observa luego del tratamiento a 20 °C con persulfato de amonio al 0,1 %, y a 60 °C con agua oxigenada al 0,1 %. En la Tabla 9 se sintetizan las propiedades químicas de algunas AF y metabolitos de ocurrencia natural.

Tabla 9. Propiedades físicas y químicas de algunas aflatoxinas y sus metabolitos. Adaptado de (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la OMS, 1983 y Urrego & Díaz, 2006).

AFLATOXINA	FÓRMULA MOLECULAR	MASA MOLECULAR RELATIVA (g/mol)	PUNTO DE FUSIÓN (°C)	ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA (E*)		EMISIÓN DE FLUORESCENCIA (nm)
				265 nm	360 – 362 nm	
Serie 1 difuro-cumaro-ciclo-pentanonas						
B ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	12,400	21,800	425
B ₂ ^a	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286 – 289	12,100	24,000	425
G ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244– 246	9,600	17,700	450
G ₂ ^a	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330 ^b	237 – 240 ^b	8,200	17,700	450
M ₁ ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14,150	21,250 (357 nm)	425
M ₂ ^a	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12,100 (264 nm)	22,900 (357 nm)	--- ^c
Serie 2 difuro-cumaro-lactonas						
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	328	244 – 246	9,600	17,700	450
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237 – 240 ^b	8,200	17,700	450

^a El coeficiente de absorción molar de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ se obtuvo de *Rodricks et al. (1970)* y el correspondiente a las aflatoxinas M₁ y M₂ de *Stubblefield et al. (1972)*.

^b Datos de *Butler (1974)*.

^c Fluorescencia violeta de aflatoxina M₂.

4.1.3 Biosíntesis de las aflatoxinas

La biosíntesis de AF es una actividad del metabolismo secundario de ciertos hongos del género *Aspergillus* y se ve influenciada por factores bióticos y abióticos (Yu, 2012). Estos factores influyen en la expresión del gen regulador de AF (*afl-R*) que pueden alterar el proceso de transcripción (Yu *et al.*, 2010).

Este proceso es considerado complejo, en él está involucrada la condensación de un acetyl con tres o más unidades de malonil con la pérdida de CO₂ (Brechbeler-Bader *et al.*, 1967; Buchi & Rae, 1969). La biosíntesis de estas sustancias se relaciona con la de los lípidos y se asume una disminución en la síntesis de proteínas en algunos casos. Al inicio del crecimiento del hongo la producción de AF 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 AF (Brechbeler-Bader *et al.*, 1967; Wogan *et al.*, 2012).

Las AF son sintetizadas extramitocondrialmente a partir de la acetyl coenzima A, derivada del catabolismo de carbohidratos simples. Los intermediarios glicolíticos estimulan la producción de AF asociadas a la caída de niveles de piruvato y fosfoenolpiruvato, los cuales

son precursores de tres carbonos del acetato y malonato (Eaton & Gallagher, 1994). En la primera fase de la biosíntesis de estas micotoxinas, el acetato y la malonilCoA son convertidos a hexanoilo mediante una sintetasa de ácido graso.

Este hexanoilo es extendido por una policétidosintetasa hasta el decacétido ácido norsolorínico, primer precursor estable en la biosíntesis de las AF. El policétido sufre posteriormente de 12 a 17 transformaciones enzimáticas a través de vías intermediarias que se resumen en la averantina, la hidroxiaverantina, la averufina, la hidroxiversicolorina, el acetato hemiacetalversiconal, el versiconal, la versicolorina B, la versicolorina A, la dimetilesterigmatocistina, la esterigmatocistina, la orto-metilesterigmatocistina, AFB₁ o B₂, G₁ o G₂, al dividirse la vía en dos ramas (Cary *et al.*, 2001; Bhatnagar *et al.*, 2002, Moreno, 2004; Yu & Arora, 2004).

4.1.4 Biotransformación de las aflatoxinas

Una vez las AF ingresan al organismo, por sus características liposolubles, son absorbidas en el tracto gastrointestinal, donde, mediante la circulación portal, son metabolizadas a nivel hepático, principalmente por la familia del citocromo P₄₅₀.

Clifford & Rees (1967), citados por Zintzen, sugirieron que el mecanismo de acción de las AF en el organismo toma la siguiente secuencia:

- Penetración a las células y a sus núcleos.
- Combinación con el ADN.
- Reducción de la síntesis de ARN, especialmente del m-ARN.
- En pocos minutos bloquean la proteosíntesis y a causa de la inhibición del m-ARN también se inhibe la mitosis.
- La inhibición de la mitosis es seguida por la muerte celular.
- El metabolismo hepático en humanos de aflatoxinas, y presumiblemente en otros tejidos, dependerá en gran parte del contenido del citocromo P-450 el cual está controlado por factores exógenos y endógenos.

La AFB₁ requiere la activación del citocromo P₄₅₀ dependiente de la oxidasa de función mixta para convertirse en distintos metabolitos activados. Una vez absorbida la AFB₁ desde el tracto digestivo llega al tejido hepático donde pasa por dos fases (Figura 8):

Fase I: por acción del complejo citocromo P₄₅₀ monooxigenasa, produce derivados reducidos y oxidados que supuestamente no presentan actividad carcinogénica. Pero, también produce AFB₁ 2,3-epóxido, que es un producto inestable y que forma aductos con el ADN, ya que se une al N-7 de la Guanina formando el aducto AFB₁-GUA. Esta unión conlleva a mutaciones en proto-oncogen y genes supresores de tumores. Reacción importante para el inicio del cáncer.

Fase II: el epóxido formado se conjuga con proteínas, puede sufrir hidroxilación o puede conjugarse con el glutatión (GSH) en el hígado, por la acción de la glutatión -S transferasa y ser excretado en la orina y en las heces como ácido mercaptúrico, combinándose con proteínas a los diferentes tejidos y provocando diversas clases de intoxicaciones, además de los efectos carcinogénicos, la AFB₁ y sus metabolitos pueden afectar a cualquier órgano.

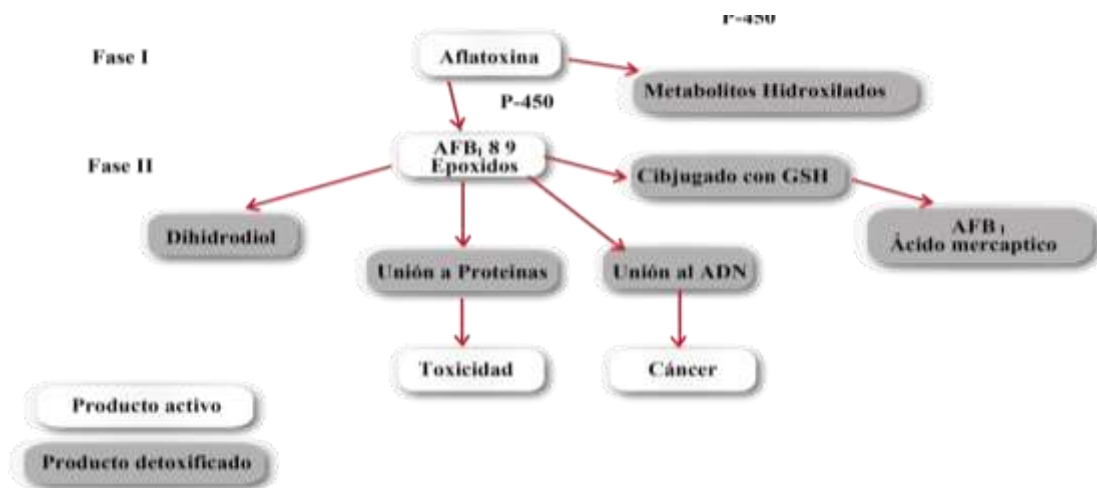


Figura 8. Biotransformación de las aflatoxinas

Los metabolitos involucrados en estas reacciones son (Figura 9):

AFB₁- epóxido: este metabolito de alta reactividad, no ha sido aislado en sistemas biológicos ni sintetizado químicamente. La formación de este epóxido bien pudiera ser la clave de la toxicidad aguda y crónica, puesto que los animales que carecen de las vías metabólicas para producirlo son bastantes resistentes a ambas. Los animales que producen el epóxido, pero no lo metabolizan eficazmente después, quizá sean los más sensibles a la actividad carcinogénica de la AFB₁, pero son relativamente resistentes a la actividad aguda.

Y los animales que no sólo producen este epóxido, sino que también lo eliminan por medio de una enzima hidrolítica, produciendo un hidroxiacetal muy reactivo, son los más sensibles a la toxicidad aguda. Se sabe que este epóxido reacciona con los residuos de guanina del ADN pudiendo causar la consiguiente depurinificación (Ellis, 1987).

AFB₁- dihidrodíol: se forma por la hidrólisis enzimática y no enzimática del epóxido. La AFB₁ puede unirse de forma covalente para formar aductos con la hemoglobina, la albúmina, la lisina, la adenosina y la citosina (Gropman *et al.*, 1994; Carvajal, 2013). La molécula madre puede ser considerada, así como un efectivo sistema de distribución, teniendo las adecuadas propiedades para su absorción intestinal y su transmisión hasta el hígado y otros órganos.

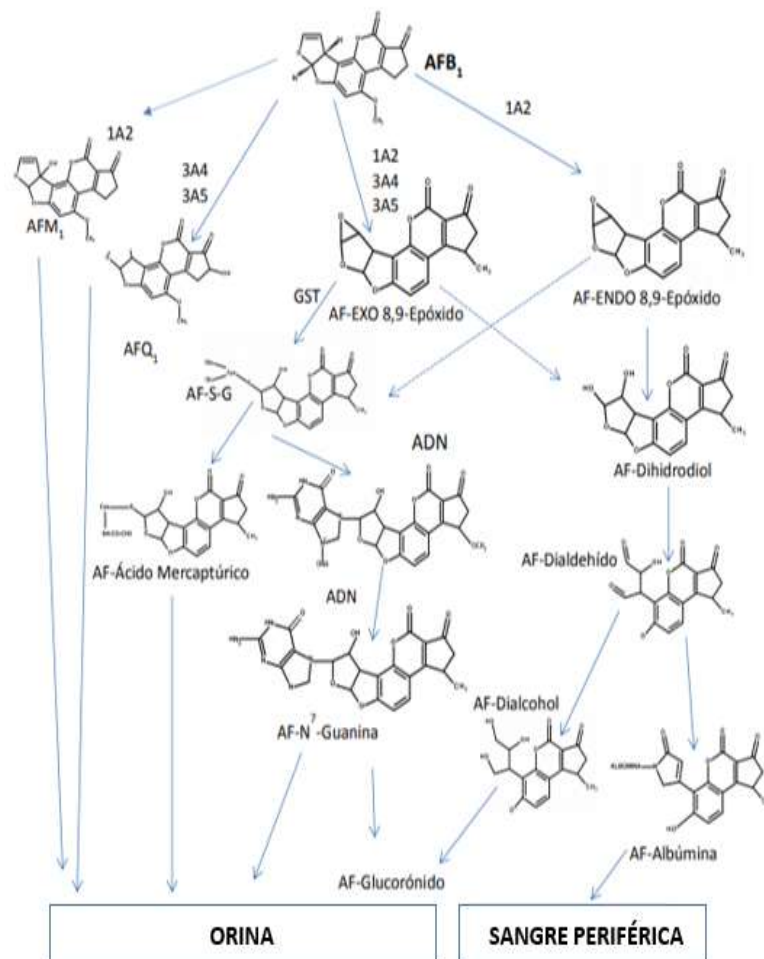


Figura 9. Metabolismo principal de la AFB₁ con sus metabolitos reactivos y biomarcadores más importantes. Citocromos: 1A2, CYP1A2, 3A4, CYP3A4, 3A5, CYP3A5; GST, glutatión S-transferasa; AFAR, aflatoxina aldehído reductasa; aflatoxina S-G, conjugado aflatoxina-glutatión. Adaptado de Wild & Turner (2002).

La información disponible sobre el metabolismo hepático humano confirma el hecho de que el hombre presenta una sensibilidad intermedia a la toxicidad aguda y que puede mostrar alguna a la toxicidad crónica de la AFB₁, incluyendo su efecto carcinogénico.

Las vías metabólicas de AFB₁ son: reducción a aflatoxicol (AFL), epoxidación a AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), hidroxilación a aflatoxina M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁), aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}) y la O-desmetilación a aflatoxina P₁ (AFP₁) (Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012; Dohnal & Kuca, 2014). No debe olvidarse que el precursor de la AFB₁, es esterigmatocistina, la cual también tiene potencial toxicológico, desafortunadamente esta no es de fácil detección.

4.1.5 Toxicidad

Entre las principales manifestaciones asociadas a la exposición de AF, están el daño hepático (cirrosis) y renal (Abdel - Wahhab *et al.*, 2000), mutagénesis (por la mutación en el codón 249 de hepatocélulas humanas), teratogénesis (ya que pueden cruzar la placenta humana y crean malformaciones fetales), inmunosupresión (ya que suprime la respuesta mediada por células, altera la funcionalidad del sistema del complemento y enmudece la acción de la IgA y la IgG, genotoxicidad (por la formación de aductos con el ADN y con la albúmina que induce a la mutación de genes y alteraciones cromosómicas como intercambio entre cromátidas hermanas y recombinación) (Eley, 1992; Pleadin, 2015).

Los primeros síntomas de hepatotoxicidad del hígado causados por AF comprenden fiebre, malestar y anorexia seguidos con dolor abdominal, vómitos y hepatitis; sin embargo, los casos de intoxicación aguda son excepcionales y raros (Etzal, 2002). La toxicidad crónica por AF comprende inmunosupresores y efectos cancerígenos, es así como la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica a las AF dentro del grupo 1 en su sistema de clasificación como agente altamente carcinogénico en humanos (Bartoli & Maggi, 1978; Kurtzman *et al.*, 1987; IARC, 2006; Pildain *et al.*, 2008).

Varios estudios han demostrado los efectos perjudiciales de la exposición de AF en el hígado (Sharmila *et al.*, 2009), epidídimo (Agnes & Akbarsha, 2001), testículo (Faisal *et al.*, 2008), riñón y corazón (Mohammed & Metwally, 2009; Gupta & Sharma, 2011). En el 2012, Ferlay y colaboradores manifestaron que el carcinoma hepatocelular (CHC) era la segunda causa

de muerte por cáncer en el mundo, responsable de cerca de 745.000 muertes en el mismo año (9,1 % del total), con una tasa de 9,5 casos por cada 100.000 habitantes (Ferlay *et al.*, 2012).

Dentro de los efectos agudos por AF se hallan: hepatitis aguda, los síndromes de Reye y de Kwashiorkor especialmente en niños de los trópicos (Tortajada *et al.*, 2001); el cuadro clínico incluye hígado graso y edema cerebral severo; a largo plazo se presentan efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos (Steyn & Stander, 1999; Tortajada *et al.*, 2001; Urrego & Díaz, 2006).

La exposición frecuente a AFB₁ acelera las respuestas inflamatorias a través de la regulación de la expresión génica de citocinas. Las AF también causan anomalías en la estructura y el funcionamiento de ADN mitocondrial y células cerebrales (Verma, 2004).

Las AF causan una menor eficacia de la inmunización en niños que aumentan el riesgo de infecciones (Hendrickse, 1997). La hepatocarcinogenicidad de las AF se debe principalmente a la peroxidación lipídica y el daño oxidativo del ADN (Verma, 2004).

4.1.6 Estudios de evaluación de exposición a las aflatoxinas en arroz

4.1.6.1 Contexto Internacional

Si bien, las micotoxinas en el arroz son menos comunes y sus concentraciones son más bajas en comparación con otros cereales como el trigo y el maíz, su incidencia es un problema serio considerando la alta ingesta diaria de este cereal en algunas regiones (Prietto *et al.*, 2015). En 2002, en Corea se realizó un estudio que concluyó que el arroz es el principal contribuyente a la ingesta alimentaria de AFB₁. Se estableció que el 6 % de muestras de arroz contaminadas con esta AF, con un nivel promedio de 4,8 ng/g y la ingesta diaria probable de AFB₁ se calculó entre 1,19 y 5,79 ng/kg/pc/día, la cual superó la ingesta diaria tolerable provisional (IDTP) estimada (IDTP=1 ng kg⁻¹ pc día⁻¹) (Park *et al.*, 2004).

Shephard (2008), publicó una evaluación de riesgo de AF en alimentos en África y encontró que en Gambia el arroz tenía en promedio una contaminación de 7,9 ng/g, un consumo de

103 g/día, una exposición de 14 ng/kg/pc/día y un riesgo poblacional de cáncer primario de hígado de 1,1 casos de cáncer/año por 100.000 habitantes.

Iqbal *et al.* (2012), publicaron un estudio sobre contaminación por AF y estimación de la ingesta de diferentes fracciones de arroz en Pakistán. Se analizaron 413 muestras de arroz, de las cuales 33 al 64 % estaban contaminadas con AF, con una concentración que variaba entre 7,1 y 16,4 µg/kg. De otro lado, se calculó que la ingesta estimada de AF por consumo de arroz varió de 19,1 a 26,6 ng/kg pc/día, mucho más alto que la IDTP. Este fue el primer informe en descubrir que el arroz es uno de los principales contribuyentes a la ingesta dietética de AF en Pakistán.

En Brasil, se realizó una evaluación preliminar de la exposición a AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, con el fin de determinar los posibles riesgos carcinogénicos para la población brasileña. Se analizaron 942 muestras de alimentos en el Distrito Federal entre 2002 y 2011, con 4,5 % de ellas positivas para al menos una AF. Se encontró que el mayor porcentaje de muestras positivas fue de arroz recolectado de varios estados brasileños (37,6 %). Se estimó una ingesta de AF por consumo de arroz, luego de aplicar un factor de procesamiento por cocción de 0,7 a la concentración media del país, de 6,6 a 6,8 ng/kg/pc/día, para el total de la población y de 16,3 a 27,6 ng/kg pc/día para los altos consumidores. Se estableció que la mayor ingesta de AF proviene principalmente del consumo de arroz, un alimento básico en el país (Andrade *et al.*, 2013).

Andrade & Caldas (2015), reportaron la incidencia mundial de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ y una evaluación de riesgo alimentario por consumo de cereales, entre ellos el arroz. Un total de 89 publicaciones fueron recuperadas de la literatura, reportando datos relacionados con 18.097 muestras, de las cuales el 37,6 % fueron positivas para al menos un tipo de AF. La media para todas las muestras analizadas fue de 13,6 µg/kg, y fue mayor para el arroz (24,6 µg/kg). En promedio, el consumo de arroz contribuyó al 41,6 % de la ingesta total de AF, seguido por el trigo (35,4 %), el maíz (21,2 %) y el sorgo (1,8 %).

Iqbal y colaboradores, analizaron AF y Ocratoxina A en 208 muestras de arroz y subproductos recolectados de las zonas centrales de Punjab, Pakistán. Los resultados demostraron que el 35 % de las muestras se encontraron contaminadas con AF, de las cuales

el 19 y 24 % fueron superiores al contenido máximo establecido por la Unión Europea para AFB₁ y AF, respectivamente. Los mayores niveles promedio de AFB₁ y AF se encontraron en muestras de arroz integral, 8,91 y 12,4 µg/kg, respectivamente. Se concluyó que la alta exposición a AFB₁ (22,2 ng/kg/ pc/día), plantea un riesgo significativo para la salud de la población local (Iqbal *et al.*, 2016).

En la provincia de Lao Cai de Vietnam, Huong y colaboradores estimaron la exposición alimentaria a AFB₁, Ocratoxina A y fumonisinas en adultos, mediante el enfoque de dieta total. Los resultados mostraron que el 33 % de las muestras de arroz y subproductos estaban contaminadas con AFB₁, que éstos eran la principal fuente de exposición a AFB₁ (22,2 ng/kg/ pc/día) y que el consumo de dichos productos se asoció con el mayor riesgo de cáncer de hígado (1,5 casos/100.000 personas/año y MOE de 8) en comparación con otros grupos alimenticios (Huong *et al.*, 2016).

Recientemente, Majeed y colaboradores estudiaron los niveles de múltiples micotoxinas, entre ellas AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂, en 180 muestras de arroz además de su exposición alimentaria en adultos y niños de Punjab, Pakistán. Se encontró una prevalencia de 56 % de AFB₁, un MOE entre 10-69 en adultos y 10-62 en niños y un riesgo de cáncer por exposición a AFB₁ de 0,070 y 0,071 casos/año/100.000 habitantes en adultos y niños, respectivamente (Majeed *et al.*, 2018).

4.1.6.2 Contexto Nacional

En Colombia, sólo se ha realizado una estimación preliminar y cualitativa de la exposición a la AFB₁ en maíz, arepas, alimentos a base de cereales, alimentos para lactantes y arroz, utilizando como fuente información publicada en revistas científicas indexadas, tesis, documentos de organismos nacionales y otras publicaciones de carácter científico e informes de laboratorios particulares. Según algunos de estos informes, los valores promedio estimados de exposición a la AFB₁ fueron de 0,0055 ng/kg/pc/día en adultos y de 0,0032 ng/kg/pc/día en niños. Estos valores no superaron la ingesta diaria máxima tolerable provisional (IDMTP) de 1 ng/kg/pc/día, pero, dado que se suele asumir en las evaluaciones de riesgo para el cáncer que no hay un umbral de exposición a un agente cancerígeno por debajo del cual no se presentan efectos adversos, es conveniente reducir la exposición al menor nivel posible (ERIA-INS, 2015).

Por su parte, un estudio realizado por Díaz (2001), la estimación de la exposición dietaria para aflatoxinas en arroz fue de 0,0055 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{pc}$ día; en atención al estudio de Morris (2011), se obtuvo que, la estimación de la exposición dietaria para aflatoxinas en arroz fue de 0,0032 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{pc}$ día (estimaciones realizadas teniendo en cuenta el peor escenario).

4.1.7 Métodos de análisis de aflatoxinas

Existen diferentes métodos de análisis recomendados para la determinación de micotoxinas en alimentos, como los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) (Horwitz, 2002), donde se pueden encontrar más de 50 métodos validados para la determinación de diversas micotoxinas en alimentos, o los métodos normalizados propuestos por la Organización Internacional para la Normalización (ISO).

La contaminación por micotoxinas en los alimentos puede ocurrir en concentraciones tan bajas que requieren una disponibilidad de métodos sensibles y confiables para su determinación (Chauhan *et al.*, 2015). De otro lado, los análisis requieren un alto grado de exactitud, por esta razón se usan métodos recomendados a través de procedimientos que garanticen la calidad de los resultados, incluido el uso de materiales de referencia certificados.

Los métodos analíticos para micotoxinas incluyen técnicas basadas en inmunoquímicos que se aplican principalmente para controles rutinarios y rápidos, detección *in situ*, y técnicas basadas en cromatografía que proporcionan una determinación sensible, precisa y selectiva de micotoxinas conocidas (Anfossi *et al.*, 2016).

Las AF son generalmente detectadas e identificadas de acuerdo con su absorción y espectros de emisión, con una absorbancia máxima que ocurre a 360 nm. Las toxinas B exhiben fluorescencia azul a 425 nm, mientras que las toxinas G muestran fluorescencia verde a 540 nm bajo irradiación UV. La cromatografía en capa fina (TLC) se encuentra entre las más antiguas técnicas utilizadas para la detección de AF (Fallah *et al.*, 2011).

Los métodos analíticos más empleados son los que emplean cromatografía de líquidos (HPLC) con detección UV o fluorescencia, dado que las AF presentan fluorescencia nativa y este tipo de detección presenta ciertas ventajas, como mayor sensibilidad y selectividad. En el caso de las AF, su fluorescencia se muestra atenuada en presencia de ciertos disolventes, siendo necesaria su derivatización precolumna (empleando ácido trifluoroacético) o postcolumna (Stroka *et al.*, 2000; Afshar *et al.*, 2013).

El enfoque previo a la columna utiliza ácido trifluoroacético con la formación de los hemiacetales correspondientes, que son derivados relativamente inestables. Por otro lado, la derivatización post columna se basa en la reacción del doble enlace 8,9 de las AF con halógenos como el bromo (directamente añadido o producido electroquímicamente) o yodo. La derivatización fotoquímica post columna permite la detección por fluorescencia de las cuatro AF comunes B₁, B₂, G₁ y G₂. La evidencia cromatográfica indica que la fotólisis causa la hidratación de los componentes AFB₁ y AFG₁ no fluorescentes a los componentes AFB_{2a} y AFG_{2a}, respectivamente (Joshua, 1993).

Los métodos de inmunoensayo, proporcionan seguridad durante las aplicaciones de diagnóstico de rutina, debido a la alta selectividad y alta afinidad de los anticuerpos específicos para el antígeno (Babu & Muriana, 2014). Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), aunque son sólo semicuantitativos y se han utilizado como métodos de “*screening*”, siendo importantes en el desarrollo de ensayos rápidos, repetibles y sensibles. Estos ensayos son adecuados para el uso en el campo y la selección de productos alimenticios en las fábricas de piensos (Bryden, 2012).

Los biosensores para la detección de AF, podrían ser útiles como una "prueba de campo" cualitativo/semicuantitativo para la identificación de muestras "positivas". Los ensayos con biosensores son rápidos, fáciles de realizar y de bajo costo, y podrían ser ventajosos en comparación con ELISA o Cromatografía de Gases Masas (GC/MS) para el análisis de alimentos; pero son necesarias algunas mejoras en los parámetros analíticos tales como: precisión, exactitud y límites de detección (especialmente en aplicaciones de biosensores para las AF) (Mosiello & Lamberti, 2011).

4.1.8 Legislación para el contenido de aflatoxinas presentes en el arroz

Debido al impacto en salud pública, la contaminación de los alimentos con AF es un tema de importancia mundial, por lo que varios países han establecido normas que establecen los niveles máximos de AF en arroz y otros alimentos susceptibles de ser contaminados con estas.

4.1.8.1 Legislación Internacional

Los rangos de concentraciones aceptadas de aflatoxinas en alimentos varían de acuerdo con los países y su forma de legislar, sin embargo, se pueden encontrar tendencias relacionadas a los bloques económicos mundiales. Entre estos, se encuentran la Unión Europea, la Asociación de Naciones del Sudeste de Asia y el Mercado Común del Sur (MERCOSUR). Dichos grupos han armonizado sus normativas para facilitar el comercio entre naciones.

Para las aflatoxinas totales, los límites varían entre 0-35 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el límite que aparece con mayor frecuencia es de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en países europeos y asiáticos, seguido de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aplicado por países en América Latina y en varios países del África. Por su parte, Estados Unidos, ha fijado un límite para las AF, y se rige por el valor de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Unión Europea: los límites máximos vigentes de AF a nivel europeo se recogen en el Reglamento 165/2010, de 09 de marzo de 2010, establece un contenido máximo de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AFB_1 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para $\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$ para maíz y arroz que vayan a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo o de su utilización.

FDA (Agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos): establece como límite máximo permisible 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para $\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$ para alimentos.

4.1.8.2 Legislación Colombiana

El Ministerio de Salud y Protección Social expidió la Resolución No. 4506 de 2013, de obligatorio cumplimiento, por la cual se establecen los niveles máximos de AF en los alimentos destinados al consumo humano entre 4 y 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, dependiendo del tipo de alimento y su procesamiento (MSPS, 2013). Ésta fue modificada parcialmente por la Resolución del Ministerio de Salud y Protección Social No. 2671 del 2014, donde se

estableció el límite máximo de la suma de AF (B₁, B₂, G₁ y G₂) de 10 µg/kg en arroz que vaya a someterse a un proceso de selección u otro tratamiento físico antes del consumo humano directo, o de su utilización como ingrediente de productos alimenticios (MSPS, 2014).

En la Tabla 10 se presenta el comparativo de las regulaciones sobre el límite máximo de aflatoxinas permitido en arroz.

Tabla 10. Comparativo de las regulaciones sobre el límite máximo de aflatoxinas permitido en arroz. Tomado de Reglamento 165/2010 U.E, FDA, MSPS (2014).

	UNIÓN EUROPEA	FDA	COLOMBIA
AFLATOXINAS		LÍMITE MÁXIMO	
AFB ₁	5 µg/kg	-	-
AF	10 µg/kg	20 µg/kg	10 µg/kg

4.1.9 Estudios relacionados con la presencia de aflatoxinas en arroz

Debido al impacto en salud que genera la AFB₁ al ser carcinogénica y la contaminación por AF en los alimentos de consumo masivo, se han generado numerosos estudios en diferentes países, especialmente en aquellos en donde la producción y consumo de arroz es elevado. Por tal razón, es relevante tener conocimiento de estos y de igual manera de la incidencia de dicha micotoxina.

4.1.9.1 Contexto Internacional

Actualmente, en el mundo la principal zona productora de arroz se concentra en el continente asiático; por tanto, los principales trabajos sobre la presencia de micotoxinas en el arroz se han hecho en estos países, tal es el caso de China, India, Paquistán y Corea (Toteja *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2009; Selvaraj *et al.*, 2015). En la mayor parte de los estudios realizados en estos países se han encontrado incidencia de AF. En la Tabla 11 se relacionan estudios a nivel mundial realizados en países que presentan contaminación por AF en el arroz.

Tabla 11. Estudios de contaminación del arroz con aflatoxinas realizados en el ámbito internacional.

PAÍS	TÍTULO	TIPO DE AF	N	MUESTRAS +	INCIDENCIA (%)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO (µg/kg)	RANGO DE CONCENTRACIÓN (µg/kg)	MÉTODO DE TERMINACIÓN	REFERENCIA
INDIA	Aflatoxin-producing fungi in stored <i>paddy</i>	AFB ₁	170	0	0	---	---	---	Sundaram <i>et al.</i> , 1988
JAPÓN	Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo	AFB ₁	74	2	3	---	0,3 – 3,6	---	Tabata <i>et al.</i> , 1993
EMIRATOS ARABES UNIDOS	Aflatoxin contamination of rice in the United Arab Emirates	AFB ₁	500	241	48,2	---	1,2 – 16,5	HPLC	Osman <i>et al.</i> , 1999
COREA DEL SUR	Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans	AFB ₁	88	5	5,7	4,8	1,8 – 7,3	ELISA HPLC	Park <i>et al.</i> , 2005
QATAR	Mycotoxins in food products available in Qatar	AF	9	3	33,3	---	0,14 – 0,24	HPLC	Abdulkadar <i>et al.</i> , 2004
FILIPINAS	<i>Aspergillus flavi</i> contamination in rice and its byproducts from the Philippines	AFB ₁	78	74	94,8	0,37 – 2,7	< 0,025 – 11,0	HPLC	Sales & Yoshizawa, 2005
VIETNAM	Occurrence of aflatoxin B ₁ , citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam	AFB ₁	100	51	51	3,31	---	HPLC	Nguyen <i>et al.</i> , 2007
TÚNEZ	Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods	AF	16	---	12,5	4,7	---	ELISA	Ghali <i>et al.</i> , 2008
JAPÓN	Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan	AF	83	0	0	---	---	HPLC LC/MS HPTLC	Kumagai <i>et al.</i> , 2008
INDIA	Detection of <i>Aspergillus</i> spp. and aflatoxin B ₁ in rice in India	AFB ₁	1200	---	67,8	---	0,1 – 308,0	ELISA	Reddy <i>et al.</i> , 2009
SUECIA	Moulds and mycotoxins in rice from the Swedish	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂	99	71 20	71 (Basmati) 20 (Jasmine)	---	---	HPLC	Fredlund <i>et al.</i> , 2009
AUSTRIA	Aflatoxins in rice—a limited survey of products marketed in Austria	AFB ₁ AFB ₂	81	24	29,6	---	0,45 – 9,86	HPLC	Reiter <i>et al.</i> , 2010
IRAN	Aflatoxin Detoxification in Rice using Citric Acid	AFB ₁ AFB ₂	203 (AFB ₁) 8 (AFB ₁ , AFB ₂)	211	76.72% (AFB ₁) 2,91% (AFB ₁ , AFB ₂)	2,3 (AFB ₁) 1,38 (AFB ₂)	---	HPLC	Safara <i>et al.</i> , 2010

TURQUÍA ORIENTAL	Occurrence of AF, AFB ₁ , OTA in Rice Commercialized in Eastern Turkey	AF AFB ₁	100	65 35	65 35	---	---	ELISA	Buyukunal <i>et al.</i> , 2010
TURQUÍA	Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice	AF AFB ₁	100	32 14	58	---	0,05 – 21,4	ELISA	Aydin <i>et al.</i> , 2011
NIGERIA	Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria	AF	21	21	100	---	28-372	TLC HPLC	Makun <i>et al.</i> , 2011
CANADÁ	Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins	AFB ₁ AFB ₂	200	56 (+AFB ₁)	49 11,5 (+AFB ₂)	0,18	1.44–7.14 (AFB ₁ primer año) 1.45–3.48 (AFB ₂ segundo año)	HPLC	Bansal <i>et al.</i> , 2011
PAKISTÁN	Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan	AF	413	5	25	4,6	1,5 – 10,8	HPLC	Lutfullah & Hussain, 2012
MALASIA	A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia	AF	50	46	92	---	0.61-77.33	ELISA	Samsudin & Abdullah, 2013
MÉXICO Y ESPAÑA	Aflatoxin (B ₁ , B ₂ , G ₁ and G ₂) contamination in rice of Mexico and Spain, from local sources or imported.	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂	67	---	---	37,3	1,6 – 1383	HPLC	Suárez <i>et al.</i> , 2013
PUNJAB, PAKISTÁN	Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan	AF AFB ₁	68	38	56	19,54 – 8,23	---	HPLC	Majeed <i>et al.</i> , 2013
OESTE DE ESCOCIA	Occurrence of toxigenic Aspergillus spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland	AF	12	1	8,3	14,7	14,7	HPLC	Ruadrew <i>et al.</i> , 2013
COREA DEL SUR	Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea	AF	80	0	0	---	---	HPLC	Ok <i>et al.</i> , 2014
PUNJAB, PAKISTÁN	Variation in vitamin E level and aflatoxins contamination in different rice varieties	AF AFB ₁	380	143	37,6	10,41 – 6,18	LOD – 96,6	HPLC	Iqbal <i>et al.</i> , 2014
CHINA	Occurrence of aflatoxins and	AF	370	235	63,5	0,63	---	HPLC	Lai <i>et al.</i> , 2014

	ochratoxin A in rice samples from six provinces in China									
VIETNAM	Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups	AF	111	27	24,3	---	2,06 – 77,8	ELISA	Huong <i>et al.</i> , 2016	
PUNJAB, PAKISTÁN	The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake	AF	208	73	35	AFB ₁ (8,91) AF(12,4)	---	HPLC	Iqbal <i>et al.</i> , 2016	
ARABIA SAUDITA	Limited survey on aflatoxin contamination in rice	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂	---	88	---	≤0,123 (AFB ₁) ≤2,58 (AF)	0,014 – 0,123 0,052–2,58	HPLC	Al-Zoreky & Saleh, 2017	
CHINA	Mycotoxin Contamination of Rice in China	AF	1628	---	59,1	1,2	0 – 31	---	Sun <i>et al.</i> , 2017	
COREA DEL SUR	Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS	AFB ₁ AFB ₂	5 tipos de cereales (arroz) de 507 granos de cereales	---	AFB ₁ (1) AFB ₂ (0)	AFB ₁ (1.1) AFB ₂ (0)	AFB ₁ (1.1) ---	HPLC LC/MS/MS	Kim <i>et al.</i> , 2017	
PAKISTÁN	Multiple Mycotoxins in Rice: Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan	AFB ₁ AFB ₂	180	AFB ₁ (101) AFB ₂ (86,4)	AFB ₁ (56%) AFB ₂ (48%)	AFB ₁ (5,84) AFB ₂ (1,91)	AFB ₁ (1.5–40) AFB ₂ (1.5–9.15)	LC–MS/MS	Majeed <i>et al.</i> , 2018	
LATINOAMÉRICA										
BRASIL	Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂						TLC	Nunes <i>et al.</i> , 2003	
BRASIL	Incidencia de fungos toxigênicos e aflatoxinas em arroz	AF	36	1	2	---	N.D. - 1,2	HPLC	Aparecida <i>et al.</i> , 2010	
BRASIL	Co-occurrence of aflatoxins B ₁ , B ₂ , G ₁ and G ₂ , ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil.	AF	27	---	97	---	N.D. – 31,72	HPLC	Almeida <i>et al.</i> , 2012	

TLC, Cromatografía de capa fina; HPLC, Cromatografía líquida de alta eficiencia; LC/MS/MS, Cromatografía líquida/Espectrofotometría de masas; ELISA, Ensayo de inmunoabsorción enzimática.

4.1.9.2 Contexto Nacional

La información respecto a la incidencia y niveles de contaminación de AF en América Latina, es muy limitada. Por supuesto Colombia, no es ajena a esta situación (Tabla 12); el desarrollo investigativo hasta ahora evidenciado en esta área es insuficiente; el problema de la contaminación con micotoxinas, se ha tocado de manera tangencial, concentrándose en las AF en forma exclusiva.

Tabla 12. Estudios de contaminación del arroz con Aflatoxinas realizados en el ámbito nacional

TÍTULO	TIPO DE AF	N	MUESTRAS +	INCIDENCIA (%)	CONCENTRACION PROMEDIO (µg/kg)	RANGO DE CONCENTRACION (µg/kg)	MÉTODO DE DETERMINACION	REFERENCIA
Analysis of Aflatoxins in Poultry and Pig Feeds and Feedstuffs Used in Colombia	AFB ₁	22	8	36,3	--	1,0 - 52,8	HPLC	Céspedes y Díaz, 1997
Occurrence of aflatoxins in selected Colombian foods	AFB ₁	40	4	10	7,1	1,0 – 13,6	HPLC	Díaz <i>et al.</i> , 2001
Determinación de aflatoxinas en muestras de maíz (<i>Zea mays</i>) y arroz (<i>Oryza sativa</i>) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana mediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂	46	0	0	---	---	HPLC	Morris, 2011
Mycotoxins and cyanogenic glycosides in staple foods of three indigenous people of the Colombian Amazon	AFB ₁ AFB ₂ AFG ₁ AFG ₂	24	2	8,33	9,3	1.3 - 17.4	LC-MS/MS	Díaz, Krska, & Sulyok, 2015

HPLC, Cromatografía líquida de alta eficiencia, LC/MS/MS, Cromatografía líquida/Espectrofotometría de masas

4.2 Tricotecenos

Son un grupo complejo de ésteres de alcoholes sesquiterpénicos no volátiles de bajo peso molecular (200-500 Da) químicamente relacionados, que comparten un núcleo tricíclico llamado tricodieno caracterizado por un doble enlace en la posición 9, 10 y un anillo 12,13-epóxido, responsable de su toxicidad (Patriarca & Fernández, 2017).

De acuerdo a su estructura química, los tricotecenos se dividen en cuatro subgrupos (A, B, C y D). Los tricotecenos de tipo B contienen un grupo carbonilo en el carbono 8, a este grupo pertenecen las micotoxinas desoxinivalenol, 3-acetildeoxinivalenol, 15-acetildeoxinivalenol, nivalenol y fusarenon-X (Escrivá *et al.*, 2015), los cuales son producidos por *F. graminearum* y *F. culmorum* (Nguyen *et al.*, 2017). La concentración de

los tricotecenos B que se encuentra en los cereales contaminados es generalmente más alta que la de los tricotecenos A (Patriarca & Fernández, 2017).

La toxicidad de los tricotecenos se atribuye a su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas y la actividad de la enzima peptidil transferasa ubicada en la subunidad ribosomal 60S (Foroud & Eudes, 2009).

4.2.1 Biosíntesis de Tricotecenos

Las enzimas involucradas en la biosíntesis de tricotecenos y las proteínas reguladoras de este proceso, son codificadas por 15 genes, genes *Tri*, que residen en tres locus diferentes: un grupo de 12 genes denominado “grupo *Tri*”, un grupo de dos genes *Tri1 – Tri16* localizado en otro locus y un gen *Tri101* ubicado en un locus diferente (Merhej *et al.*, 2012). La variación en el quimiotipo de tricoteceno producido, está determinada por la variación de la expresión y funcionalidad de estos genes *Tri*.

Todos los tricotecenos son derivados del farnesil pirofosfato el cual es sometido a procesos de ciclación, isomerización, oxidación y acetilación controlados por enzimas codificadas por los genes *Tri* (Alexander *et al.*, 2011). El primer paso de la biosíntesis de tricotecenos es la ciclación del farnesil pirofosfato para obtener una estructura denominada tricodieno, esta reacción es catalizada por la enzima tricodieno sintasa la cual es codificada por el gen *Tri5*. Luego *Tri4*, que codifica un citocromo P₄₅₀ monooxigenasa multifuncional, cataliza los cuatro pasos siguientes: hidroxilación en C-2, seguido de epoxidación en 12,13, seguido de hidroxilación en C-11 e hidroxilación en C-3 (Tokai *et al.*, 2007). El producto final denominado isotricotriol, es sometido a dos pasos de isomerización no enzimática, incluyendo una ciclación que produce un enlace C-O entre el oxígeno de C-2 y el C-11, obteniéndose la molécula denominada isotricodermol. Esta molécula es acetilada en C-3 por acción de una enzima 3-O-acetiltransferasa codificada por *Tri101*, e hidroxilada en C-15 por acción de una enzima C-15 hidroxilasa codificada por *Tri11*. Posteriormente, la molécula es acetilada en C-15 por acción de una enzima 15-O-acetiltransferasa codificada por *Tri3*, generando una molécula denominada calonectrin. Todos estos pasos son comunes en la síntesis de tricotecenos de tipo A y B (Figura 10) (Foroud & Eudes, 2009; Merhej *et al.*, 2011).

Desde este paso en adelante, se producen diferencias producto de la actividad de los genes *Tri13*, *Tri7*, *Tri1* y *Tri8*, principalmente. La producción de tricotecenos de tipo A o B está determinada por variaciones en la actividad de las enzimas citocromo P₄₅₀ codificadas por *Tri1*. En *Fusarium graminearum* las enzimas codificadas por *Tri1* catalizan la hidroxilación de C-7 y C-8, generando 7-hidroxi, 8-ceto-tricotecenos como DON y NIV (tricotecenos de tipo B) (McCormick *et al.*, 2004).

En *Fusarium graminearum*, el gen *Tri13* es fundamental para determinar la producción de NIV o DON. Este gen codifica una enzima C-4 hidroxilasa, responsable de la oxigenación en C-4 durante la producción de NIV. Mientras que en un *Fusarium graminearum* productor de DON este gen presenta varias mutaciones que provocan su inactividad, por tanto, en DON (y sus acetilados) el C-4 no se encuentra hidroxilado. El gen *Tri7* también se encuentra inactivo en *F. graminearum* productor de DON, pero se encuentra activo en *F. graminearum* productor de NIV, donde codifica una enzima encargada de la acetilación del grupo hidroxilo en el C-4 de NIV para generar el derivado acetilado 4-ANIV (Fusarenon-X).

La actividad de *Tri8* es fundamental para determinar la producción de 3-ADON o 15-ADON. En los *F. graminearum* productores de 3-ADON, el gen *Tri8* codifica una enzima que cataliza la deacetilación del carbono 15 del intermediario 3,15-diacetildeoxinivalenol, generando como producto 3-ADON. Mientras que en un *F. graminearum* productor de 15-ADON el gen *Tri8* codifica una enzima que cataliza la deacetilación del carbono 3 de 3,15-diacetildeoxinivalenol, generando 15-ADON (Alexander *et al.*, 2011).

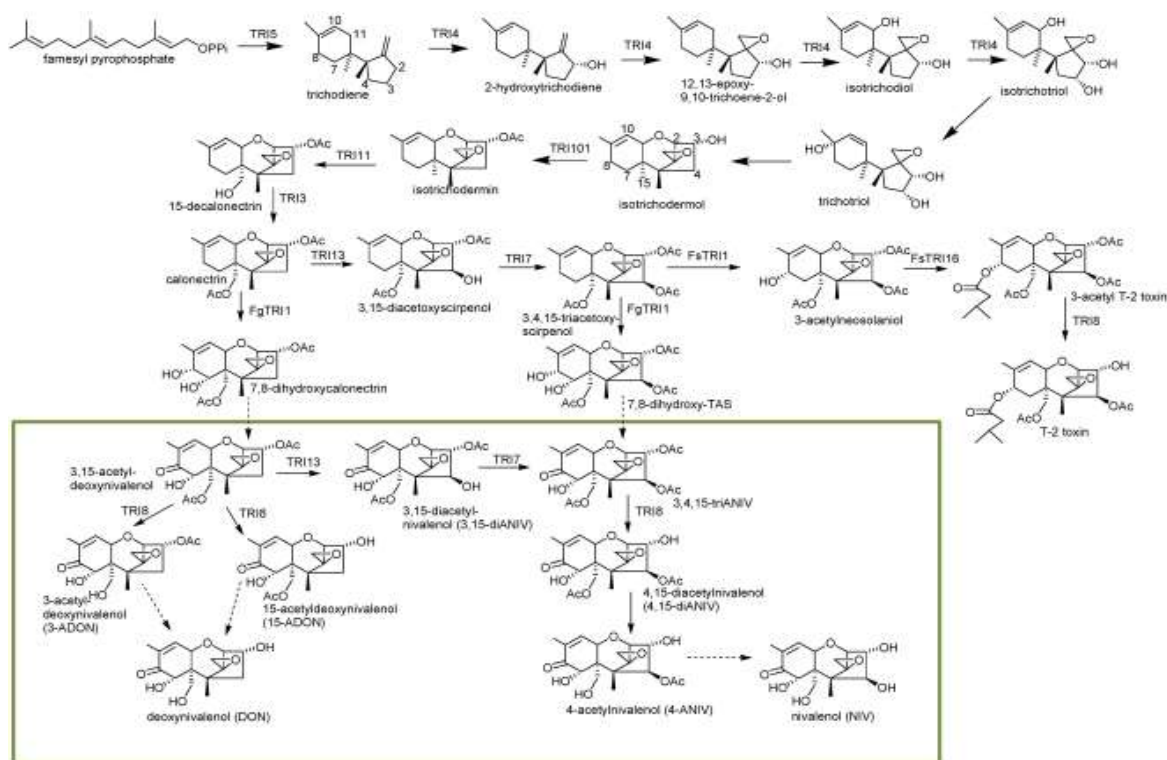


Figura 10. Ruta biosintética propuesta para los tricotecenos producidos por *Fusarium*. Los genes codificadores de enzimas se indican al lado de cada línea que señala una etapa de la síntesis. Las líneas segmentadas indican las etapas en las cuales aún no se ha asignado un gen. El recuadro verde identifica los tricotecenos de tipo B.

Tomado de McCormick (2011).

4.2.2 Desoxinivalenol (DON)

Micotoxina perteneciente a los tricotecenos del grupo B, es un compuesto orgánico polar sesquiterpeno y posee un esqueleto tetracíclico 12,13-epoxitricotec-9-eno con 3 grupos hidroxilo, los cuales están asociados a su toxicidad (Figura 11) (Sobrova *et al.*, 2010). Tiene una función carbonilo en la posición C8, tres grupos hidroxilos (OH-) a los que se asocian su toxicidad y, un grupo ceto insaturado en posición α , β . Químicamente se denomina 12 – 13 epoxitricoteceno, formado por un esqueleto de sesquiterpeno cíclico unido a un grupo epoxi en la posición 12 – 13, fórmula molecular: $C_{15}H_{20}O_6$, peso molecular: 296,3 g.mol⁻¹, punto de fusión: 151 – 153 °C y longitud de onda UV de 254 nm debido a la función ceto insaturada en posición α , β (Josephs *et al.*, 2001; Soriano, 2007).

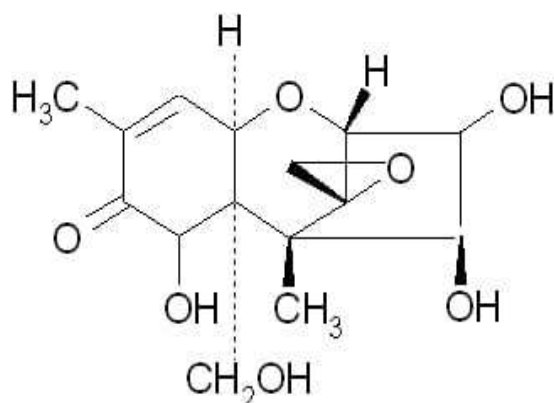


Figura 11. Estructura química de Desoxinivalenol.
Tomado de Soriano (2007).

Es relativamente soluble en agua y altamente soluble en solventes polares acuosos como: metanol, etanol, cloroformo, acetonitrilo y etil acetato (Sobrova *et al.*, 2010). Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes del DON es su resistencia a temperaturas elevadas entre 170 °C a 350 °C, no se ha observado reducción en su nivel luego de 30 minutos a 170 °C. Esto supone un gran riesgo para la industria alimentaria, impidiendo el uso de materia prima contaminada (Hughes *et al.*, 1999; Kabak, 2009).

DON se presenta principalmente en granos como trigo, cebada, avena, centeno, maíz y con menor frecuencia en arroz y sorgo. Además, se encuentra en alimentos a base de cereales listos para el consumo (Schothorst *et al.*, 2005; Sirot *et al.*, 2013).

4.2.2.1 Toxicocinética

La absorción, distribución y eliminación del DON es rápida si es vía oral o parenteral. El DON da origen a un derivado llamado de-epoxi-deoxinivalenol (Figura 12) por una vía metabólica que implica la pérdida de la función epoxi-O (de-epoxidación). Dicho metabolito es predominante en heces, orina y plasma de animales y seres humanos. También se ha detectado DON y/o sus metabolitos en niveles bajos en leche, carne y huevos de animales (Pozas & Abad, 2010).

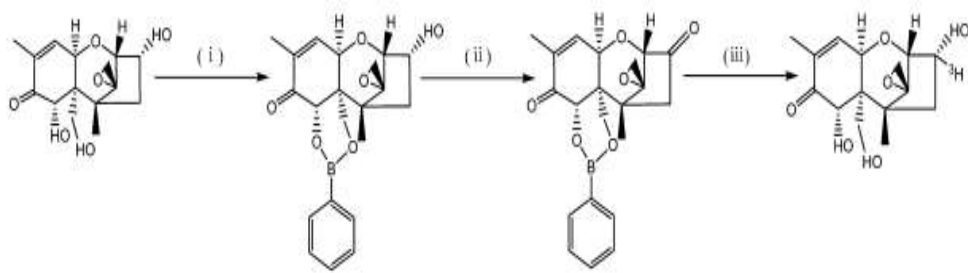


Figura 12. Síntesis de DON.
Tomado de Wan *et al.* (2013).

4.2.2.2 Toxicología

El efecto tóxico primario de DON es la inhibición de la síntesis de proteína (Shephard, 2011). El DON no se acumula en el organismo y produce solamente toxicidad aguda. Los valores de DL50 oral son de aproximadamente 78 a 46 mg/kg de peso corporal. La ingesta en cantidades mayores a las permitidas puede causar problemas gastrointestinales, diarreas, vómitos, inmunodepresión, degeneración de la médula ósea, vasos linfáticos e intestino (Cabello, 2007).

La ingestión de alimentos contaminados por animales, puede conducir a síntomas gastrointestinales agudos como: vómitos, rechazo de alimento, diarrea sanguinolenta es usual encontrar lesiones necróticas y hemorrágicas en nariz, boca, tejido subcutáneo (Marin *et al.*, 2013). La ingestión de altas dosis puede provocar lesiones en tejidos linfoides, hemorragias intestinales severas, así como destrucción celular en las membranas mucosas epiteliales del intestino (Creppy, 2002).

Los efectos más comunes de la exposición dietética a largo plazo de los animales al DON son la supresión del aumento de peso, anorexia y eficacia nutricional alterada. Los efectos agudos de DON en humanos son similares a los de los animales.

El DON, actúa sobre el sistema nervioso central causando un síndrome emético y rechazo del alimento. Una sola dosis de 250 µg/kg mantiene su acción hasta ocho días después de ingerida (Miller *et al.*, 2001).

4.2.2.3 Mecanismo de toxicidad

Las sustancias más potentes que inhiben la síntesis de las proteínas son los tricotecenos. Los tejidos que más afectan son las gónadas, intestinos, médula ósea y tejido linfoide. Son tóxicos debido a la presencia del grupo epoxi pero no son precursores de cáncer. No hay evidencia experimental o epidemiológica de propiedades mutagénicas y/o carcinogénicas de DON. Esta micotoxina fue catalogada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos (Grupo 3) (IARC, 1993; IARC, 2015).

El DON inhibe la síntesis del ADN y del ARN. La micotoxina tiene un efecto hemolítico sobre los eritrocitos. Puede causar vómitos en altas dosis, mientras que en bajas concentraciones reduce el crecimiento y el consumo del alimento (anorexia). Esto se debe a que afectan la actividad seroonérgica en el sistema nervioso central.

Se ha demostrado que el grupo B de tricotecenos produce daño físico en las membranas celulares provocando la lisis de los glóbulos rojos por efecto de exceso de micotoxina circulante, ya que el metabolismo de los tricotecenos se produce dentro de estas células. La cantidad de toxina para producir lisis depende de la especie animal, siendo los cerdos los más susceptibles. Los tricotecenos son reconocidos por inducir desórdenes hematológicos tales como neutropenia, trombopenia y anemia aplásica en humanos y animales. El DON sólo produce tales efectos en dosis muy elevadas.

El DON altera el funcionamiento del sistema inmunológico de los animales y de los seres humanos. Se ha demostrado que aumenta la susceptibilidad a patógenos facultativos como *Listeria* spp. Se comprobó en estudios experimentales con animales de laboratorio el aumento de IgA, tanto sérica como la de las células mesangiales, que provocan hematuria. La enfermedad de Berger, que implica una desregulación de IgA en seres humanos, sólo se ha logrado reproducir en animales experimentales a través de la administración de DON. Además, el DON tiene la capacidad de alterar transitoriamente la expresión de citoquinas, las que son importantes para la regulación normal de muchas funciones inmunológicas.

La presencia de DON incrementa significativamente la concentración de serotonina (102 - 180 % más que el control) pero no produce cambios significativos en la concentración de

noradrenalina y dopamina. De esta manera, el DON influye en el metabolismo de las aminas biogénicas en el cerebro y podrían existir diferencias significativas intra especies.

4.2.2.4 Detoxificación

El DON es un compuesto estable durante el almacenamiento, la molienda y también durante el procesamiento y cocción de los alimentos. La mejor estrategia para controlar la contaminación por esta micotoxina es un enfoque multidisciplinario integrado. El conocimiento de los factores agroambientales que fomentan la contaminación por *F. graminearum* o *F. culmorum* y en consecuencia la producción de toxinas, es el primer paso para un plan eficaz encaminado a reducir al mínimo la contaminación por DON en los alimentos.

La presencia de las micotoxinas no se puede evitar completamente. Pero un manejo integrado de estrategias y medidas preventivas como genotipos de buena respuesta, diversificación de las fechas de siembra, control químico con fungicidas basados en la predicción, entre otras, podrían mejorar la situación ante la presencia del hongo y la consecuente producción de micotoxinas.

Aunque no se ha desarrollado hasta ahora un solo método efectivo para la descontaminación, numerosos métodos han sido probados y varios demuestran una aplicación comercial potencial. Entre ellos se encuentran métodos físicos, químicos y biológicos (Tabla 13).

Tabla 13. Métodos y porcentaje de reducción de DON en alimentos. Tomado de Soriano (2007)

MÉTODOS	REDUCCIÓN (%)
Métodos físicos	
Limpieza + flujo de aire (trigo)	16
Limpieza + flujo de aire + lavado (trigo)	40
Equipo rotatorio de limpieza (maíz)	33
Descascarado (maíz)	40-100
Lavado (cebada, maíz)	72-74
Molienda (trigo)	24-31
Separación por densidad	<70-90
Separación por gravedad específica	68-85
Tratamiento térmico	<15
Métodos químicos	
Peróxidos de hidrógeno 5-6%	<8
Ácido ascórbico al 2%	47

Hidróxido de amonio 5%	35
Ácido clorhídrico 0,1M	35
Bisulfito de sodio (10%)	>98
Sustancias gaseosas	30-100
Métodos biológicos	
Dilución de granos contaminados	Variable
Inóculo microbiano del tracto digestivo de aves	54 - 56

4.2.2.5 Métodos de detección de Desoxinivalenol

Para la determinación de DON en cereales se disponen de diversos métodos analíticos: (Figura 13) a) los *Cromatográficos*, que están integrados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Oueslati *et al.*, 2012), Cromatografía Gaseosa (CG) (AOAC, 2010a), HPLC y CG acopladas a MS y la Cromatografía de Placa Delgada (PC) (AOAC, 2010b); b) *ensayos inmunoenzimáticos y tecnologías novedosas rápidas* que incluyen la inmunocromatografía, la polarización fluorescente y los biosensores (Shephard, 2008). Dentro de los métodos oficiales descritos por la AOAC se hallan la PC y la CG; sin embargo, existen numerosos reportes de la validación de los métodos previamente mencionados, donde el más utilizado es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado o no a MS.

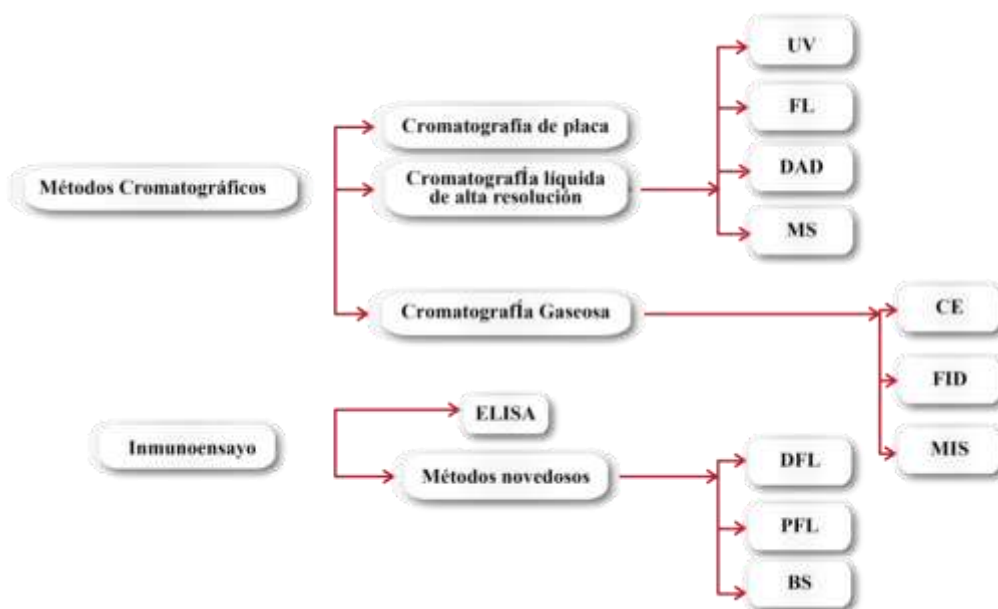


Figura 13. Metodologías analíticas empleadas para determinar DON en cereales.

Tomado de Sosa *et al.* (2017)

UV: Ultravioleta; FL: Fluorescente; DAD: Arreglo de diodos; MS: Masa; CE: Captura electrónica; FID: Ionización de llama; DFL: Dispositivo de flujo lateral; PFL: Polarización fluorescente; BS: Biosensores.

Los procedimientos analíticos difieren en cuanto a la extracción, la purificación, la detección y la cuantificación (Pascale, 2009). Para el análisis del DON es necesario realizar las tres etapas antes mencionadas, las cuales varían en dependencia del método aplicado y el tipo de alimento procesado.

4.2.2.6 Legislación para el contenido de Desoxinivalenol en cereales

Algunos países han fijado límites reglamentarios o guía para el desoxinivalenol en los alimentos. Los límites máximos permitidos de concentraciones de DON en los cereales y productos de cereales están recogidos en el Reglamento (CE) N° 1881/2006 y en el Reglamento (UE) N° 1126/2007, de la Comisión de 28 de septiembre de 2007, que modifica el primero (CE, 2006; CE, 2007). Si bien esta normativa establece claramente que, para los efectos de los contenidos máximos de desoxinivalenol, el arroz no se incluye en los «cereales» y tampoco los productos a base de arroz se incluyen en los «productos a base de cereales».

Colombia, a través de la Resolución del Ministerio de Salud y la Protección Social No. 4506 de 2013, propone los niveles máximos de DON en cereales no elaborados distintos al maíz, determinando que el arroz no se incluye en los «cereales» y los productos a base de arroz no se incluyen en los «productos a base de arroz» (MSPS, 2013).

4.2.2.7 Estudios relacionados con la presencia de Desoxinivalenol en arroz

4.2.2.7.1 Contexto Internacional

Se presentan estudios desarrollados en el ámbito internacional (Tabla 14) sobre contaminación de arroz con DON.

Tabla 14. Estudios de contaminación de arroz con Desoxinivalenol realizados en el ámbito internacional

PAÍS	TÍTULO	N	MUESTRAS +	INCIDENCIA (%)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO (µg/kg)	RANGO DE CONCENTRACIÓN (µg/kg)	MÉTODO DE DETERMINACIÓN	REFERENCIA
BRASIL	Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos	Arroz integral (n=16) Arroz parbolizado (n = 16) Arroz blanco pulido (n=24)	---	---	---	Arroz integral (-) Arroz parbolizado (266 – 300) Arroz blanco pulido (1117)	TLC y GC	(Nunes <i>et al.</i> , 2003)

COREA	Occurrence of <i>Fusarium</i> Mycotoxins in rice and its milling by-products in Korea	201 Arroz integral (n = 51) Arroz teñido de azul (n = 49) Arroz descolorido (n = 50) Arroz pulido (n = 51)	Arroz integral (2/4) Arroz teñido de azul (2/4) Arroz descolorido (34/68) Arroz pulido (0/0)	Arroz integral (50%) Arroz teñido de azul (50%)	Arroz integral (108) Arroz teñido de azul (358) Arroz descolorido (263) Arroz Pulido (0)	Arroz integral (54-161) Arroz teñido de azul (86-630) Arroz descolorido (59-1,355) Arroz Pulido (---)	HPLC GC-MS	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
NIGERIA	Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria	21	---	23,8	---	---	TLC HPLC	(Makun <i>et al.</i> , 2011)
COREA DEL SUR	Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS	5 tipos de cereales (arroz) de 507 granos de cereales	---	7	5,6	6,0 - 12,3	HPLC LC/MS/MS	(Kim <i>et al.</i> , 2017)
PAKISTÁN	Multiple Mycotoxins in Rice: Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan	180	14	8	6.99	0.61 - 22.98	LC-MS/MS	(Majeed <i>et al.</i> , 2018)

TLC, Cromatografía de capa fina; HPLC, Cromatografía líquida de alta eficiencia; LC/MS/MS, Cromatografía líquida/Espectrofotometría de masas; GC, Cromatografía de gases.

4.3 Zearalenona (ZEA)

Es una micotoxina no esteroidea, con actividad estrogénica. Químicamente es un macrólido que se describe como 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-β-ácido resorcíclico (Marín, 2010) (Figura 14). Es una micotoxina no esteroidea, con actividad estrogénica.



Figura 14. Estructura Química de Zearalenona.
Tomado de EFSA (2011)

La ZEA ($C_{18}H_{22}O_5$) es un compuesto cristalino blanco, con una masa molecular relativa de 318, una temperatura de fusión de 164 – 165 °C y máximos de absorción (y coeficiente de absorción) a 236 nm (29700), 274 nm (13909) y 316 nm (6020). También es posible encontrar en los alimentos un derivado hidroxilado, el zearalenol, con similares efectos estrogénicos.

Los principales hongos productores de ZEA son *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* y *F. semitectum* (Tantaoui El Araki, 2014). Estas especies crecen e invaden cultivos en condiciones de campo fresco y húmedo durante la floración, pero el crecimiento y la producción de toxinas pueden ocurrir después de la cosecha bajo malas condiciones de almacenamiento (EFSA, 2011). De igual manera, pueden producir pequeñas cantidades de varios metabolitos relacionados, α -zearalenol con mayor potencial estrogénico que el β -zearalenol, siendo los derivados más importantes (Hagler *et al.*, 1979; Richardson *et al.*, 1985).

Se presenta en maíz comúnmente, pero puede ser encontrado también en otros cereales tales como trigo, cebada, arroz y sorgo. Los cereales integrales son la principal fuente de metabolitos de ZEA en alimentos y piensos.

ZEA es termoestable hasta 150 °C, se ha observado degradación sólo a altas temperaturas o bajo condiciones alcalinas (Ryu *et al.*, 1999).

4.3.1 Toxicología

La toxicidad de ZEA está asociada con problemas reproductivos en algunos animales y posiblemente en humanos, dado que tienen la capacidad de unirse de forma competitiva con los receptores estrogénicos.

La ZEA se absorbe y metaboliza en el cuerpo humano dando lugar a diferentes metabolitos o formas modificadas de ZEA. Los metabolitos de fase I se forman principalmente mediante reducción de la ZEA. Por su parte, los metabolitos en fase II se forman por conjugación de la ZEA y sus metabolitos en fase I con moléculas endógenas de plantas y animales, como glucosa o sulfato, y con ácido glucurónico en animales. La mayoría de los metabolitos en fase I tienen actividad estrogénica y se asume que pueden tener un efecto sinérgico. Los

metabolitos en fase II no tienen actividad estrogénica por sí mismo, pero se asume que esos conjugados son fraccionados en el tracto gastrointestinal liberando la ZEA y sus metabolitos en fase I.

El cerdo es la especie más sensible al efecto estrogénico de la ZEA, especialmente infertilidad, siendo las hembras más sensibles que los machos e incluyen vulvovaginitis, aumento de tamaño de las glándulas mamarias, prolapso de útero y recto e hipoplasia de ovario (Minervini & Dell'Aquila, 2008). En los cerdos jóvenes puede presentarse reducción de la producción de espermatozoides y peso de los testículos (MacEvoy *et al.*, 2001).

Estudios recientes han demostrado el potencial de ZEA para estimular el crecimiento de carcinomas mamarios en humanos que contienen receptores de respuesta de estrógenos (Ahamed *et al.*, 2001). Se ha relacionado el consumo de ZEA con la presentación de pubertad precoz en niñas y aumento del tamaño de los órganos reproductores en niños (Abid *et al.*, 2003). Pueden producir efectos inmunosupresores en humanos (Berek *et al.*, 2001), o hiperplasia endometrial y adenocarcinomas (Creppy, 2002). Se ha involucrado hipotéticamente a ZEA en algunos casos de hiperestrogenismo humano.

Esta micotoxina se ha reportado como un posible factor involucrado en cáncer de cerviz y telarquia prematura (Blunden *et al.*, 1991). Ha sido investigada en el tejido endometrial de 49 mujeres, 27 de ellas presentaban adenocarcinoma endometrial. Otras 11 tenían hiperplasia endometrial. Y el resto presentaban características endometriales normales.

La capacidad de la ZEA para acoplarse a los receptores del 17- β -estradiol ha determinado la acción tóxica de esta micotoxina (CAST, 2003), que compite con los estrógenos por los receptores citosólicos de las células de los órganos blanco (Withanage *et al.*, 2001) y se une a estos, comportándose como un disruptor endocrino (Osweiler, 2000).

La toxicidad aguda de ZEA es baja, con valores de DL50 variables entre 2.000 y 10.000 mg/kg, dependiendo de la especie animal. La dosis oral letal media (DL50) para ratas es 4 mg/g de peso corporal.

La importancia de esta micotoxina reside en las alteraciones del aparato reproductor de los animales cuando las concentraciones en el alimento exceden el nivel de 1 – 5 ppm.

ZEA es la segunda micotoxina más frecuentemente reportada en Estados Unidos y Canadá (después del desoxinivalenol) y puede presentarse conjuntamente con esta micotoxina (Díaz, 1996).

4.3.2 Síntesis de la Zearalenona

La síntesis de esta toxina (Figura 15) se da por acción combinada de dos poliquétidosintasas (PKS 13 y PSK4) y dos proteínas de síntesis de zearalenona (ZEB), una isoamil alcohol oxidasa (ZEB1) y una proteína con dominio cremallera de leucina (ZEB2). Los cuatro genes involucrados se encuentran en un cluster de 39 kb de longitud (Kim *et al.*, 2005; Gaffoor & Trail, 2006).



Figura 15. Cluster de genes involucrados en la biosíntesis de Zearalenona.
Tomado de: <http://www.rasmusfrandsen.dk/zealenone.htm>

4.3.3 Detoxificación

4.3.3.1 Métodos Físicos

Se han empleado cierta cantidad de adsorbentes (Tabla 15), los que han presentado mayor efectividad son: la montmorillonita con una capacidad de unión de 108 mg/g y la colestiramina también se ha estudiado observándose su unión a la ZEA, sin embargo, se desecha comercialmente por el encarecimiento del producto final (Diekman & Green, 1992).

Tabla 15. Adsorción *in vitro* de ZEA por diversos adsorbentes. Tomado de Soriano (2007).

ADSORBENTE	CAPACIDAD DE ADSORCIÓN (mg/g)
Montmorillonita	0,19
Bentonita	0,11
Sepiolita	0,07
Tritisilicato de magnesio	0,02
Colestiramina	>0,3
Crospovidona	0,3
Polivinilpirolidona	0,5-2,1

4.3.3.2 Métodos Biológicos

El uso de mananoligosacáridos ha reflejado una alta capacidad de unión, hasta un 80 % sobre ZEA. Existen evidencias de degradación microbiológica en el rumen. Se estima que la reducción de ZEA a α -zearalenol tiene lugar de manera muy activa en la mucosa intestinal. *In vitro* se ha visto la capacidad de determinadas bacterias de eliminar tanto la ZEA como el α -zearalenol del medio de cultivo mediante el empleo de cepas de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* LC705).

4.3.4 Métodos de detección para Zearalenona

Se ha formulado un método de detección múltiple para las aflatoxinas, ocratoxinas y la zearalenona (Eppley, 1968), ensayado en colaboración (Shotwell, *et al.*, 1976). El procedimiento está compuesto de una extracción con agua – cloroformo, combinada con la elusión secuencial de las micotoxinas en una columna de gel de sílice, el límite de detección se sitúa entre 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mirocha *et al.* (1974) describieron un método muy flexible de análisis para determinar la presencia de ZEA por cromatografía de capa delgada (CCD), cromatografía de gas – líquido (CGL), cromatografía de gas – líquido/espectrometría de masas, o una combinación de estos métodos, con un límite de detección de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los derivados dimetoxizearalenona y metiloxima – di – TMS – zearalenona se usan para confirmar la identidad de la ZEA. Actualmente, se cuenta con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

4.3.5 Legislación para el contenido de Zearalenona en cereales

Los límites máximos permitidos de concentraciones de ZEA en los cereales y productos de cereales los presenta el Reglamento (CE) N° 1881/2006 y el Reglamento (UE) N° 1126/2007, de la Comisión de 28 de septiembre de 2007, que modifica el primero (CE, 2006; CE, 2007). Si bien, esta normativa especifica claramente que, para los efectos de los contenidos máximos de ZEA, el arroz no se incluye en los «cereales» y tampoco los productos a base de arroz se incluyen en los «productos a base de cereales».

En Colombia, la Resolución del Ministerio de Salud y la Protección Social No. 4506 de 2013, establece los niveles máximos de ZEA en cereales no elaborados distintos al maíz,

aclarando que el arroz no se incluye en los «cereales» y los productos a base de arroz no se incluyen en los «productos a base de arroz» (MSPS, 2013).

4.3.6 Estudios sobre contaminación de Zearalenona en arroz

4.3.6.1 Contexto Internacional

En la Tabla 16 se relacionan estudios de contaminación de arroz con Zearalenona llevados a cabo en diferentes países del mundo.

Tabla 16. Estudios de contaminación de arroz con Zearalenona realizados en el ámbito internacional

PAÍS	TÍTULO	n	MUESTRAS +	INCIDENCIA (%)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO (µg/kg)	RANGO DE CONCENTRACIÓN (µg/kg)	MÉTODO DE DETERMINACIÓN	REFERENCIA
BRASIL	Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos	56	3	5,35	---	559,11 – 1955	TLC	(Nunes, Bertolin, & Furlong, 2003)
COREA	Occurrence of <i>Fusarium</i> Mycotoxins in rice and its milling by-products in Korea	201 Arroz integral (n = 51) Arroz teñido de azul (n = 49) Arroz descolorido (n = 50) Arroz pulido (n = 51)	Arroz integral (14/27) Arroz teñido de azul (48/98) Arroz descolorido (40/80) Arroz pulido (0/0)	---	Arroz integral (96) Arroz teñido de azul (765) Arroz descolorido (327) Arroz Pulido (0)	Arroz integral (47–235) Arroz teñido de azul (26–3,156) Arroz descolorido (25–3,305) Arroz Pulido (---)	HPLC	(Lee <i>et al.</i> , 2011)
NIGERIA	Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria	21	6	53,4	10,6	0 – 41,9	TLC HPLC	(Makun, Dutton, Njobeh, & Mwanza, 2011)
COREA DEL SUR	Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS	5 tipos de cereales (arroz) de 507 granos de cereales	---	32	5,2	0,4 – 37,6	HPLC LC/MS/MS	(Kim <i>et al.</i> , 2017)
PAKISTÁN	Multiple Mycotoxins in Rice: Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan	180	27	15	8,48	13 - 114	LC–MS/MS	(Majeed <i>et al.</i> , 2018)
BRASIL	Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil	---	--	60	---	90.56 - 126.31		(Savi <i>et al.</i> , 2018)

TLC, Cromatografía de capa fina; HPLC, Cromatografía líquida de alta eficiencia; LC/MS/MS, Cromatografía líquida/Espectrofotometría de masas.

5. Factores que afectan la producción de micotoxinas

Tanto en el campo como en el almacenamiento los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir que, habiendo un desarrollo fúngico apreciable, no se encuentre la cantidad de micotoxina esperada. Debido a su estabilidad, las micotoxinas pueden persistir aun cuando hayan muerto las esporas. Además, influyen los requerimientos nutricionales de la especie particular. Por ejemplo, una escasa disponibilidad de Zn, elemento necesario para biosíntesis de aflatoxinas, puede determinar la baja incidencia de este metabolito en algunos sustratos (Moss, 1991).

En general, el aumento de los metabolitos secundarios es una respuesta al "stress". Si éste es causado por un biocida en concentración subletal, provoca un aumento de la biosíntesis de micotoxinas (Widstrom, 1992).

Los hongos de campo, incluyen los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, entre otros, requieren altas concentraciones de humedad (20 – 21 %), también depende del tipo de cultivo (amiláceo u oleaginoso), de la disponibilidad de agua (época del año) y del grado de infestación de insectos que puedan causar daño además del efecto que puede ejercer la mecanización al cosechar.

Los de almacenamiento, conformados principalmente por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, requieren menos humedad (13 – 18 %) y normalmente no representan problema durante la cosecha (Santin, 2005). Lo que sugiere que, las micotoxinas pueden ingresar a la cadena alimentaria desde el mismo cultivo, el almacenamiento de las materias primas y los alimentos, y de igual manera en puntos intermedios del proceso como manipulación, embalaje y transporte (Bennett & Klich, 2003).

La producción de micotoxinas depende de diferentes factores:

5.1 Factores biológicos

En los diferentes cultivos la colonización puede ocurrir por una o más especies de hongos y la producción de micotoxinas puede estar influenciada por la interacción entre estos. También hay diferencia en la producción de toxina según sea la cepa o estirpe del hongo,

caso específico de *A. flavus*, atendiendo a que hay cepas que no producen AF, mientras que la gran mayoría de cepas son productoras (Sanchís *et al.*, 2000).

5.2 Factores físicos

La cantidad de agua en el ambiente y en los sustratos es un factor relevante para la producción de los hongos y la producción de toxinas. Sin embargo, la forma en que se presenta esta humedad, también es determinante para el desarrollo de los hongos. El valor de A_w que los hongos necesitan, varía de acuerdo al sustrato y a la temperatura (Gimeno & Martins, 2003). La mayoría de los hongos se desarrollan a partir de A_w de 0,70. Sin embargo, cada género presenta condiciones particulares muy definidas (Samapundo *et al.*, 2005).

La estacionalidad y los microclimas que se crean en los campos a nivel de almacenaje influyen directamente en la presencia de agua en las cosechas. En verano o en zonas cálidas, el aire de la periferia presenta una temperatura más elevada que la del interior, creando el fenómeno de convección, condensando humedad y actuando en el desarrollo fúngico y en la producción de micotoxinas (Blandon, 2011).

Los hongos productores de micotoxinas pueden crecer de forma natural entre un rango de temperatura entre -3 a 40 °C, cuando la humedad lo facilita. La temperatura óptima para su desarrollo, se encuentra entre los 25 – 30 °C, con un límite máximo de 45 °C (Gimeno, 1999).

La interacción entre la actividad el agua (A_w) y la temperatura son los factores más determinantes para el crecimiento fúngico (Ayerst, 1969) y para la producción de micotoxinas (Lacey *et al.*, 1991), como se aprecia en la Tabla 17. Los datos referidos a valores óptimos y limitantes de temperatura y A_w , dependen de la cepa y el sustrato usado, de las condiciones de cultivo (luz, O_2 , pH, entre otros) y de los procedimientos analíticos.

Con un valor de A_w de 0,85 y a 20 °C (equivalente aproximadamente a 15 – 16 % de humedad del sustrato), las esporas fúngicas germinan en un periodo de 5 a 12 días; mientras que con una A_w de 0,75 (aproximadamente 13 – 14 % de humedad del sustrato) y a 20 °C, las esporas tardan en germinar de 4 a 12 semanas (Gimeno & Martins, 2003).

Tabla 17. Influencia de la temperatura (T) y la actividad de agua (Aw) en el crecimiento de hongos toxigénicos y producción de algunas micotoxinas *in vitro*. Tomado de Vaamonde (1987)

	Temperatura óptima (°C)	Rango de temperatura (°C)	A _w óptimo	A _w límite
<i>Aspergillus flavus</i>	37	7 – 44	0,980	0,780
Aflatoxinas	25 – 30	14 – 40	0,980	0,850
<i>Fusarium roseum</i>	25			
Zearalenona	25 + 15*	-	-	-
<i>F. graminearum</i>	25	-	0,970	0,900
Zearalenona				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	30	8 – 37	0,990	0,760
Ocratoxina	31	12-37	0,990	0,850
<i>Penicillium verrucosum</i>	24	0 – 31	0,970	0,860
Ocratoxina	24	4 – 31	0,970	0,900

* Dos semanas a 25 °C seguidas de seis semanas a 15 °C

5.3 Factores químicos

La utilización de fungicidas en los cultivos y en los productos almacenados reduce en forma considerable la presencia de hongos y por consiguiente la posibilidad de encontrar en ellos altas cantidades de toxinas. Sin embargo, cuando se aplica el fungicida en concentraciones no letales, puede actuar en beneficio de la producción de toxina por parte del hongo. De otro lado, la mezcla de diferentes fungicidas puede inhibir la producción de una toxina específica, pero a la vez pueden estimular la producción de otra (D'Mello & MacDonal, 1997).

Los hongos tienen la capacidad de tolerar un rango amplio de pH (2,5 – 7,5), tienden a ser más resistentes a los medios ácidos que a los básicos. Tienen la capacidad de modificar el pH del sustrato para su propio beneficio, utilizan los ácidos orgánicos de los sustratos o los producidos por otros microorganismos presentes durante el deterioro del alimento, asegurando la viabilidad y posterior producción de toxinas (Blandon, 2011).

5.4 Factores que condicionan la presencia de aflatoxinas

La presencia de AF en los productos alimenticios está asociada, tanto a las condiciones de almacenamiento inadecuadas como a la contaminación del grano en el campo. Los factores que afectan la contaminación de los granos incluyen: el hongo productor, la cantidad de esporas inoculadas, el sustrato, la temperatura del ambiente, la microbiota asociada, la tensión durante el crecimiento de las plantas, las poblaciones de insectos y ácaros, las variedades susceptibles o resistentes de las plantas, daños mecánicos, daños por tormenta, daños por aves, la nutrición mineral de la planta, las condiciones ambientales como la presencia de

gases atmosféricos (O_2 y CO_2), humedad relativa en la atmósfera de almacenamiento y el periodo de almacenamiento (Moreno, 1988).

De igual manera, factores ambientales, tales como humedad, A_w y temperatura, que se constituyen en los más importantes para la producción de AF (Goldblatt, 2012; Abrar *et al.*, 2013).

Bajo condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos, la producción de AF puede ser alta a las 24 horas. El máximo se alcanza a los 7 a 10 días y posteriormente el nivel de AF fluctúa con el tiempo, pero bajo las condiciones en que normalmente se manejan los productos agrícolas, las mismas son muy estables, resistiendo las temperaturas de elaboración de los alimentos (Moreno, 1988).

Mousa *et al.* (2016), realizaron un estudio para evaluar el efecto combinado de la A_w , y la temperatura sobre el crecimiento y producción de AF por *A. flavus* en arroz, además de evaluar la interacción entre la presencia de CO_2 y la A_w . Evidenciaron que los factores de temperatura, A_w y nivel de CO_2 desempeñan un papel relevante en el crecimiento y la producción de AF por *A. flavus*, la especie de hongo más importante que coloniza el arroz en los trópicos. Cuando se consideran los efectos de A_w y temperatura en la relación diámetro de colonia/AF, la A_w exhibe un mayor efecto que la temperatura. En cada condición ensayada, el rendimiento de AF parece estar correlacionado con el diámetro de colonia o la biomasa fúngica. Dentro de los rangos experimentales estudiados, se encontró que una A_w de 0,98 y una temperatura de 30 °C eran las condiciones óptimas para el crecimiento y la producción de AF.

Aunado a lo anterior, la incidencia de AF se ve favorecida por el ataque de plagas insectiles que se desarrollan bajo condiciones específicas como la fecha de siembra, altas densidades de siembra y alta incidencia de malezas (Rodríguez, 1996).

5.4.1 Temperatura y humedad

Los hongos del género *Aspergillus* pueden crecer a temperaturas de 8 a 55 °C, siendo de 36 a 38 °C las temperaturas óptimas de desarrollo y de 25 a 35 °C las temperaturas óptimas de producción de AF. No se producen aflatoxinas por debajo de 10 °C y por encima de 45 °C.

El rango de producción está entre 12 y 40 °C. La humedad relativa para el desarrollo de hongos aflatoxigénicos es del 80 – 90 %, la actividad de agua (A_w) varía de 0,82 a 0,99 (Arrúa *et al.*, 2013; Magan *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2013).

El cambio climático juega un papel importante en la producción de AF en cultivos alimentarios, afectando las interacciones entre diferentes especies micotoxigénicas y las toxinas producidas por ellos en los alimentos (Paterson & Lima, 2010, 2011; Magan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011).

Los cambios en la temperatura ambiental puede influir en los niveles de expresión de genes reguladores (aflR y aflS) y la producción de AF por *A. flavus* y *A. parasiticus* (Schmidt-Heydt *et al.*, 2010, 2011). Abdel *et al.* (2010), reportaron una buena correlación entre la expresión de un gen estructural (aflD) y AFB₁. La temperatura interactúa con la actividad del agua (A_w) e influye en la proporción de genes reguladores (aflR / aflS), que es directamente proporcional a la producción de AFB₁ (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009, 2010). Las interacciones entre la A_w y la temperatura tienen un efecto prominente sobre *Aspergillus* spp. y la producción de AF (Sanchis y Magan, 2007; Magan & Aldred, 2007).

Aumentando la temperatura a 37 °C y la A_w se reduce significativamente la producción de AFB₁, a pesar del crecimiento de *A. flavus* en estas condiciones. La adición de CO₂ bajo la misma temperatura y actividad de agua mejora la producción de AFB₁ (Medina *et al.*, 2014). Gallo *et al.* (2016), reportaron que la biomasa fúngica y la producción de AFB₁ fueron más altos a 28 °C y A_w de 0,96; mientras que se observó crecimiento fúngico y producción de AFB₁ a 20 °C con valores de A_w de 0,90 y 0,93. Tampoco hubo producción de AFB₁ a 37 °C.

La PCR cuantitativa de transcriptasa inversa también reveló que los genes reguladores aflR y aflS eran altamente expresados a 28 °C, mientras que la expresión más baja se observó a 20 y 37 °C, lo que sugiere que la temperatura juega un papel importante en la expresión génica y la producción de AF (Gallo *et al.*, 2016).

5.4.2 El hongo y la microbiota asociada

La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus spp.* se debe a la invasión del hongo saprobio oportunista sin capacidad patogénica, de esta manera las cepas de *A. flavus* suelen infectar antes de la cosecha a semillas de algodón, maníes o granos de maíz en crecimiento (Lillehoj, 1992). Los insectos están asociados a la presencia de AF en granos, debido a que pueden actuar como vectores. La aplicación de insecticidas limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos (Widstrom, 1992).

Las interacciones con otros microorganismos pueden afectar la producción de micotoxinas. *Brevibacterium linens* y *Streptococcus lactis* inhiben la síntesis de AF pero la estimulan *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter aceti* (Moss, 1991). Se observa una disminución de la cantidad de AF cuando *A. flavus* crece en un cultivo mixto con *Penicillium oxalicum* u otros hongos, y una alteración de la relación G₁/B₁ en el caso de *A. parasiticus* (Widstrom, 1992). Por su parte *A. flavus* afecta a la capacidad de formación de toxinas de *A. ochraceus* o *A. versicolor* (Devi & Polasa, 1987). Además, *Aspergillus* inhibe la producción de toxinas por otros géneros en cultivos mixtos (Reddy & Reddy, 1992) mientras que *Trichoderma viride* impide la formación de AF (Bilgrami & Sinha, 1992).

Los hongos aflatoxigénicos producen gran número de esporas y las mismas requieren para germinar una humedad relativa mínima de 83 % y para establecerse el hongo requiere una humedad de 85 %. *Aspergillus spp.* es un hongo débil y es mal competidor con otros hongos que crecen en el mismo sustrato bajo las mismas condiciones ambientales (Moreno & Gil, 1991) por lo que invade con mayor facilidad plantas sometidas a condiciones de estrés como sequías, altas temperaturas (32 a 38 °C), temperaturas nocturnas elevadas, ataques de insectos, ácaros, pájaros, tormentas y daños mecánicos.

Son más saprobios que parásitos, por lo que proliferan fácilmente en tejidos muertos (Christensen, 1974; Moreno, 1988; Moreno & Gil, 1991; Mazzani *et al.*, 2004). El número de cepas productoras de AF no solo dependerá del genotipo del hongo, sino también de factores ambientales que ejercen su influencia sobre el metabolismo y crecimiento del mismo (Cabañes *et al.*, 2007).

5.4.3 Sustrato

El sustrato y el tipo de componentes nutricionales del mismo son factores determinantes en la posible biosíntesis de micotoxinas, tanto en productos naturales como en medios sintéticos y ejercen un claro efecto sobre la producción de micotoxinas. La contaminación por diferentes especies fúngicas en los granos de cereales puede permitir cambios en su calidad nutricional.

Cualquier sustrato que permita el crecimiento de las especies toxigénicas es apto para la producción de AF. Sustratos ricos en carbohidratos y ácidos grasos aumentan la producción de aflatoxinas. *A. flavus* presenta mayor actividad proteolítica y *A. parasiticus* mayor actividad lipolítica (Gendy & Marth, 1980; Moreno, 2004).

Capítulo II
Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Estudiar la incidencia de aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol en el arroz producido en las principales zonas arroceras de Colombia.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la calidad microbiológica del grano de arroz cultivado en Colombia.
- Evaluar el comportamiento de las principales variables fisicoquímicas del arroz cultivado en las principales zonas arroceras de Colombia.
- Cuantificar los niveles de aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol presentes en las muestras de arroz cultivado en Colombia.
- Verificar la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos fúngicos obtenidos a partir del arroz cultivado en Colombia.
- Correlacionar la incidencia de micotoxinas con las zonas muestreadas y los grupos de microorganismos presentes en las muestras de arroz cultivado en Colombia.

Capítulo III
Metodología

3. Metodología

El presente estudio se desarrolló a partir de dos muestreos, el primero realizado durante el año 2017 incluyendo los sistemas de cultivo del arroz (riego y secano) y el segundo en el 2018 abarcando los mismos sistemas.

3.1 Población de estudio

Las áreas sembradas en hectáreas por zona arroceras y sistema de cultivo empleado se muestran en la Tabla 18. Los datos obtenidos se basan en los dos últimos censos realizados en el país donde se evidencia una disminución tanto en las áreas sembradas como en la producción; este comportamiento de la caída en los rendimientos a partir del año 2008, pero en especial en los años 2010 y 2011, se puede explicar por factores climáticos, como los aumentos en los niveles de lluvias, la menor luminosidad y problemas de bacterias y hongos que afectaron las zonas productoras en este periodo.

Por tal razón, atendiendo a los sistemas de cultivo se estiman las áreas cultivadas. De esta manera, la zona Centro presenta 64.713 hectáreas sembradas y representa el mayor porcentaje (48,90) de área sembrada en el país, seguida de la zona Norte, Llanos Orientales y Nororiental con porcentajes de 21,7; 17,7 y 11,6, respectivamente.

Tabla 18. Distribución de áreas sembradas por sistema de cultivo y zona arroceras en Colombia. Tomado de DANE - FEDEARROZ - ENAM I SEM., 2017 - 2018

ZONA ARROCERA	ÁREA SEMBRADA		SISTEMA RIEGO	SISTEMA SECANO
	Ha	(%)	ÁREA (ha) *	ÁREA (ha) *
Costa Norte	28.702	21,70	9.859	18.842
Centro	64.713	48,90	64.376	336.5
Llanos Orientales	23.403	17,70	18.998	4.404
Santanderes	15.401	11,60	15.404	-
Total	132.219	100	108.637	23.582

* Áreas estimadas

3.1.1 Selección de las hectáreas a muestrear

3.1.1.1 Tamaño de muestra

Se calculó una muestra representativa, por medio de la siguiente ecuación:

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1 - P)}{e^2 \cdot (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \cdot P \cdot (1 - P)}$$

Donde:

$N= 132.219$ Hectáreas

$Z_{\alpha}= 1,96$ con un nivel de confianza del 95 %

$e= 5$ %, margen de error admitido

$P= 50$ %, incidencia esperada, esto es debido a que, en el país no existen estudios relacionados de incidencia para micotoxinas en arroz, donde se haya establecido una proporción.

Con las especificaciones anteriores, el tamaño de la muestra obtenido fue de 383 hectáreas. Teniendo en cuenta que hay dos sistemas de cultivo, se aplicó un muestreo estratificado con afijación proporcional (Tabla 19), de acuerdo a zonas geográficas denominadas: zona Norte, zona Centro, zona Llanos Orientales y zona Nororiental. La zona Norte estuvo representada por los departamentos de Córdoba, Cesar, Bolívar y Sucre; la zona Centro abarcó los departamentos de Huila, Tolima y Caquetá; la zona Llanos Orientales incluyó los departamentos de Meta y Casanare y la zona Nororiental el departamento Norte de Santander.

Tabla 19. Distribución de las muestras por zona arroceras y sistema de cultivo

ZONA ARROCERA	NÚMERO DE HECTÁREAS	% HECTÁREAS	SISTEMA RIEGO			SISTEMA SECANO		
			DEPARTAMENTO	ha CULTIVADAS	UNIDADES ANALÍTICAS	DEPARTAMENTO	ha CULTIVADAS	UNIDADES ANALÍTICAS
COSTA NORTE	83,11	21,70	Córdoba	3,22 ha	2	Bolívar	12,11 ha	2
			Cesar	19,07 ha	2	Córdoba	4,14 ha	2
						Sucre	32,91 ha	4
CENTRO	187,29	48,90	Huila	42,79 ha	6	Caquetá	0,97 ha	2
			Tolima	143,44 ha	19	Tolima	0,05 ha	2
LLANOS ORIENTALES	67,79	17,70	Casanare	31,16 ha	4	Casanare	4,97 ha	2
			Meta	23,41 ha	3	Meta	7,39 ha	2
SANTANDERES	44,40	11,60	Norte de Santander	43,60 ha	6	-	-	-
			Santander	0,79 ha				
TOTAL	383	100			42			16

El número de hectáreas para el sistema riego fue de 315 hectáreas y para el sistema seco de 68 hectáreas, las cuales se distribuyeron nuevamente en forma proporcional para cada una de las zonas.

Los factores de inclusión para el estudio a nivel de zonas arroceras, correspondieron a:

- Sistema de cultivo: riego y seco.
- Departamentos con mayor número de hectáreas sembradas.
- Factor de inclusión para las hectáreas a sembrar por zona arroceras:

- Mayor número de hectáreas sembradas en cada departamento: número de muestras analíticas (cada unidad analítica fue constituida por 250 gramos de muestra) proporcional a las hectáreas cultivadas 143,44 ha – 0.97 ha.

En la Figura 16, se presentan las principales zonas arroceras de Colombia, evidenciándose los departamentos donde se tomaron las muestras de arroz *paddy* atendiendo a los sistemas de cultivo. De igual manera, se destacan las ciudades donde están ubicados los molinos donde se tomaron las muestras de arroz comercial (empacado).

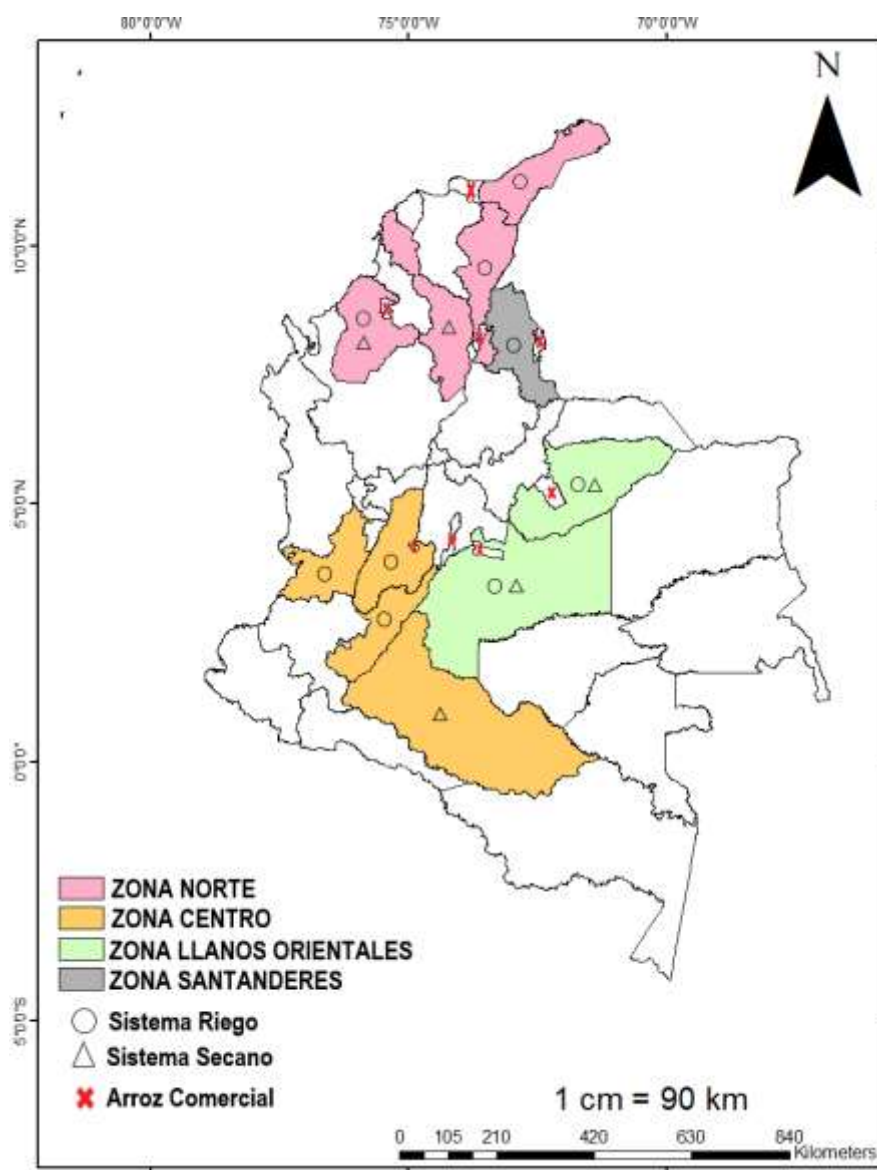


Figura 16. Principales zonas arroceras de Colombia, señalando los sitios de muestreo de arroz en cultivo y de arroz comercial

Se realizó un muestreo de arroz comercial (arroz empacado) (Tabla 20), que se llevó a cabo en atención al número de molinos ubicados en las diferentes zonas arroceras.

Tabla 20. Proceso de muestreo del arroz comercial

ZONA ARROCERA	DEPARTAMENTO	NÚMERO DE MOLINOS
Norte	Córdoba	1
	Magdalena	1
	Atlántico	1
	Cesar	1
Centro	Tolima	1
	Huila	1
	Bogotá	2
Llanos Orientales	Meta	2
	Casanare	2
Nororiental	Santander	1
	Norte de Santander	3
Total		16

3.2 Métodos de análisis

3.2.1 Análisis Microbiológico

3.2.1.1 Preparación de las muestras

Se siguió el método descrito en la norma ISO 6887-1 (ISO, 2017). Se pesaron asépticamente 11 g de muestra de arroz, que se diluyeron en 99 ml de una solución estéril de agua peptona al 0,1 % y, se homogenizó para obtener la primera dilución (10^{-1}); a partir de esta dilución se realizó un banco de diluciones con agua de peptona al 0,1 % hasta obtener la dilución 10^{-6} .

3.2.1.2 Coliformes totales y *Escherichia coli*

Se siguió el método horizontal establecido en la Norma Técnica Colombiana NTC 4458 (2007) para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* (o ambos) en alimentos y alimentos para animales. Se trata de una técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos.

La identificación simultánea de Coliformes Totales y *Escherichia coli*, se hace posible por la combinación de dos sustratos cromógenos. El sustrato Salmon-GAL es escindido por la enzima β -D-galactosidasa característica de coliformes y provoca una coloración roja de las colonias de coliformes. La identificación de la β -D-glucuronidasa característica para *E. coli*

tiene lugar mediante el sustrato X-glucurónido, cuyo producto de escisión produce una coloración azul de las colonias positivas. Ya que *E. coli* escinde tanto Salmon-GAL como X-glucurónido, las colonias se tiñen de violeta-azul oscuro y debido a ello, son fáciles de diferenciar de los demás coliformes, que se presentan de color rojo.

El contenido en triptófano mejora la reacción de indol para la confirmación adicional de *E. coli* y aumenta con ello la seguridad de identificación en combinación con la reacción Salmon-GAL y la reacción X-glucurónido.

A partir de la serie de diluciones decimales (10^{-5} y 10^{-6}) y por duplicado, se depositó con una pipeta estéril 1 ml de cada dilución en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro. A cada placa se le adicionaron aproximadamente 15 ml del medio Chromocult (Merck, Darmstadt, Alemania); se mezcló cuidadosamente y se dejó solidificar, colocando las placas sobre una superficie horizontal (Método de siembra en profundidad). Una vez solidificadas las placas de agar se introdujeron invertidas en estufa de incubación a $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 24 – 48 horas.

Se seleccionaron las placas en las cuales se desarrollaron entre 30 – 300 colonias. Los recuentos obtenidos se expresaron como Log_{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por g de masa.

3.2.1.3 Determinación de Mohos y Levaduras

Se siguió el método recomendado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia y por la “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF, 1982).

Se transfirieron, por duplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en placas de Petri estériles. Se vertieron en las placas de Petri, 15 ml de Agar OGY. Se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido, una vez solidificado el medio de cultivo, se invirtieron las placas se incubaron a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 5 – 7 días.

Se seleccionaron las placas correspondientes a la dilución que contenían entre 10 y 100 colonias, se contaron las colonias obteniendo la media aritmética de los recuentos y se multiplicó por el factor de dilución. El resultado se informó como Log_{10} de unidades formadoras de colonias (UFC) por g de masa.

3.2.2 Determinación de variables fisicoquímicas

3.2.2.1 Determinación de pH

Se utilizó el método AOAC 981.12. Para ello se colocó en un vaso de precipitados 5 gramos de muestra, que se mezclaron con 10 ml de agua. Posteriormente, se introdujo el electrodo del pH - metro en la muestra de ensayo. Se leyó el pH directamente en la escala del instrumento. Se realizaron tres mediciones sucesivas de cada muestra.

3.2.2.2 Determinación de la Actividad Acuosa (Aw)

Para la determinación de la actividad de agua en las muestras se siguió el método recomendado por Barbosa *et al.* (2007), utilizando un medidor HygroPalm (Rotronic, Crawley, Inglaterra) con una precisión: +/- 0.8 % HR (0.008 Aw) / ± 0.1 K Precisión: +/- 0.8 % HR (0.008 Aw) / ± 0.1 K. Se tomó aproximadamente 5 g de muestra, la cual se depositó en el portamuestra y seguidamente se colocó la sonda para proceder a determinar la Aw en un tiempo aproximado de 6 minutos. A cada muestra se le determinó la Aw por triplicado.

3.2.2.3 Determinación de Humedad (%H)

Se determinó el porcentaje de humedad mediante el método “*Foods. Determination of moisture (Thermobalance rapid method)*” NMX-F-428-1982. Para ello, se usó una balanza de humedad Precisa modelo MX 60 (Precisa, Dietikon, Suiza), en donde se pesó aproximadamente 2 g de muestra, la cual fue sometida a una temperatura de 105 °C hasta llevar a peso constante. Este procedimiento se realizó por triplicado a cada una de las muestras.

3.2.3 Análisis de Micotoxinas

Las técnicas utilizadas en el estudio fueron desarrolladas y/o estandarizadas en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, basándose en técnicas reconocidas por la AOAC para análisis de alimentos, y también en el método descrito por Trucksess *et al.* (1994).

3.2.3.1 Método de análisis de Aflatoxinas (AF) de ocurrencia natural (B1, B2, G1 Y G2).

Se siguió la Norma Técnica Colombiana NTC 1232 (1996-10-23), utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.

Principio. Las aflatoxinas se extraen con una mezcla de acetonitrilo (HPLC, Merck): agua (HPLC, Merck) (84+16) y se purifican con una columna multifuncional de limpieza. Luego de evaporar el extracto bajo una corriente de nitrógeno, las AFB₁ y AFG₁ se derivatizan a sus correspondientes hemiacetales (AFB_{2a} y AFG_{2a}).

La separación de las cuatro aflatoxinas {B₁ (B_{2a}), B₂, G₁, (B_{2a}) y G₂} se hace en una columna cromatográfica de fase reversa (RP-18). Las aflatoxinas se detectan finalmente y se cuantifican mediante un espectrofotómetro de fluorescencia acoplado a un integrador - graficador, utilizando un método de cuantificación por estándar externo.

3.2.3.1.1 Procedimiento General

Extracción. En un erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado o tapa rosca, se mezclaron 25 gramos de arroz adecuadamente molido con 100 ml de solvente de extracción [CH₃CN (HPLC, Merck): agua (HPLC, Merck)] (84 + 16), se homogenizó la muestra y el solvente durante 3 minutos en una licuadora.

Se filtró a través de papel filtro cualitativo (Whatman No. 4, Merck) y se recolectó cerca de 5 ml de filtrado en un tubo de ensayo de 10 ml.

Purificación del extracto. Se insertó lentamente el extremo con el borde de caucho de la columna de limpieza Micotox 2002 (Micotox, Bogotá, Colombia) en el tubo de ensayo y se presionó hasta obtener cerca de 0,5 ml de extracto purificado en el interior de la columna.

Se transfirió cuantitativamente 0,5 ml del extracto purificado a un vial de fondo cónico de 2 ml de capacidad, se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.

Se redisolvió el residuo seco con 200 µl de acetonitrilo (HPLC, Merck).

Condiciones cromatográficas (HPLC). Se filtró a través de membrana de 0,45 μm (Millipore HVLP 1300, Merck) y se inyectaron 50 μl en el cromatógrafo de líquidos (Shimadzu Prominence, Canby, OR, USA).

Inyector automático: SIL-20A_{HT} (Shimadzu Prominence, Canby, OR, USA).

Bomba cromatográfica: bomba binaria LC -20AB (Shimadzu, Canby, OR, U.S.A.).

Horno cromatográfico: CTO-20_{HT} (Shimadzu, Canby, OR, U.S.A.).

Columna analítica: Thermo RP-18 150 x 4.6 mm Hyperil Gold.

Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables: Fluorescencia (FLD) 20AXL, condiciones de operación: excitación 365 nm, emisión 450 nm, respectivamente (GAIN = 2) (Shimadzu Prominence, Canby, OR, USA).

Sistema de integración: Sistema de integración por programa LC-Solution Shimadzu para el registro y tratamiento de las señales (Shimadzu, Canby, OR, U.S.A.).

Fase móvil: Agua: MeOH: ACN (4:1:1), flujo: 1.0 ml/min.

Temperatura: 35 °C.

Precolumna: Thermo RP-18 Hyperil Gold (5 μm) 10 x 4 mm Drop in (5 μm).

Presión: 100 kg/cm² con columna y precolumnas nuevas.

Orden de elusión: AFG₂, AFG₁, AFB₂, AFB₁.

Tiempos de retención aproximados: 7.88 min; 9.47 min, 10.13 min, 12.49 min, respectivamente (Figura 17).

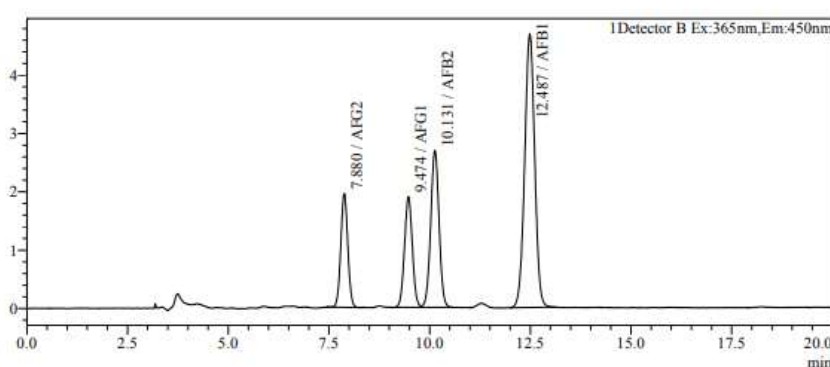


Figura 17. Cromatograma estándar de Aflatoxinas

Curvas de Calibración de los estándares de Aflatoxinas. A partir de los estándares de AF se realizaron las correspondientes curvas de calibración para cada una de ellas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂), como se presenta en la Figura 18.

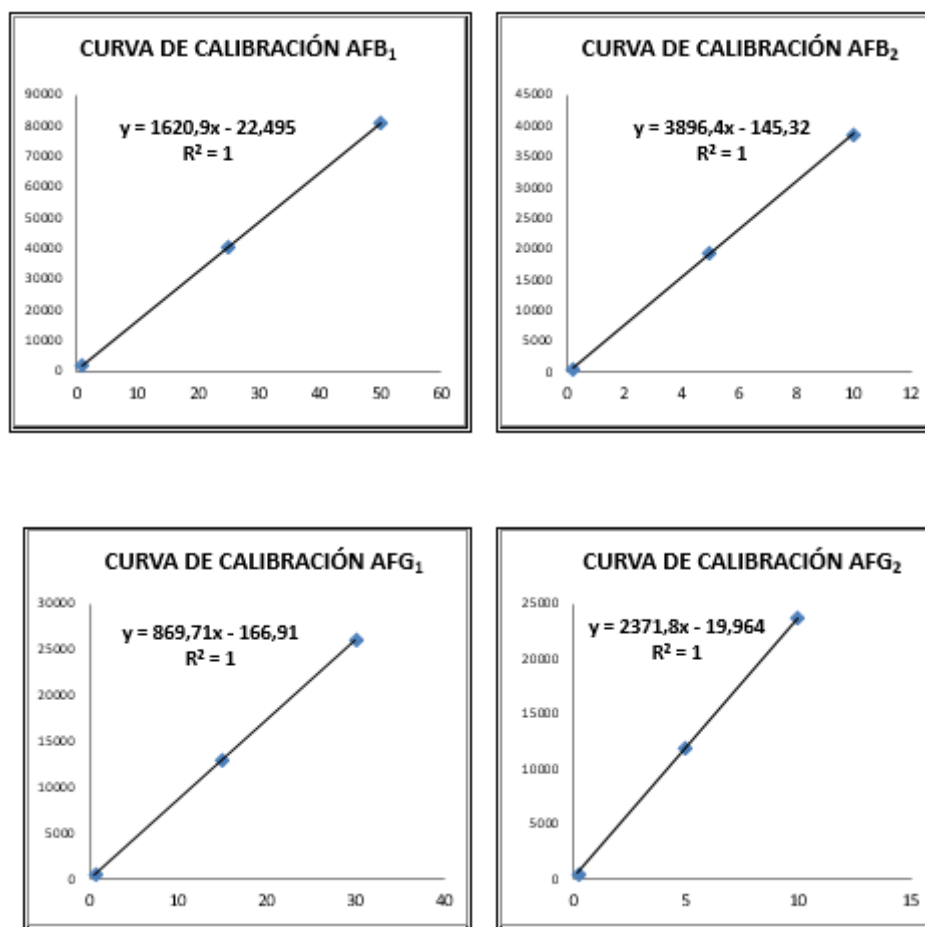


Figura 18. Curvas de Calibración de los Estándares de Aflatoxinas

3.2.3.2 Método de análisis de Zearalenona (ZEA) de ocurrencia natural.

Se ha seguido la Norma Técnica Colombiana NTC 4881 (2000-10-25).

Principio. La ZEA se extrae con una mezcla de acetonitrilo (HPLC, Merck): agua (HPLC, Merck) (84 +16) y se purifica mediante una columna multifuncional de limpieza. El extracto purificado se lleva a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno o mediante calentamiento y vacío y se redisuelve en un solvente apropiado. La ZEA es separada de las posibles interferencias en una columna de fase reversa (octadecilsilano o RP-18) usando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia.

La detección de la ZEA se logra mediante un espectrofotómetro de fluorescencia, el cual se acopla a un integrador – graficador para cuantificar la micotoxina utilizando un método de estándar externo.

3.2.3.2.1 Procedimiento General

Extracción. En un erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado o tapa rosca, se mezclaron 25 g de arroz adecuadamente molido con 100 ml de solvente de extracción [CH_3CN (HPLC, Merck): agua (HPLC, Merck)] (84 + 16), se homogenizó la muestra y el solvente durante 3 minutos en una licuadora. Se filtró a través de papel filtro cualitativo (Whatman No. 4, Merck) y se recolectó cerca de 5 ml de filtrado en un tubo de ensayo de 10 ml.

Se adicionaron 40 μl de ácido acético glacial (JT Baker, México D.F., México) y se homogenizó con la ayuda de un agitador de vórtice.

Purificación del extracto. Se insertó lentamente el extremo con el reborde de caucho de la columna de limpieza Micotox 2004 (Micotox, Bogotá, Colombia) en el tubo de ensayo y se presionó hasta obtener cerca de 2,0 ml de extracto purificado en el interior de la columna.

Se homogenizó el extracto purificado al interior de la columna con la ayuda de una pipeta de 1 ml de capacidad y se transfirió exactamente 1,0 ml a un tubo de ensayo limpio.

Se redisolvió el residuo seco con 500 μl de fase móvil.

Condiciones cromatográficas (HPLC). Se filtró a través de una membrana de 0,45 μm (Millipore HVLP 1300, Merck) y se inyectaron 50 μl en el cromatógrafo de líquidos:

Cromatógrafo: Shimadzu Prominence (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Inyector automático: SIL-20A_{HT} (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Bomba cromatográfica: bomba binaria LC -20AB (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Horno cromatográfico: CTO-20_{HT} (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Columna analítica: Merck LiChroCART® 125 – 4 HPLC – Cartridge LiChrospher® 100 RP – 10 (5 μm).

Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables: Fluorescencia (FLD) 20AXL, condiciones de operación: excitación 273 nm, emisión 465 nm, respectivamente (GAIN = 2) (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Sistema de integración: Sistema de integración por programa LC-Solution Shimadzu para el registro y tratamiento de las señales.

Fase móvil: Ácido acético 1 % (JT Baker) MeOH (HPLC, LiChrosolv, Merck) 30:70 (v/v)

Flujo: 0.8 ml/min.

Temperatura: 35 °C.

Precolumna: Merck LiChroCART® 4 – 4 HPLC – Guard column LiChrospher® 100 RP – 18 (5 µm).

Presión: 57 kg/cm² con columna y precolumnas nuevas.

Tiempo de retención aproximado: 5.36 min. (Figura 19).

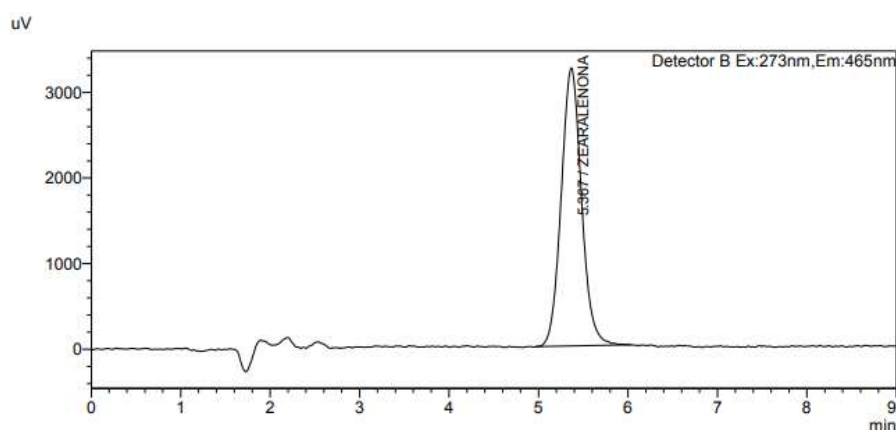


Figura 19. Cromatograma estándar de Zearalenona.

3.2.3.3 Determinación de Desoxivalenol (DON) mediante Cromatografía líquida de alta eficiencia/extracción en fase sólida.

Se utilizó la Norma Técnica Colombiana NTC 5961 (2012-12-12).

Principio. Se extrae el DON con acetonitrilo (HPLC, Merck): agua (HPLC, Merck) (84 +16). El extracto de la muestra se somete a extracción en fase sólida (SPE) para retirar posibles interferencias. Después de evaporar el solvente y de la disolución del residuo en metanol-agua (20:80).

El DON se determina mediante cromatografía líquida de fase reversa con detector UV a una longitud de onda 220 nm.

3.2.3.3.1. Procedimiento General

Extracción. Se pesó una porción de 25 g de arroz molido y se mezcló con 100 ml de solvente de extracción [CH₃CN (HPLC, Merck): agua (HPLC, Merck)] (84 + 16), se homogenizó la muestra y el solvente durante 3 minutos en una licuadora.

Se filtró a través de papel filtro cualitativo (Whatman No. 4, Merck) y se recolectó cerca de 5 ml de filtrado en un tubo de ensayo de 10 ml.

Purificación del extracto. Se insertó lentamente el extremo con el reborde de caucho de la columna de limpieza Micotox 2005 (Micotox, Bogotá, Colombia) en el tubo de ensayo (30 – 40 segundos) y se presionó hasta obtener cerca de 2,5 ml de extracto purificado en el interior de la columna.

Se transfirió exactamente 2,0 ml del extracto purificado a un tubo de ensayo limpio.

Se evaporó el solvente a sequedad mediante calentamiento en baño termostataado y aplicación de vacío (55 °C).

Se redisolvió el residuo seco con 1,0 ml de fase móvil [agua (HPLC, Merck): metanol (HPLC, LiChrosolv, Merck)] (85:15).

Condiciones cromatográficas (HPLC). Se filtró a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore HVLP 1300, Merck) y se inyectaron 50 µl en el cromatógrafo de líquidos:

Cromatógrafo: Shimadzu Prominence (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Inyector automático: SIL-20A_{HT} (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Bomba cromatográfica: bomba binaria LC -20AD (Shimadzu, Canby, OR, USA).

Horno cromatográfico: CTO-20_{HT} (Shimadzu, Canby, OR, U.S.A.).

Columna analítica: Merck LiChroCART® 125 – 4 HPLC – Cartridge LiChrospher® 100 RP – 18 (5 µm).

Detector ultravioleta: SPD –20Av 220 nm.

Sistema de integración: Sistema de integración por programa Clarity para el registro y tratamiento de las señales.

Fase móvil: Agua (HPLC, Merck): metanol (HPLC, LiChrosolv, Merck) (85:5).

Flujo: 0.6 ml/min.

Temperatura: 35 °C.

Precolumna: Merck LiChroCART® 4 – 4 HPLC – Guard column LiChrospher® 100 RP – 18 (5 µm).

Presión: 54 kg/cm² con columna y precolumnas nuevas.

Tiempo de retención aproximado: 9.8 min. (Figura 20).

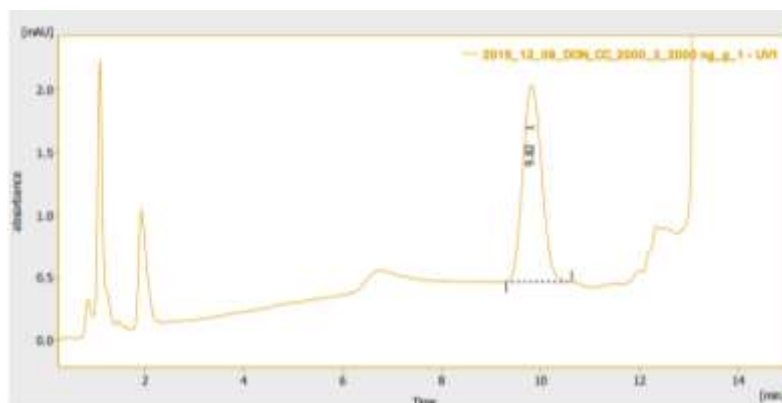


Figura 20. Cromatograma estándar de Desoxinivalenol.

3.2.4 Evaluación de la capacidad toxigénica de los aislamientos de *Aspergillus* spp.

3.2.4.1 Aislamiento de hongos filamentosos

Se realizaron aislamientos direccionados de especies fúngicas productoras de AF a partir de las muestras de arroz en cultivo correspondientes al muestreo del año 2017 y que cuantificaron para AF; los granos de arroz (5 granos) se sembraron en placas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) y Sabouraud Dextrosa (Merck), realizando siembras directas sobre las placas y posteriormente se incubaron a 25 °C por 5 días. A partir del crecimiento se realizaron nuevos repiques en placas de PDA (Oxoid) con el fin de aislar las cepas presentes en cada muestra. Una vez se aislaron axénicamente, se procedió a conservarlas en glicerol al 40 % y se mantuvieron bajo congelación a -30 °C para su posterior uso.

3.2.4.2 Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas

Las cepas obtenidas fueron caracterizadas macroscópicamente y microscópicamente siguiendo las taxonomías y nomenclaturas propuestas por Pitt y Hocking (2009), Visagie *et al.* (2014) y Samson *et al.* (2014), en cuanto a la identificación de hongos de los géneros

Aspergillus y *Penicillium*. Para ello, se sembraron los aislados en los medios de cultivos Agar Extracto de Malta (MEA) (Visagie *et al.*, 2014) y Agar Czapek - Extracto de Levadura (CYA) (Visagie *et al.*, 2014).

La siembra de cada cepa de *Aspergillus* se realizó desde la suspensión con una micropipeta colocando tres gotas en 3 puntos centrales en la superficie del agar de cada medio, simulando un triángulo, para obtener 3 colonias equidistantes. Posteriormente, se llevaron a incubar a 25 °C (MEA), 30 °C y 37 °C (CYA) por 7 días. La identificación microscópica se realizó utilizando el método simple de Riddel (1950), mediante un portaobjetos que permite que los hongos se estudien prácticamente *in situ* con la menor alteración posible. Los microcultivos fueron sembrados en agar MEA e incubados a 25 °C por 5 días. Transcurrido este tiempo, se prepararon los montajes y las estructuras fúngicas fueron teñidas con azul de lactofenol y vistas el microscopio.

3.2.4.3 Análisis cualitativo de la producción de Aflatoxinas

Se realizó un proceso de selección de los aislamientos fúngicos en Agar Leche de Coco (ALC), incubados a 25° C durante 5 días. Posteriormente, el reverso de las colonias en ALC se expuso a longitudes de onda de luz UV (365 nm) en un ambiente oscuro con el fin de detectar las cepas presuntamente toxigénicas (Heenan *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2002; Sepúlveda y Piontelli, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007). Los aislados que produjeron fluorescencia verde - azul característica se registraron como cepas con potencial en la producción de AF. Seguidamente, a las cepas seleccionadas se les realizó una aspersion con amoniaco al 25 % en oscuridad, con el fin de intensificar la fluorescencia. Las cepas que mostraron mayor intensidad de fluorescencia bajo la luz UV de 365 nm se registraron como cepas positivas.

La fluorescencia fue cuantificada mediante el uso de un fluorómetro (*Fluoroskan Ascent, Type: 374, Ref. 5210470*), con el cual se estimó la intensidad de la fluorescencia y de igual manera, se confirmó la presencia de aflatoxinas. Inicialmente, se realizó una curva patrón a partir de una solución estándar de aflatoxinas por HPLC (Aflatoxinas B₁ y G₁: 250 ng/ml, c/u; Aflatoxinas B₂ y G₂: 75 ng/ml, c/u) (Micotox). Se obtuvo la ecuación de la recta y, conjuntamente con los datos experimentales, se calculó la linealidad mediante el coeficiente de determinación (R²). Seguidamente, a partir de las extracciones obtenidas de los hongos

cultivados en ALC mantenidos a 25 °C por 5 días, se realizaron diluciones y se procedió a determinar la intensidad de la fluorescencia.

3.2.4.4 Verificación cuantitativa de la capacidad aflatoxigénica

A partir de cultivos mantenidos a 25 °C por 10 días (Moreno y Gil, 1991) en ALC, y para confirmar la existencia de una correlación entre la fluorescencia y la producción de AF, las placas que exhibieron fluorescencia fueron sometidas a un proceso de extracción tal como se describe en el apartado 3.2.3.1 y posteriormente se procesaron por HPLC con el fin de cuantificar la producción de AF.

3.2.4.5 Identificación Molecular

3.2.4.5.1 Extracción de ADN

Se siguió el método recomendado por Gil *et al.* (2018). En un matraz liso de 250 ml conteniendo 100 ml de medio CM [Extracto de Malta (Difco, Detroit, Michigan), Extracto de Levadura (Difco, Detroit, Michigan), Glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania)] fue inoculado con conidios frescos procedentes de una placa bien esporulada. El matraz se incubó a 28 °C durante 24 horas con agitación de 200 r.p.m. El micelio crecido se recogió por filtración, usando un filtro de nailon Nylal estéril de 30 µm de diámetro de poro. El micelio retenido en el filtro se lavó un par de veces con NaCl 0,9 % (p/v) (Merck). Finalmente, el micelio se secó en papel filtro.

Se tomó 1 g del micelio y se pulverizó en un mortero mediante la adición de N₂ líquido. El polvillo obtenido se recogió en microtubos de 2,0 ml (sin superar el nivel de los 0,5 ml, aproximadamente 100 mg de micelio pulverizado). Al polvillo recolectado se le adicionaron 800 µL de tampón de rotura [Tris-HCl 0,2 M (Merck, Darmstadt, Alemania); EDTA 10 mM (Merck, Darmstadt, Alemania); SDS 1 % (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA); pH 8,2] y 800 µL de fenol neutro (Winkler, Santiago, Chile) pH 7.4 -7.5. Se mezcló fuertemente con vortex y se incubó en un baño de agua a 50 °C durante 30 minutos, agitando a intervalos de 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recolectó la fase acuosa (superior), se le añadió un volumen de solución fenol (Winkler, Santiago, Chile) - cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania) - alcohol isoamílico (Merck, Darmstadt, Alemania) (fenol-CIA, 25:24:1) y se mezcló mediante un vortex. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 6 minutos a 14.000 r.p.m.,

se recolectó nuevamente la fase acuosa, y se repitió de nuevo la adición de fenol-CIA hasta que la solución presentó la interfase libre de impurezas. Luego, para eliminar los restos de fenol, se añadió a la solución un volumen de cloroformo (Merck) -alcohol isoamílico (Merck) (24:1). Se agitó en vortex y se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 13.000 r.p.m.

Consecutivamente, se recuperó la fase acuosa y se añadió 1/10 de volumen de acetato sódico 3M (Merck), pH 5,2, y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (Merck) (preenfriado a -20 °C). Seguidamente, se mezcló por medio de un vortex y se incubó 30 minutos a 80 °C. Posteriormente, la solución se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado se lavó con 0,5 volúmenes de etanol 70 %. Finalmente, el tubo se centrifugó nuevamente a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó nuevamente y se secó el precipitado, el cual fue finalmente resuspendido en agua destilada estéril.

La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con Bromuro de Etidio (Winkler, Santiago, Chile) 0,1 µl/ml. Los geles se corrieron a 80 V durante 40 minutos y se visualizaron en un transiluminador en rango UV.

3.2.4.5.2 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar la región transcritora interna ITS (Internal transcribed spacer) se usó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la secuencia de los partidores se presenta en la Tabla 21. El partidador ITS 1 está ubicado en la región 18s y el ITS 4 en la subunidad 28s del rDNA.

Tabla 21. Secuencia de los iniciadores usados en la amplificación de las regiones ITS para la identificación de los aislamientos

NOMBRE DEL OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5' → 3')
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Se realizó una PCR utilizando la siguiente mezcla de reacción: 12,5 µl de Go Taq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI 53711 U.S.A.) 0,5 µl de cada primer ITS-1 y ITS-4 (10

pmol/μl), 1 μl de ADN, 10,5 μl de agua MiliQ (Universidad Santiago de Chile, Santiago, Chile); el volumen final por reacción fue 25 μl. El programa utilizado para realizar la PCR se muestra en la Tabla 22. Para verificar la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 %. Estos geles fueron revelados con Bromuro de Etidio y luz UV.

Tabla 22. Programa de PCR utilizado para la amplificación del ITS

TEMPERATURA	TIEMPO	ETAPAS
94 °C	5 minutos	Denaturación del DNA
94 °C	1 minuto	Denaturación del DNA
54 °C	45 segundos	<i>Annealing</i>
72 °C	45 segundos	Temperatura de extensión
72 °C	10 minutos	Extensión final
4 °C	Infinito	Final

Posteriormente, los productos de la PCR fueron purificados, para lo que se utilizó el kit GeneJET Gel Extraction (Thermo Scientific TM, Massachusetts, USA), según instrucciones del fabricante que se indican brevemente a continuación:

Los productos de la PCR se depositaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Luego, se añadió el tampón de unión en una relación de 1:1 (volumen/volumen). La solución resultante se transfirió a la columna de purificación Gene JET, y se centrifugó por un minuto a 8600 x g. El eluido se eliminó y se agregó a la columna 100 μl de tampón de unión. Se centrifugó bajo las condiciones ya mencionadas, y el nuevo eluido se descartó. Posteriormente, se añadió 700 μl del tampón de lavado a la columna y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Se descartó nuevamente el eluido y la columna se centrifugó vacía. Finalmente, se cambió la columna de purificación a un tubo Eppendorf nuevo y se añadieron 50 μl del tampón de elución, centrifugándose por un minuto a 8600 x g. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta ser enviado para su secuenciación.

3.2.4.5.3 Identificación en bases de datos

Los productos de PCR purificados se secuenciaron en ambas cadenas (forward y reverse) con el método Didesoxi (Sanger *et al.*, 1977). Las secuencias obtenidas fueron objeto de edición mediante el uso del programa informático BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente, cada una de las secuencias editadas fue objeto de consulta en la base de datos curada MycoBank (Crous, 2004).

3.3 Análisis Estadístico

Para analizar los resultados obtenidos en la investigación, se aplicó la técnica estadística multivariada denominada *Análisis Canónico de Correspondencias* (ACC). Para ello, se empleó el paquete estadístico Canoco for Windows 4.5 (Biometris, Wageningen y Petr Smilauer, České Budějovice, República Checa).

En concordancia con el objetivo de correlacionar la presencia de micotoxinas con algunos parámetros microbiológicos y fisicoquímicos del grano cultivado en las principales zonas arroceras de Colombia, esta técnica estadística consiste fundamentalmente en explicar la asociación existente entre grupos de variables cuantitativas o categóricas. De esta manera se pretende relacionar la abundancia de un conjunto de micotoxinas y algunos microorganismos propios del grano de arroz con una serie de variables fisicoquímicas y las zonas arroceras de Colombia.

El Análisis de Correspondencia Canónica fue introducido por Ter Braak (1986) como un nuevo método multivariante que relaciona comunidades de especies conocidas en una variación ambiental. Se parte de dos grupos de matrices: una primera tabla $Y_{n \times m}$ que contiene la información sobre la abundancia de un conjunto de micotoxinas (aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol) en un conjunto de n lugares (zona Norte, zona Centro, zona Llanos Orientales y zona Nororiental).

Y una segunda matriz $X_{n \times p}$ que contiene información sobre un conjunto de P grupos de microorganismos (Coliformes Totales, *Escherichia coli* y Mohos y Levaduras) en los n lugares. El ACC permite determinar la asociación entre los conjuntos de variables múltiples dependientes e independientes. Es así, como desarrolla varias funciones canónicas que maximizan la correlación entre combinaciones lineales (valores teóricos lineales), que corresponden a conjuntos de variables dependientes e independientes. De otro lado, la correlación canónica no basta con la obtención de una relación simple entre los conjuntos de las variables, si no que se pueden conseguir varias funciones canónicas.

Capítulo IV
Resultados

4. Resultados

4.1 Arroz en cultivo (*paddy*)

4.1.1 Características microbiológicas del arroz en cultivo

4.1.1.1 Muestreo 2017

Al evaluar la presencia de Coliformes Totales (CT) en las muestras procedentes de todo el país, se observó que la incidencia global fue del 50 % en las muestras del sistema seco, mientras que en las procedentes del sistema riego fue cercana al 46 %. En niveles que variaron entre 5,40 - 6,63 log UFC/g en el sistema seco y 5 - 8,64 log UFC/g en el sistema riego. Esta tendencia se verificó a nivel de las zonas productoras encontrando que según (p -valor > 0,05), no existen diferencias significativas. Como ejemplo de lo anterior, se pueden destacar los datos obtenidos en la zona de los Llanos Orientales, en la que la incidencia fue del 50 % sin importar el sistema de cultivo de origen de las muestras (Tabla 23).

En el caso de la detección de *Escherichia coli*, en las muestras del sistema de cultivo por riego se evidenció una contaminación con esta bacteria, en el 8 % de las muestras analizadas. En niveles que oscilaron entre 5,10 - 7,18 log UFC/g. La presencia de *E. coli* se detectó solamente en las muestras procedentes de las zonas Norte y Llanos Orientales, con una incidencia del 13 % en ambos casos. En contraste, ninguna de las muestras correspondientes al sistema seco presentó contaminación por *E. coli*.

La incidencia de mohos (M) y levaduras (L) fue elevada en todo el territorio nacional e independiente del sistema de cultivo, oscilando entre el 96 – 100 %; excepción hecha de la zona Nororiental en la que la incidencia observada fue del 71 % (Tabla 23). Adicionalmente, la población de M y L encontrada en las muestras procedentes del sistema de riego osciló entre 4,40 – 8,52 log UFC/g; mientras que la población detectada en el arroz procedente del sistema seco varió entre 5,40 – 6,48 log UFC/g.

Tabla 23. Resultados de los análisis microbiológicos practicados a las muestras de arroz cultivado en 2017

ZONA ARROCERA	SISTEMA	PARÁMETRO MICROBIOLÓGICO	INCIDENCIA (%)	MEDIA (Log UFC/g)	DESVIACIÓN ESTANDAR
Norte	Riego	Coliformes totales	38	5,49	0,39
		<i>E. coli</i>	13	5,1*	-
		Mohos y levaduras	100	6,82	0,44
	Secano	Coliformes totales	57	6,13	0,44
		<i>E. coli</i>	0	0	0
Centro	Riego	Mohos y levaduras	100	6,03	0,46
		Coliformes totales	44	5,61	1,07
		<i>E. coli</i>	0	0	0
	Secano	Mohos y levaduras	96	6,70	0,59
		Coliformes totales	33	5,40*	-
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	100	6,03	0,34
Llanos Orientales	Riego	Coliformes totales	50	6,22	1,03
		<i>E. coli</i>	13	7,18*	-
		Mohos y levaduras	100	6,32	0,40
	Secano	Coliformes totales	50	6,22	0,32
		<i>E. coli</i>	0	0	0
Nororiental	Riego	Mohos y levaduras	100	6,41	0,24
		Coliformes totales	43	6,58	1,59
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	71	6,06	1,10

* Dato correspondiente a una sola muestra

4.1.1.2 Muestreo 2018

Para el total de las muestras de arroz procedentes del sistema de cultivo riego, se observó que un 13 % de las mismas presentaron contaminación con CT. En concentraciones que variaron entre 5,54 - 8,20 log UFC/g.

La zona con mayor incidencia por este grupo de bacterias fue la zona Nororiental, con un valor del 67 %. Por el contrario, en las zonas de los Llanos Orientales, Centro y Norte se observaron incidencias bajas o nulas (Tabla 24). De otra parte, el 23 % de las muestras procedentes del sistema de cultivo seco estaban contaminadas con CT, con una población entre 5,54 - 7,62 log UFC/g.

En este caso, cabe destacar el hecho de no detectar la presencia de CT en las muestras procedentes de los Llanos Orientales (Tabla 24). Adicionalmente, y en contraste con lo observado en el año 2017, en este muestreo no se detectó la presencia de *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas.

En lo que respecta a la presencia de M y L, el 76 % de las muestras de arroz obtenidas de sistemas de cultivo por riego mostraron presencia de este grupo microbiano. En concentraciones que variaron entre 4,48 - 8,20 log UFC/g. Al revisar las incidencias por zona se observaron valores comprendidos entre 67 y 88 %, siendo la zona Norte la de mayor incidencia (Tabla 24). Por su parte, solo se detectó la presencia de M y L en el 54 % de las muestras de arroz procedentes del sistema seco. Con una población que fluctuó entre 5,48 - 8,20 log UFC/g. Lo anterior, generó una distribución de las incidencias por zonas, en donde se observó una concentración de las muestras positivas en la zona Centro (100 %), mientras que en las zonas de los Llanos Orientales y la zona Norte las incidencias fueron del 50 y 33 %, respectivamente. Las incidencias en estas últimas zonas son menores a las observadas en el año 2017.

Tabla 24. Resultados de los análisis microbiológicos practicados a las muestras de arroz cultivado en 2018

ZONA ARROCERA	SISTEMA	PARÁMETRO MICROBIOLÓGICO	INCIDENCIA (%)	MEDIA (Log UFC/g)	DESVIACIÓN ESTANDAR
Norte	Riego	Coliformes totales	0	0	0
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	88	5,92	1,08
	Secano	Coliformes totales	33	7,50	0,17
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	33	8,20	0
Centro	Riego	Coliformes totales	4	8,20*	-
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	75	5,63	0,32
	Secano	Coliformes totales	33	5,54*	-
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	100	5,60	0,20
Llanos Orientales	Riego	Coliformes totales	14	5,98*	-
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	71	5,80	0,47
	Secano	Coliformes totales	0	0	0
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	50	6,07	0,11
Nororiental	Riego	Coliformes totales	67	6,04	0,87
		<i>E. coli</i>	0	0	0
		Mohos y levaduras	67	6,37	1,24

* Dato correspondiente a una sola muestra

4.1.2 Características fisicoquímicas del arroz en cultivo

4.1.2.1 Muestreo 2017

Las muestras de arroz obtenidas de las diferentes zonas del país presentaron un pH ligeramente ácido (Tabla 25). El pH de las muestras procedentes del sistema riego osciló

entre 5,24 y 7,32. De otro lado, las muestras del sistema seco presentaron un pH entre 5,55 y 7,51. La zona Norte presentó la mayor variación en los datos (p -valor $> 0,05$).

El promedio de la A_w de las muestras de arroz en cultivo varió entre 0,65 y 0,74 (Tabla 25). La A_w determinada en las muestras de arroz procedentes del sistema riego fluctuó entre 0,51 y 0,97. Destacándose la zona Nororiental, por presentar el promedio de A_w más bajo. Por otra parte, las muestras correspondientes al sistema seco presentaron un promedio de A_w entre 0,70 y 0,75.

Tabla 25. Resultados de las variables fisicoquímicas de las muestras de arroz cultivado en 2017

ZONA ARROCERA	SISTEMA	VARIABLE FISICOQUÍMICA	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
Norte	Riego	pH	6,71	0,36
		A_w	0,74	0,09
		Humedad (%)	10,38	6,45
	Secano	pH	6,72	0,73
		A_w	0,70	0,11
		Humedad (%)	9,22	4,23
Centro	Riego	pH	6,75	0,29
		A_w	0,70	0,07
		Humedad (%)	7,48	3,82
	Secano	pH	6,93	0,16
		A_w	0,72	0,03
		Humedad (%)	6,87	0,75
Llanos Orientales	Riego	pH	6,59	0,57
		A_w	0,73	0,09
		Humedad (%)	11,74	2,13
	Secano	pH	7,00	0,21
		A_w	0,75	0,04
		Humedad (%)	10,09	2,44
Nororiental	Riego	pH	6,39	0,11
		A_w	0,65	0,01
		Humedad (%)	11,39	0,27

Las muestras de arroz en cultivo de las diferentes zonas del país presentaron un valor medio de humedad entre 6,87 y 11,74 % (Tabla 25). Las muestras de arroz procedentes del sistema riego evidenciaron un contenido de humedad que se encuentra entre 5,66 - 26,31 %, por otra parte, las del sistema seco presentaron entre el 5,23 y 15,92 % de humedad. En la zona Centro se registraron los valores promedios de humedad del grano de arroz en cultivo más bajos, independientemente del sistema de cultivo empleado.

4.1.1.2 Muestreo 2018

Las diferentes zonas arroceras del país proporcionaron muestras que presentaron valores promedio de pH entre 6,44 y 7,37 (Tabla 26), independientemente del sistema de cultivo

aplicado. No obstante, las muestras del sistema riego mostraron valores de pH entre 6,34 y 7,86. Las del sistema seco 6,33 y 7,38, evidenciándose así, que los valores de pH del grano son más ácidos que los presentados por las muestras del sistema riego.

Por otro lado, en estas muestras se observaron valores medios de Aw entre 0,64 y 0,74. Las muestras del sistema seco presentaron valores de Aw más bajos que las procedentes del sistema riego, con excepción hecha de la zona Centro. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los valores de Aw debidas a los sistemas empleados y a las zonas arroceras (p-valor >0.05).

En cuanto al porcentaje de humedad, las muestras tanto del sistema riego como del seco exhibieron valores promedio entre 8,03 y 10,12 % (Tabla 26). Las muestras correspondientes al sistema riego presentaron una alta variación en los resultados oscilando entre 5,11 y 17,33 %. La zona Centro presentó el valor promedio más bajo (7,78 %), en contraste con las zonas Norte, Llanos Orientales y Nororiental (9,25 %, 9,83 % y 10,12 %, respectivamente). En el caso del sistema seco, se observaron valores promedio más bajos que los evidenciados en el sistema riego, especialmente en las zonas Norte (7,11 %) y Llanos Orientales (8,39 %).

Tabla 26. Resultados de las Variables Físicoquímicas obtenidas en las muestras de arroz cultivado en 2018

ZONA ARROCERA	SISTEMA	VARIABLE FÍSICOQUÍMICA	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
Norte	Riego	pH	6,95	0,43
		Aw	0,72	0,06
		Humedad (%)	9,25	3,68
	Secano	pH	6,75	0,38
		Aw	0,70	0,04
		Humedad (%)	7,11	2,49
Centro	Riego	pH	7,37	0,42
		Aw	0,70	0,09
		Humedad (%)	7,78	2,97
	Secano	pH	6,65	0,18
		Aw	0,73	0,04
		Humedad (%)	8,03	1,61
Llanos Orientales	Riego	pH	6,73	0,27
		Aw	0,72	0,04
		Humedad (%)	9,83	2,35
	Secano	pH	6,44	0,10
		Aw	0,64	0,06
		Humedad (%)	8,39	3,19
Nororiental	Riego	pH	6,68	0,15
		Aw	0,74	0,01
		Humedad (%)	10,12	1,40

4.1.3 Incidencia de Aflatoxinas, Zearalenona y Desoxinivalenol en el arroz en cultivo en Colombia

4.1.3.1 Incidencia de Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) en el arroz en cultivo

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a la incidencia de las aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂) en arroz en cultivo de las diferentes zonas arroceras de Colombia.

Para el año 2017, en las muestras cultivadas por el sistema de riego, se detectó la presencia de AFB₁ y AFB₂ en dos de las cuatro zonas arroceras del país. Las zonas positivas correspondieron a la zona Norte y Llanos Orientales, llamando la atención la elevada incidencia de AFB₁ en la zona Norte (Tabla 27).

Tabla 27. Incidencia de Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) presentes en muestras de arroz cultivado en Colombia – Año 2017

ZONA ARROCERA	SISTEMA	AFLATOXINAS	INCIDENCIA (%)	MEDIA (µg/kg) *	DESVIACIÓN ESTANDAR
Norte	Riego	AFB ₁	63	61,01	735,96
		AFB ₂	25	92,59	47,52
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
	Secano	AFB ₁	57	46,44	45,98
		AFB ₂	43	2,26	3,71
AFG ₁		0	0	0	
AFG ₂		0	0	0	
Centro	Riego	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
	Secano	AFB ₁	67	3,75	3,25
		AFB ₂	33	0,2 **	-
AFG ₁		0	0	0	
AFG ₂		0	0	0	
Llanos Orientales	Riego	AFB ₁	25	2,53	22,56
		AFB ₂	13	1,40**	-
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
	Secano	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
AFG ₁		0	0	0	
AFG ₂		0	0	0	
Nororiental	Riego	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0

* Media de las muestras positivas para Aflatoxinas

** Dato correspondiente a una sola muestra

De otra parte, al analizar las muestras procedentes del sistema seco, se observó que dos de las tres zonas que usan este sistema de cultivo presentaron resultados positivos para la presencia tanto de AFB₁ como de AFB₂. En este caso, las zonas con muestras positivas para estas micotoxinas fueron Norte y Centro, zonas en las que la incidencia de AFB₁ fue particularmente elevada, siendo de 57 y 67 %, respectivamente (Tabla 27).

En el segundo muestreo (2018), para el sistema de cultivo seco, los datos fueron similares a los obtenidos en el 2017, ya que las zonas Norte y Centro mostraron resultados positivos para AFB₁ y AFB₂. Incluso, las incidencias de la zona Centro se mantuvieron para ambas micotoxinas, mientras que en la zona Norte fueron ligeramente menores (Tabla 28). Por el contrario, el arroz procedente del sistema riego mostró una reducción en la incidencia de aflatoxinas, puesto que sólo se observaron muestras con AFB₁ en la zona Norte y con una incidencia menor, si se compara con las del sistema seco.

Tabla 28. Incidencia de Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) presentes en muestras de arroz cultivado en Colombia - Año 2018

ZONA ARROCERA	SISTEMA	AFLATOXINAS	INCIDENCIA (%)	MEDIA (µg/kg) *	DESVIACIÓN ESTANDAR
Norte	Riego	AFB ₁	13	0,9**	-
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
	Secano	AFB ₁	33	1,64	0,21
		AFB ₂	33	0,14	0,07
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
Centro	Riego	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
	Secano	AFB ₁	67	21,17	1,55
		AFB ₂	33	0,1**	-
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
Llanos Orientales	Riego	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
	Secano	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0
Nororiental	Riego	AFB ₁	0	0	0
		AFB ₂	0	0	0
		AFG ₁	0	0	0
		AFG ₂	0	0	0

*Media de las muestras positivas para Aflatoxinas

** Dato correspondiente a una sola muestra

En ninguno de los dos muestreos (2017 y 2018) se detectó la presencia de AFG₁ y AFG₂ en las muestras analizadas.

4.1.3.2 Incidencia de Aflatoxinas Totales, Zearalenona y Desoxinivalenol en el arroz en cultivo

De los resultados del primer muestreo (año 2017) se destaca que, de las micotoxinas evaluadas, sólo se encontraron muestras positivas para aflatoxinas (AF) y zearalenona (ZEA). En las muestras procedentes del sistema riego, se encontró que las zonas Norte y Llanos Orientales mostraron presencia tanto de AF como de ZEA, destacando la elevada incidencia de AF en la zona Norte, tal y como ya se había comentado en la sección 4.1.3.1. Este resultado adquiere relevancia en tanto que el 60 % de las muestras positivas superaron el umbral permitido por la norma (10.0 µg/kg para AF) (Tabla 29). Las muestras correspondientes a la zona Nororiental no presentaron micotoxinas, resultado similar al observado en la zona Centro, aunque con una ligera incidencia de ZEA (Tabla 29).

Tabla 29. Incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona (ZEA) y Desoxinivalenol (DON) en el arroz cultivado en Colombia – Año 2017

SISTEMA	ZONA ARROCERA	MICOTOXINA	INCIDENCIA (%)	> LMP (%)	MEDIA (µg/kg)*	DESVIACIÓN ESTANDAR	VALOR MÁXIMO (µg/kg)
RIEGO	NORTE	AF	63	60	63,15	794,53	1834,1
		ZEA	25	-	1113,49	1473,61	2567,0
		DON	0	-	0	0	0
	CENTRO	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	4	-	53,5**	-	53,5
		DON	0	-	0	0	0
	LLANOS ORIENTALES	AF	25	50	2,59	23,62	33,6
		ZEA	38	-	1426,71	245,50	1719
		DON	0	-	0	0	0
	NORORIENTAL	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	0	-	0	0	0
		DON	0	-	0	0	0
SECANO	NORTE	AF	57	75	48,22	49,44	119,5
		ZEA	0	-	0	0	0
		DON	0	-	0	0	0
	CENTRO	AF	67	0	3,81	3,39	6,9
		ZEA	33	-	271,9**	-	271,9
		DON	0	-	0	0	0
	LLANOS ORIENTALES	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	0	-	0	0	0
		DON	0	-	0	0	0

AF: Aflatoxinas, ZEA: Zearalenona, DON: Desoxinivalenol.

>LMP: Porcentaje de muestras positivas que superan el límite máximo permitido por la normativa vigente.

*Media de las muestras positivas para las micotoxinas.

** Dato correspondiente a una sola muestra

Por su parte, en las zonas cultivadas por el sistema seco, también se observaron resultados disímiles entre sí. Mientras que las muestras procedentes de los Llanos Orientales estaban

libres de cualquiera de las micotoxinas evaluadas, las procedentes de la zona Centro contenían AF y ZEA, con una incidencia elevada en el caso de AF (Tabla 29). En la zona Norte, sólo se detectó la presencia de AF, observándose una importante incidencia (57 %). En este caso, de manera similar a los resultados de las muestras del sistema riego de la misma zona, este resultado reviste importancia, puesto que el 75 % de las muestras positivas superaron el límite máximo permitido por la norma (Tabla 29).

Para el año 2018, las incidencias de las micotoxinas estudiadas en el arroz cultivado por el sistema riego mostraron variaciones en relación con lo observado en el año 2017. Las zonas Centro y Llanos Orientales tuvieron resultados similares, ya que no hubo incidencia de AF y, en contraste, se detectaron ZEA y Desoxinivalenol (DON), siempre con una mayor incidencia de ZEA. Cabe destacar que, de todas las muestras analizadas, en estas zonas se presentan las únicas muestras que contenían DON, una de ellas con 5858 µg/kg (Tabla 30).

Tabla 30. Incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona (ZEA) y Desoxinivalenol (DON) en el arroz cultivado en Colombia – Año 2018

SISTEMA	ZONA ARROCERA	MICOTOXINA	INCIDENCIA (%)	> LMP (%)	MEDIA* (µg/kg)	DESVIACIÓN ESTANDAR	NIVEL MÁXIMO (µg/kg)
RIEGO	NORTE	AF	13	0	0,9**	-	0,9
		ZEA	38	-	702,51	227,91	901,0
		DON	0	-	0	0	0
	CENTRO	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	21	-	743,71	2108,79	5187,00
		DON	8	-	944,64	103,94	1021,00
	LLANOS ORIENTALES	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	43	-	738,33	422,56	1286,00
		DON	14	-	5858,00**	-	5858,00
	NORORIENTAL	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	50	-	200,16	209,27	490,00
		DON	0	-	0	0	0
SECANO	NORTE	AF	33	0	1,79	0,28	2
		ZEA	17	-	67**	-	67
		DON	0	-	0	0	0
	CENTRO	AF	67	100,00	21,22	1,63	22,40
		ZEA	0	-	0	0	0
		DON	0	-	0	0	0
	LLANOS ORIENTALES	AF	0	0	0	0	0
		ZEA	25	-	239,00**	-	239,00
		DON	0	-	0	0	0

AF: Aflatoxinas, ZEA: Zearalenona, DON: Desoxinivalenol.

>LMP: Porcentaje de muestras positivas que superan el límite máximo permitido por la normativa vigente.

*Media de las muestras positivas para las micotoxinas.

** Dato correspondiente a una sola muestra

Adicionalmente, como algo llamativo, en la zona Nororiental se observó la mayor incidencia de ZEA en todas las zonas productoras del país (50 %). Por su parte, la zona Norte también

mostró una significativa incidencia de ZEA, por lo que esta micotoxina estuvo presente en todas las zonas arroceras del país que usaron el sistema riego. Finalmente, mencionar que se detectaron AF sólo en muestras procedentes de esta zona.

En cuanto a las muestras del sistema de cultivo seco, en la zona de los Llanos Orientales sólo se detectó ZEA con una incidencia del 25 %. En la zona Norte se observaron incidencias tanto de AF como de ZEA, siendo las AF las de mayor frecuencia. El resultado más destacado se observó en la zona Centro, donde la incidencia de AF fue elevada (67 %) y en la que el 100 % de las muestras positivas superaron lo establecido en la norma (Tabla 28).

4.2 Arroz comercial

Las muestras de arroz comercial fueron obtenidas a partir de establecimientos comerciales durante el año 2018, por lo tanto, deben corresponder al arroz cultivado en el 2017. Se mantienen las mismas zonas (Norte, Centro, Llanos Orientales y Nororiental) como centros de distribución.

4.2.1 Características microbiológicas del arroz comercializado en Colombia

Las muestras de arroz comercial obtenidas de molinos ubicados en las diferentes zonas arroceras del país fueron analizadas atendiendo a los parámetros microbiológicos, tales como: Coliformes Totales, *Escherichia coli* y Mohos y Levaduras.

La presencia de M y L se evidenció en las muestras de arroz comercial procedentes de todas las zonas del país, con una incidencia del 63 %, en niveles que variaron entre 5,30 - 6,18 log UFC/g. Las zonas Norte y Centro presentaron una incidencia del 50 %, mientras que las zonas Llanos Orientales y Nororiental del 75 % (Tabla 31). Sin embargo, ninguna de las muestras presentó contaminación con Coliformes Totales y tampoco con *E. coli*.

Tabla 31. Resultados de los análisis microbiológicos practicados a las muestras de arroz comercial.

ZONA	RAZÓN SOCIAL	PARÁMETRO MICROBIOLÓGICO	INCIDENCIA (%)	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
NORTE	1	Coliformes Totales	0	0	0
	2	<i>E. coli</i>	0	0	0
	3	Mohos y Levaduras	50	5,39	0,13
	4				
CENTRO	5	Coliformes Totales	0	0	0
	6	<i>E. coli</i>	0	0	0

	7	Mohos y Levaduras	50	6,13	0,07
	8				
LLANOS ORIENTALES	9	Coliformes Totales	0	0	0
	10	<i>E. coli</i>	0	0	0
	11	Mohos y Levaduras	75	5,93	0,19
	12				
NORORIENTAL	13	Coliformes Totales	0	0	0
	14	<i>E. coli</i>	0	0	0
	15	Mohos y Levaduras	75	5,60	0,27
	16				

4.2.3 Características fisicoquímicas del arroz comercializado en Colombia

El arroz comercial procedente de las diferentes zonas del país mostró valores medios de pH entre 7,26 y 7,65. Los valores medios de Aw variaron entre 0,68 y 0,73. De otro lado, presentaron un contenido de humedad con valores promedios entre 8,40 y 10,73 % (Tabla 32).

Tabla 32. Resultados de las variables fisicoquímicas del arroz comercial

ZONA	RAZÓN SOCIAL	VARIABLE FISICOQUÍMICA	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
NORTE	1	pH	7,38	0,80
	2	Aw	0,73	0,05
	3	Humedad (%)	9,71	1,08
	4			
CENTRO	5	pH	7,26	0,74
	6	Aw	0,71	0,02
	7	Humedad (%)	10,59	1,14
	8			
LLANOS ORIENTALES	9	pH	7,30	0,86
	10	Aw	0,72	0,04
	11	Humedad (%)	10,73	0,94
	12			
NORORIENTAL	13	pH	7,65	0,14
	14	Aw	0,68	0,01
	15	Humedad (%)	8,40	1,02
	16			

4.2.4 Incidencia de micotoxinas en el arroz comercializado en Colombia

En todas las zonas arroceras del país se evidenció presencia de AF, la zona de los Llanos Orientales presentó la incidencia más alta (75 %), mientras que las zonas Centro y Nororiental mostraron incidencias del (50 %), destacándose que todas las muestras positivas en estas zonas superaron el límite máximo estipulado en la legislación vigente. Adicionalmente, la zona Norte presentó una incidencia del 25 % (Tabla 33). De otro lado, en la zona Nororiental se detectó DON en las muestras de arroz comercial con una incidencia

del 25 %. Finalmente, en ninguna de las zonas arroceras se evidenció ZEA en el arroz comercial.

Tabla 33. Incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona (ZEA) y Desoxinivalenol (DON) en el arroz comercializado en Colombia.

ZONA	RAZÓN SOCIAL	INCIDENCIA AF (%)	> LMP* (%)	INCIDENCIA ZEA (%)	INCIDENCIA DON (%)
Norte	1	25	0	0	0
	2				
	3				
	4				
Centro	5	50	100	0	0
	6				
	7				
	8				
Llanos Orientales	9	75	33	0	0
	10				
	11				
	12				
Nororiental	13	50	100	0	25
	14				
	15				
	16				

AF: Aflatoxinas, ZEA: Zearalenona, DON: Desoxinivalenol.

>LMP: Porcentaje de muestras positivas que superan el límite máximo permitido por la normativa vigente.

* Resolución del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia No. 2671 de 2014 y Reglamento (UE) No. 165/2010.

4.3 Evaluación de la capacidad toxigénica de los aislamientos de *Aspergillus spp.*

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de las muestras de arroz en cultivo mostraron que las micotoxinas detectadas con mayor frecuencia fueron las aflatoxinas, especialmente en el muestreo correspondiente al año 2017. De otra parte, este grupo de micotoxinas fue el de mayor relevancia, desde el punto de vista de seguridad alimentaria en las muestras de arroz comercial; independientemente de la zona de distribución, como se comentó en la sección 4.2.3. En consecuencia, con lo anterior, y con el fin de dilucidar si existe una relación entre la población fúngica asociada a las muestras y la presencia de aflatoxinas en las mismas, se procedió a verificar el potencial aflatoxigénico de los aislamientos fúngicos pertenecientes al género *Aspergillus*, obtenidos a partir del arroz.

A partir de las muestras de arroz en cultivo correspondientes al muestreo del año 2017 que cuantificaron para AF, se practicaron procedimientos para el aislamiento de hongos filamentosos (sección 3.2.4.1), obteniendo un total de 84 aislamientos. Estos aislamientos

fueron caracterizados morfológicamente, a nivel macro y microscópico en Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar Czapek - Extracto de Levadura (CYA) (Figura 21), según las claves e indicaciones de Pitt & Hocking (2009), Visagie *et al.* (2014) y Samson *et al.* (2014). En consecuencia, se pudo establecer que las cepas aisladas pertenecieron principalmente a los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp (Figura 22).

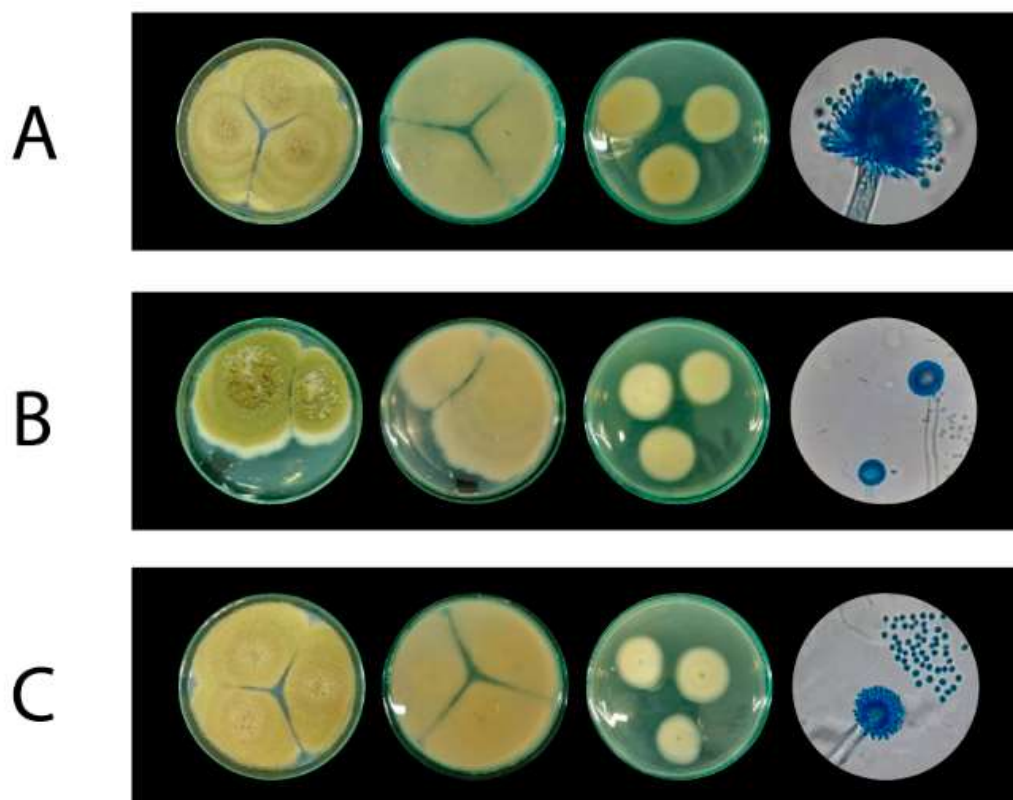


Figura 21. Caracterización macroscópica y microscópica de *A. flavus*.

A. Aislamiento (C – 3) de *A. flavus*. De izquierda a derecha: características macroscópicas, anverso - reverso en CYA a 30 °C por 7 días; MEA a 25 °C por 7 días; microscopía óptica 100x **B.** Aislamiento (C- 7) *A. flavus*. De izquierda a derecha: características macroscópicas, anverso - reverso en CYA a 30 °C por 7 días; MEA a 25 °C por 7 días; microscopía óptica 10x **C.** Aislamiento (C – 16) *A. flavus*. De izquierda a derecha: características macroscópicas, anverso - reverso en CYA a 30 °C por 7 días; MEA a 25 °C por 7 días; microscopía óptica 10x.

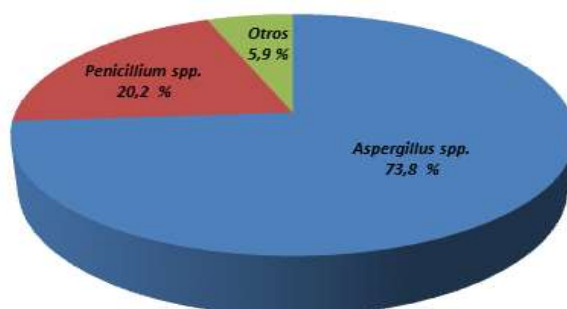


Figura 22. Distribución de las cepas fúngicas obtenidas a partir de las muestras de arroz durante el 2017

4.4 Análisis cualitativo de la producción de Aflatoxinas

De los 62 aislamientos identificados como *Aspergillus*, 19 fueron cultivados en el Agar Leche de Coco (ALC) para determinar su capacidad aflatoxigénica, mediante la presencia o no de fluorescencia azul al ser expuestas a la luz UV de 365 nm. Como control negativo se utilizó una cepa comercial no aflatoxigénica de *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

La detección de la fluorescencia fue optimizada por la adición de una solución de amoníaco al 25 % como se aprecia en la Figura 23. La fluorescencia fue cuantificada mediante el uso de un fluorómetro, con el cual se estimó la intensidad de la fluorescencia y de igual manera, se confirmó la presencia de aflatoxinas. Los aislados que evidenciaron mayor intensidad de fluorescencia fueron aquellos que produjeron concentraciones mayores a 200 µg/kg de aflatoxinas.



Figura 23. Resultados de la producción de Aflatoxinas por la cepa *A. flavus* en agar leche de coco y fluorescencia emitida por exposición UV 365nm

A. Control negativo (*A. brasiliensis*), la cual no exhibe fluorescencia. **B.** Fluorescencia emitida por la cepa aflatoxigénica *A. flavus* observada al quinto día de incubación a 25 °C en el medio ALC. **C.** Placa con fluorescencia emitida por la misma cepa observada al quinto día de incubación a 25 °C en el medio ALC adicionado con solución de amoníaco al 25 %.

Del total de los 19 aislamientos ensayados, se detectó la presencia de la micotoxina en 10 de ellos (Tabla 34). El 30 % de los aislamientos presentaron fluorescencia débil, el mismo porcentaje presentaron fluorescencia media y el 40 % evidenciaron fluorescencia fuerte. Los aislamientos presentaron fluorescencia azul, indicativo de la presencia de AFB₁ y AFB₂ producidas especialmente por *Aspergillus flavus*.

4.4.1 Verificación cuantitativa de la capacidad aflatoxigénica

Con el fin de verificar los resultados descritos en el apartado anterior, los mismos 19 aislados fueron sometidos al protocolo descrito en la sección (3.2.3.1), en el que se realizó una extracción y posterior cuantificación por HPLC para determinar la producción de aflatoxinas

(Tabla 34). El 89,47 % de los aislados presentó cuantificación de aflatoxinas. En este sentido, las cepas mostraron concentraciones de AF que varían entre 0,0011 mg/kg – 303,25 mg/kg. Se destaca la producción de AFB₁ y AFB₂. Ninguna de las cepas evidenció presencia de AFG₁ y AFG₂.

Tabla 34. Verificación de la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos.

Cepa No.	GÉNERO Y ESPECIE	FLUORESCENCIA	INTENSIDAD DE LA FLUORESCENCIA	CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS (µg/Kg)				
				AFB ₁ *	AFB ₂ *	AFG ₁ *	AFG ₂ *	AF-T *
1	<i>A. flavus</i>	+	172,09	2850,5	52,1	N.D	N.D	2902,6
2	<i>A. flavus</i>	-	N.D	33,0	0,7	N.D	N.D	33,7
3	<i>A. flavus</i>	+++	323,11	300050,0	3200,0	N.D	N.D	303250,0
4	<i>A. caelatus</i>	-	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
5	<i>A. flavus</i>	+	165,80	470,5	38,3	N.D	N.D	508,8
6	<i>A. flavus</i>	++	183,00	18150,3	1266,3	N.D	N.D	19416,6
7	<i>A. flavus</i>	+++	258,42	41289,8	2506,1	N.D	N.D	43795,9
8	<i>A. flavus</i>	+++	218,22	25568,4	1304,7	N.D	N.D	26873,1
9	<i>A. flavus</i>	+++	285,40	90490,0	1385	N.D	N.D	91875,0
10	<i>A. flavus</i>	+	55,70	191,5	15,7	N.D	N.D	207,2
11	<i>A. flavus</i>	-	N.D	166,9	12,1	N.D	N.D	179
12	<i>A. flavus</i>	-	N.D	10,3	N.D	N.D	N.D	10,3
13	<i>A. flavus</i>	-	N.D	1,1	N.D	N.D	N.D	1,1
14	<i>A. flavus</i>	-	N.D	105,1	0,9	N.D	N.D	106,0
15	<i>A. flavus</i>	-	N.D	26,2	0,2	N.D	N.D	26,4
16	<i>A. flavus</i>	++	180,97	18971,5	341,1	N.D	N.D	19312,6
17	<i>A. flavus</i>	++	201,13	22888,9	272,4	N.D	N.D	23161,3
18	<i>A. flavus</i>	-	N.D	113,3	6,8	N.D	N.D	120,1
19	<i>A. niger</i>	-	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
N.A	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

+++; Fluorescencia fuerte, ++; fluorescencia media, +; fluorescencia débil, -: No fluorescencia, ND: No detectable.

* Cuantificación por HPLC

4.5 Identificación Molecular

Las cepas cuya capacidad aflatoxigénica fue evaluada, fueron sometidas a un proceso de extracción de su ADN, con el fin de hacer una identificación molecular usando como marcador molecular las regiones ITS de la agrupación génica que transcribe los RNArribosomales. Para lo anterior, se usó una pareja de oligonucleótidos universales (Tabla 21) en una reacción de PCR que amplificó un fragmento de aproximadamente 560-580 pb que contiene las regiones: ITS1, 5.8S e ITS2 (Figura 24). Tales fragmentos fueron purificados y secuenciados.

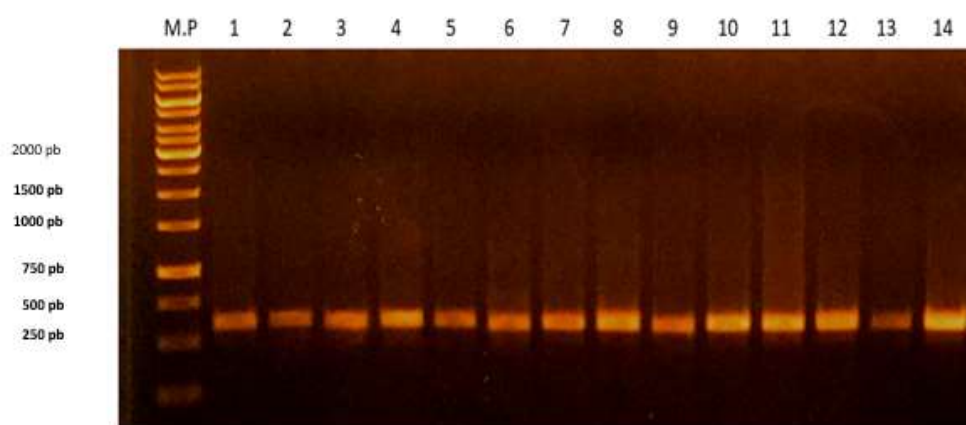


Figura 24. Electroforesis en gel de los amplicones usados para la identificación molecular. Se muestra la corrida electroforética de la región ITS de 14 aislados. Se indica el tamaño de las bandas de interés del marcador de peso molecular.

Las secuencias fueron analizadas bioinformáticamente cruzando la información depositada en tres bases de datos: GenBank, Mycobank y CBS-KNAW. Los resultados finales de la identificación se relacionan en la (Tabla 34). En resumen, de los 19 aislados del género *Aspergillus* que fueron identificados, 17 correspondieron a *A. flavus*, 1 a *A. niger* y 1 a *A. caelatus*. De hecho, todas las cepas con capacidad aflatoxigénica fueron identificadas como *A. flavus* (Tabla 34).

Capítulo V
Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1 Arroz en cultivo (*Paddy*) 2017 – 2018

A lo largo del ciclo biológico, el arroz requiere un alto volumen de agua, siendo el único cereal que se cultiva en suelos saturados de agua durante una parte o la totalidad del periodo vegetativo, por tal razón, el suministro adecuado de agua es el factor más importante en la producción (Chatel *et al.*, 2010). No obstante, hay áreas de cultivo donde el desarrollo del grano depende, en gran medida, de la lluvia durante el ciclo; en estas condiciones, las plantas pueden experimentar periodos de estrés hídrico, además del causado por otros factores bióticos y abióticos que reducen de manera considerable el rendimiento y de igual forma la calidad del grano (Miranda *et al.*, 2016).

Por lo anterior, es preciso considerar que la calidad e inocuidad del arroz cultivado, ya sea por el sistema riego o secano, están influenciadas por factores como son: las condiciones de riego, condiciones climáticas (inundaciones y fuertes lluvias en el momento de la cosecha), almacenamiento inadecuado y altos niveles de humedad que conllevan a que el grano de arroz sea susceptible a contaminarse con bacterias, hongos y por consiguiente con micotoxinas.

5.1.1 Características microbiológicas

5.1.1.1 Coliformes Totales (CT) y *Escherichia coli*

En las muestras obtenidas en el 2017, se evidenció la presencia de CT en el grano procedente de todas las zonas arroceras y, de igual manera, en los dos sistemas de cultivo que se usan en el país, como se aprecia en la Figura 25. La incidencia de CT osciló entre 33 y 57 %. En contraste, para el 2018 se observó una disminución significativa (p -valor $< 0,05$) en la incidencia de CT en el grano colectado de todas las zonas, excepto en la Nororiental (Figura 25).

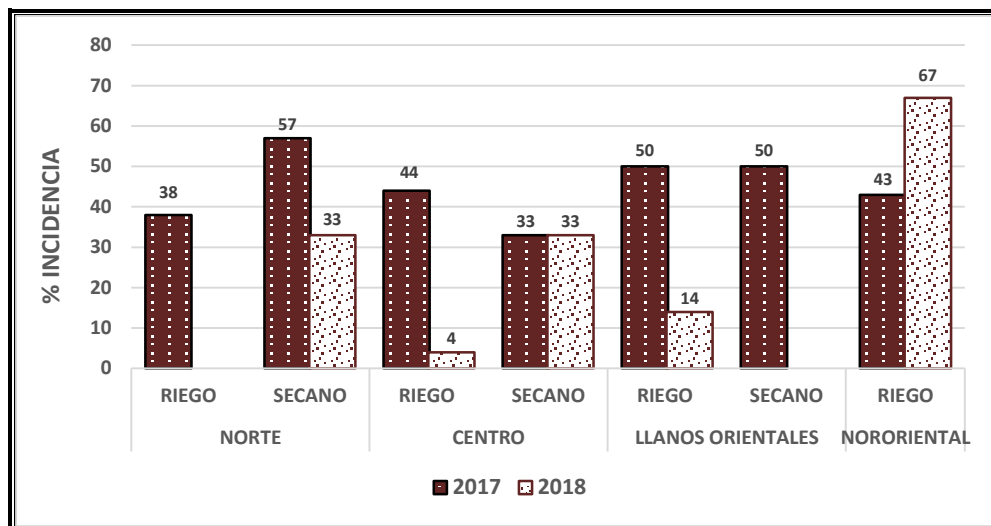


Figura 25. Incidencia de Coliformes Totales en arroz en cultivo 2017 – 2018

En el caso del sistema de cultivo por riego, se observó un cambio drástico ya que la incidencia pasó de unos valores entre 38 y 50 % a valores entre 0 y 14%. Esta diferencia, en gran medida, puede atribuirse a la calidad del agua usada para el riego por parte de los agricultores, ya que diferentes investigaciones han establecido la presencia de CT en el recurso hídrico, los cuales ingresan al agua a partir de una gran variedad de fuentes como son las operaciones de ganado, fauna, escorrentías de tierras rurales y urbanas, actividades agrícolas, entre otras (Pachepsky *et al.*, 2011; Holvoet *et al.*, 2014; Lukubye & Andama, 2017). En Colombia se ha estimado que los ríos pertenecientes al Sistema de Parques Naturales (SPNN) suministran agua a 207.089 hectáreas por riego; los beneficios del agua de riego abastecido por el SPNN representan casi 200 dólares por ha de arroz (Carriazo *et al.*, 2003). La calidad del agua en estas fuentes naturales es regulada por la presencia de vegetación, microorganismos y por el mismo suelo. De igual manera, los flujos intertemporales de agua son también mediados por la cobertura vegetal y por la presencia de ecosistemas naturales (bosques, páramos y humedales principalmente) (Uribe, 2015).

Adicionalmente, resulta interesante observar que, salvo en la zona Centro, esta disminución también se registró en el sistema de cultivo de secano, siendo especialmente drásticos los resultados de la zona de los Llanos Orientales. Estos resultados nos sugieren que las condiciones climáticas pueden tener un peso específico importante afectando la presencia de este tipo de poblaciones bacterianas en el grano de arroz. En este caso, se debe tener en cuenta que, durante el año 2017 en Colombia, se registraron temperaturas elevadas acompañadas de un gran número de precipitaciones, circunstancias que favorecieron la

presencia de CT en el agua. Por el contrario, en el 2018, y especialmente durante el primer semestre, se observaron climas secos, con escasas precipitaciones, condición que afectó negativamente la incidencia de este grupo bacteriano.

De otra parte, ninguna de las muestras procedentes del sistema seco, ya fueran del 2017 o del 2018, presentó contaminación con *E. coli*. Esta bacteria sólo fue determinada en muestras de arroz procedentes del sistema riego en el año 2017, específicamente de las zonas Norte y Llanos Orientales (Tabla 23). Así las cosas, y teniendo en cuenta el uso generalizado de *E. coli* como indicador de contaminación fecal, su presencia nos sugiere una deficiente calidad del agua usada para el riego del cultivo. De esta manera, la presencia de esta bacteria puede atribuirse a prácticas locales que tienen que ver con el origen y uso del agua de riego, las cuales pueden variar de un año a otro. Diversos estudios proporcionan evidencias de la presencia de *E. coli* en las aguas de riego y en los productos cultivados, demostrando ser un factor de riesgo importante con respecto a la contaminación bacteriana de estos productos (Holvoet *et al.*, 2014; Pachepsky *et al.*, 2014; Corrales *et al.*, 2017; Weller, 2020). Adicionalmente, los procesos de lluvia y escorrentía pueden facilitar la movilización, transferencia y aporte de contaminantes desde el suelo hasta las aguas receptoras (VanWormer *et al.*, 2016).

Tomando en consideración lo anterior, resulta estratégico en el proceso de obtención de arroz identificar las variaciones de los sistemas productivos con el fin de relacionarlos con aspectos como la calidad y cantidad de fuentes hídricas, debido a la diversidad climática colombiana, la ubicación intertropical y ecuatorial, y la variabilidad de los pisos térmicos.

5.1.1.3 Mohos y Levaduras (M y L)

Los hongos son los principales microorganismos encontrados en los granos y constituyen la más importante causa de pérdidas y deterioro durante el almacenamiento (Abadía & Bartosik, 2013). Además, son los responsables por el aumento de la respiración de los granos húmedos (Hernández, 2006; Hack, 2008). Generalmente, los hongos que atacan los granos se dividen en dos grupos: hongos de campo y hongos de almacenamiento. Los primeros incluyen a los hongos que invaden y producen las toxinas antes de la propia cosecha, y los segundos corresponden a los que pueden estar presentes en los cultivos, pero la producción de toxinas es posterior a la cosecha (Miller, 1995).

Durante el 2017, este grupo de microorganismos, mostró una alta incidencia (entre el 96 y 100 %) en los dos sistemas de cultivo y en todas las zonas muestreadas, como se evidencia en la Figura 26, a excepción hecha de la zona Nororiental, en la que la incidencia fue de 71 % (sistema riego). Como se puede apreciar, la presencia de hongos en el grano en cultivo fue muy elevada en todo el país. Por su parte, en el año 2018 se apreció una disminución generalizada en la incidencia de hongos en todas las zonas arroceras. Como ejemplo de ello, podemos citar el caso de la zona de los Llanos Orientales en donde la incidencia pasó del 100 al 71 % para el grano sembrado mediante riego, y al 50 % para el sistema seco (Figura 26).

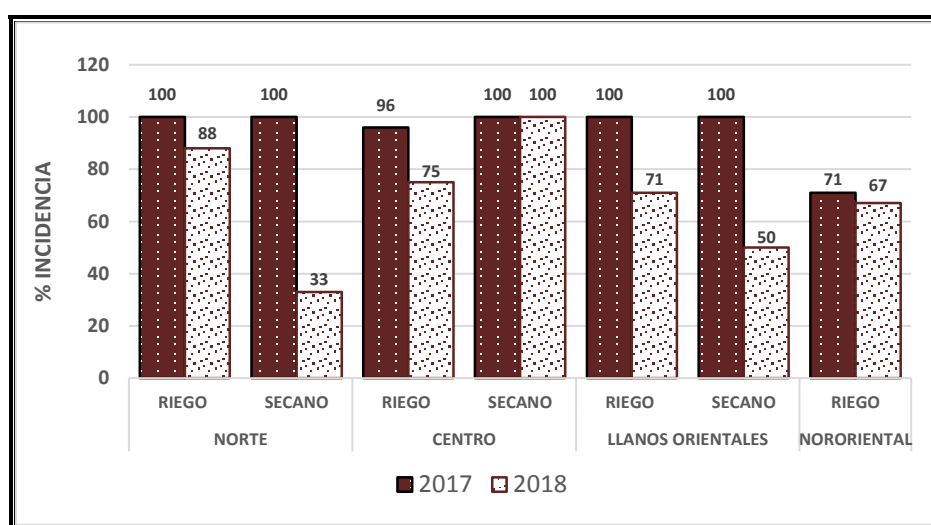


Figura 26. Incidencia de Mohos y Levaduras en arroz en cultivo 2017 – 2018

Nuevamente, se resalta el comportamiento que refleja la zona Centro, en las muestras procedentes del sistema seco, puesto que tampoco se observa deducción en la incidencia de M y L.

Es bien sabido que el cambio climático tiene consecuencias significativas sobre la producción y rendimiento de los cultivos de arroz, ya que afecta directamente su fenología (Zhang & Tao, 2013). En Colombia, durante el 2017 se registraron pérdidas equivalentes a 10.202 ha sembradas de arroz de un total de 595.374 ha sembradas, la causa principal reconocida fue por inundación, con 9.138 ha. Por su parte en el 2018, se perdieron 1.271 ha de un total de 500.924 ha sembradas, siendo la sequía (818 ha) la principal causa de pérdida de área sembrada (DANE – Fedearroz – ENAM, 2017, 2018).

De acuerdo con los datos climatológicos, los primeros meses del año 2018 correspondieron a un periodo de bajas precipitaciones y de elevadas temperaturas en gran parte del país. Tomando en consideración lo anterior, se observó que la incidencia de M y L estuvo asociada a las particularidades climáticas del territorio en estudio, apreciándose una disminución de la misma en periodos secos. Este fenómeno se corroboró en territorios como la zona Norte, cuyas características de baja precipitación (0 – 250 mm) y de temperatura media del aire (27 – 34 °C), se asociaron a una clara disminución de la incidencia de M y L (Figura 26).

5.1.2 Características fisicoquímicas

Las condiciones ambientales que favorecen la contaminación fúngica y la biosíntesis de las micotoxinas, tanto en el campo como durante el almacenamiento de los productos agroalimentarios, juegan papel primordial, ya que su producción está influenciada en gran parte por factores ambientales, entre los que se encuentran la actividad de agua, la temperatura, el pH y el contenido de humedad. No obstante, el crecimiento fúngico y biosíntesis de proteínas son el resultado de la interacción de los factores antes mencionados, el estudio del comportamiento de cada factor es esencial para la comprensión del proceso global.

5.1.2.1 pH

El pH es otra condición extracelular a la que reaccionan los organismos fúngicos y que modula fuertemente la producción de metabolitos secundarios (Selvig & Alspaugh, 2011) (Luo *et al.*, 2017).

Se determinaron los valores promedios de pH de las muestras de grano procedentes del sistema riego durante el 2017, los cuales oscilaron entre 6,39 y 6,75 (Figura 27). Siendo las muestras procedentes de la zona Centro las que evidenciaron el valor promedio más alto. Las muestras procedentes del sistema seco presentaron valores medios de pH entre 6,72 y 7,00, siendo la zona de los Llanos Orientales la que mostró el valor promedio más alto de pH. Las muestras obtenidas en este año, independientemente del sistema de cultivo aplicado, evidenciaron valores de pH cercanos a la neutralidad, siendo en su gran mayoría acordes a los valores óptimos (6,0 – 6,6) para el arroz, ya que en este rango permite la liberación microbiana de nitrógeno y fósforo de la materia orgánica.

En el año 2018, las muestras procedentes del sistema riego presentaron valores promedio de pH entre 6,68 y 7,37, y las del sistema seco entre 6,44 y 6,75.

Tal y como se observa en la Figura 27, mientras que el pH del arroz producido por el sistema seco no mostró variaciones significativas de un año a otro, en el año 2018 se detectó en todo el país una ligera alcalinización (p-valor < 0.05) del grano cuando el sistema de producción fue el riego. Lo anterior, es consecuencia de los procesos de inundación a los cuales es sometida la planta de arroz, por lo que en ésta se ve beneficiada la absorción de nutrientes, aumentando la disponibilidad de fósforo liberado por el hierro, aluminio, magnesio y calcio (Lasso, 1991).

En este año, las muestras mostraron valores de pH ligeramente más altos, excepción hecha en las procedentes del sistema seco de las zonas Centro y Llanos Orientales.

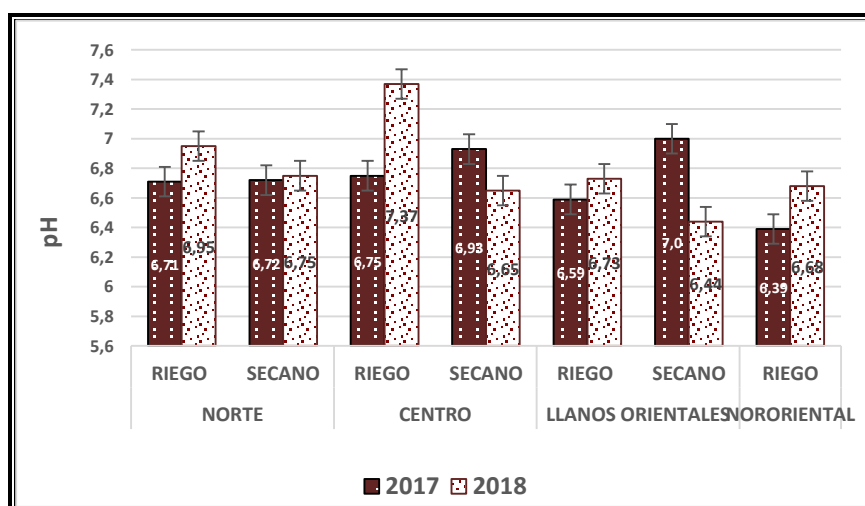


Figura 27. pH del arroz en cultivo 2017 – 2018

5.1.2.2. Actividad de Agua - Aw -

La actividad de agua tiene un impacto significativo en el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas. La disponibilidad de agua para el hongo determina tanto la posibilidad de germinación de las esporas, como la rapidez de la misma, la tasa respiratoria y la velocidad de crecimiento. De todos los microorganismos que pueden colonizar diferentes granos, los hongos son los más capaces de crecer cuando la disponibilidad de agua es baja y en consecuencia son los principales responsables del deterioro de los mismos (Lacey & Magan, 1991).

Los valores promedio de las muestras tomadas del sistema riego en el 2017 oscilaron entre 0,65 y 0,74 de Aw (Figura 28). Siendo la zona Nororiental la que evidenció el promedio de Aw más bajo (0,65). Las muestras del sistema seco, presentaron valores promedio entre 0,70 y 0,75 de Aw.

Las muestras obtenidas del sistema riego durante el 2018 presentaron valores medios de Aw entre 0,70 y 0,74, siendo la zona Nororiental la que mostró el valor promedio más alto 0.74 de Aw. Las del sistema seco mostraron valores de Aw de entre 0,64 y 0,73, siendo la zona Centro la que presentó el valor medio más alto.

Las zonas Norte y Llanos Orientales presentaron valores medios de Aw más bajos en las muestras de arroz obtenidas sin distinción de los sistemas de cultivo empleados, al comparar con los valores reportados en el 2017. Caso opuesto se presentó en la zona Centro, donde se presentaron valores medios superiores en los dos sistemas de cultivo. Este mismo comportamiento lo mostró la zona Nororiental en el único sistema de cultivo aplicado.

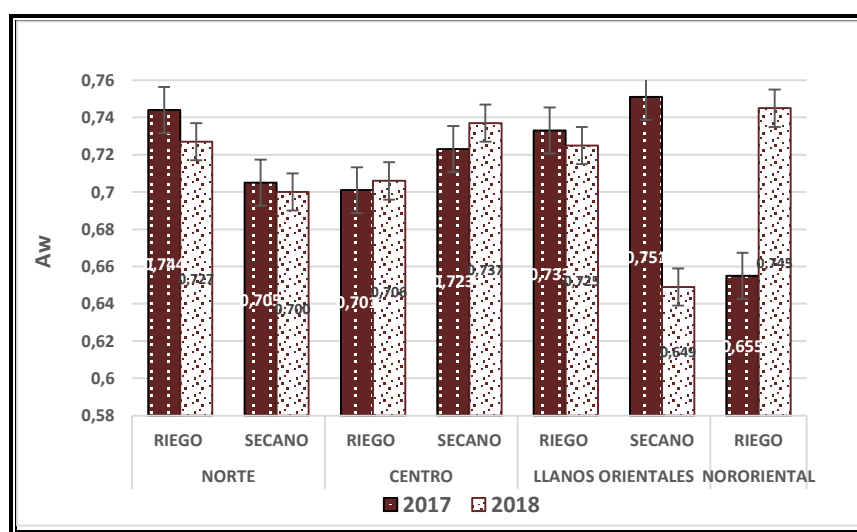


Figura 28. Aw del arroz en cultivo 2017 – 2018

De manera general, si se tiene en cuenta la alta incidencia de M y L obtenida, especialmente en el arroz procedente del sistema riego en el 2017 (Figura 26), al relacionar con los valores obtenidos de Aw, se evidencia que estos son relativamente bajos, no obstante, algunos hongos y en especial *Aspergillus flavus* han desarrollado mecanismos fisiológicos que se adaptan a factores de estrés ambiental, entre ellos la baja actividad hídrica - Aw -,

permitiéndoles competir y dominar otras especies de hongos (Nierman, 2008; Medina *et al.*, 2015).

De igual manera, en relación a los factores abióticos, se ha demostrado que la Aw, la temperatura y sus interacciones son los principales determinantes etiológicos en la regulación del crecimiento fúngico y la producción de metabolitos secundarios (Mannaa & Kim, 2017; Medina *et al.*, 2017).

5.1.2.3 Humedad

Si bien hay otros factores que pueden ejercer influencia sobre la conservación de los granos, el contenido de humedad es el principal factor que influye en la calidad del producto.

Las muestras provenientes del sistema riego en el 2017 mantuvieron valores medios de contenido de humedad entre 7,48 – 11,74 % (Figura 29), y las procedentes del sistema secoano entre 6,87 – 10,09 %. Durante el 2018, las muestras tomadas del sistema riego evidenciaron valores medios de humedad entre 7,78 – 10,12 % y las del sistema secoano entre 7,11 – 8,39 %. Las muestras recolectadas en el 2018 indistintamente del sistema de cultivo aplicado mostraron menos contenido de humedad (p -valor > 0,05) que las del 2017, exceptuando la zona Centro que mostró un comportamiento inverso.

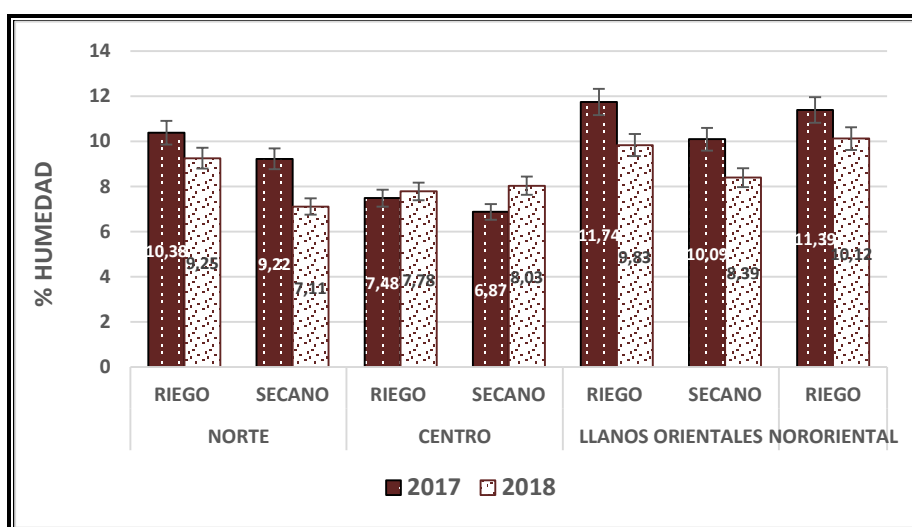


Figura 29. % de Humedad del arroz en cultivo 2017 – 2018.

La zona Centro, como se ha mencionado anteriormente, presentó un comportamiento particular en relación a la incidencia de CT, M y L, y de igual manera con el contenido de

humedad presente en los granos de arroz. Si bien, se destacan como factores a tener en cuenta en este aspecto el relieve y el clima, los cuales están estrechamente ligados. Esta zona de cultivo está ubicada cerca al macizo colombiano, en la mayor parte de esta región las lluvias tienen un carácter bimodal, con un primer periodo húmedo que por lo general abarca los meses comprendidos entre marzo y junio, y un segundo periodo entre septiembre y diciembre. La temperatura media anual varía entre 26,5 y 28,6 °C, con valores medios de humedad relativa del aire entre 44 – 88 %. Por lo descrito, esta zona arrocera propicia las condiciones ambientales óptimas para el crecimiento fúngico y a su vez para la biosíntesis de micotoxinas.

5.1.3 Análisis de la incidencia de Aflatoxinas (AF), Zearalenona y Desoxinivalenol en el arroz en cultivo en Colombia (2017 – 2018)

5.1.3.1 Incidencia de Aflatoxinas en el arroz en cultivo

En el muestreo del año 2017, se observó que, en el sistema de cultivo por riego, las zonas Norte y Llanos Orientales presentaron incidencias de AF, siendo especialmente importante las incidencias de AFB₁. La producción de AF en estas zonas se vió favorecida por la incidencia de hongos (100 %), además de factores que ocurren a nivel de cultivo, como es el estrés hídrico y las altas temperaturas (superiores a 24 °C) presentadas en estas zonas.

En el caso del sistema seco, en las zonas Norte y Centro se registraron incidencias muy importantes de AF. Al igual que, lo observado en el sistema de riego, las incidencias más elevadas se detectaron para la AFB₁ (Tabla 27).

Si se analizan los registros de las incidencias se puede inferir que, para el año 2017, la zona más crítica por la presencia de AF es la zona Norte, con incidencias del 57 y 63 % para los sistemas seco y riego, respectivamente (Figura 30). Esta zona, presentó una temperatura media del aire entre 27 – 34 °C, registrando precipitaciones entre 500 y 4000 mm, con un gradiente muy definido en dirección sur y una humedad relativa que estuvo en torno al 70 %. Bajo este contexto, y en concordancia con lo reportado por Mousa *et al.* (2016), las condiciones ambientales de la zona Norte de Colombia fueron favorables para la presencia de AF en el grano de arroz.

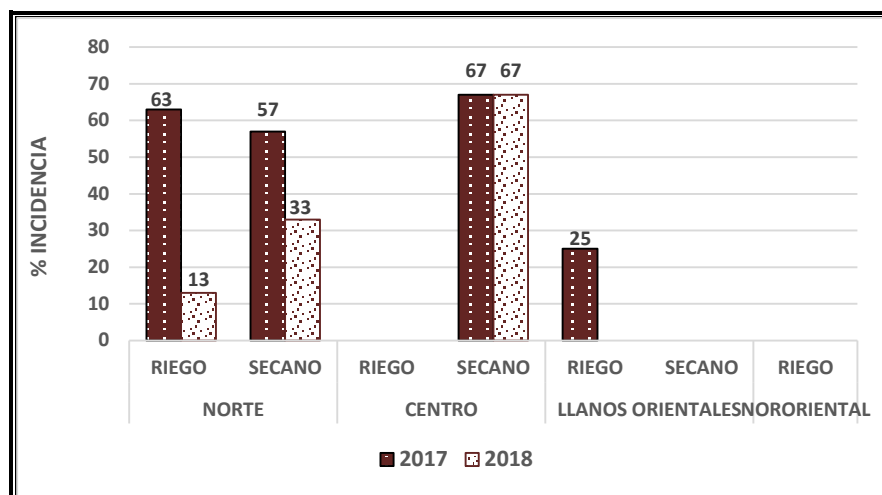


Figura 30. Incidencia de Aflatoxinas en las zonas arroceras de Colombia 2017 – 2018

La incidencia de aflatoxinas, en el arroz cultivado por el sistema riego en Colombia durante el año 2017 fue del 15 %, con niveles que oscilaron entre 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1,83 mg/kg . De las muestras positivas para AF, el 57 y el 50 %, en el sistema de cultivo por riego y secano, respectivamente, superaron el valor máximo permitido por la Resolución del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia No. 2671 de 2014, (10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para AF) y el Reglamento (EU) N°165/2010. La incidencia de AF en el arroz cultivado por el sistema secano correspondió al 43 % (2,1 – 119,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). El 50 % de las muestras positivas superaron el límite máximo permitido.

Existen pocos trabajos que pueden servir de referentes para hacer comparaciones a nivel informativo, a pesar de ello, la incidencia de AF en el arroz en cultivo durante el 2017, fue elevada si se compara con lo reportado por Díaz *et al.* (2015), quienes estudiaron la incidencia de estas micotoxinas en muestras de arroz de poblaciones indígenas del Amazonas (Colombia) en el 2013.

En comparación con el año 2017, para el 2018 se evidenció un notable descenso en la incidencia de AF en el país, lo cual fue especialmente notorio en la zona Norte (Figura 30). La zona Centro presentó un comportamiento particular, ya que en el territorio que practica el sistema secano para la producción de arroz no se observó ninguna variación en cuanto a la incidencia de AF de un año al otro. Este mismo fenómeno, se observó con las incidencias de CT y de M y L. Adicionalmente, se trata de la zona donde se detectó la mayor incidencia de AF en el país durante los dos años. De acuerdo con Cotty & Jaime – García (2007), los

cultivos en climas cálidos tienen una mayor probabilidad de infección por hongos productores de AF, lo cual parece ser el caso de la zona muestreada, por los valores de temperatura, entre 23 y 26 °C, que se presentan en la misma. Así mismo, esta región posee una gran diversidad pluviométrica con precipitaciones entre 1000 y 1500 mm a lo largo de la cordillera Oriental, zona geográfica donde se ubica el departamento de Caquetá, donde fueron tomadas las muestras de esta área.

Las zonas Norte y Centro se consideran áreas idóneas para el cultivo de arroz por presentar las mejores condiciones por clima y por suelo, así como por su relieve plano, con pendientes menores al 3 % (Lasso, 1991). Dado que la producción de micotoxinas depende en gran parte del clima para su desarrollo, el cambio climático también impulsa en gran medida su producción. Las elevadas temperaturas presentadas en estas dos regiones pueden aumentar la capacidad del aire para la absorción de agua, lo cual genera mayor demanda de agua en las plantas debido a la disminución de la humedad del suelo. Por lo tanto, podría generar estrés hídrico durante las sequías (Juárez *et al.*, 2010). Esto podría desencadenar de manera natural que las plantas de arroz alberguen hongos en su estructura, y aunado a los factores del cambio climático, favorezcan el desarrollo de micotoxinas (Pérez *et al.*, 2016).

La incidencia de AF, en el arroz cultivado por el sistema riego en el país en el 2018 fue del 2 %, la incidencia de las muestras del sistema secano fue del 31 % (1,6 - 22,4 µg/kg).

De otro lado, la incidencia obtenida en el 2018 (sistema riego), fue semejante a la reportada por Díaz *et al.* (2015); no obstante, la incidencia presentada por el sistema secano fue superior a la reportada por Díaz *et al.* (2001), quienes evaluaron un total de 248 muestras de productos colombianos seleccionados, detectando la presencia de AF en el 10 % de las muestras de arroz.

Se ha reportado alta incidencia de AF en arroz de diferentes países: en Turquía Aydin *et al.* (2011), informaron que 32 de 100 muestras de arroz analizadas, presentaron contaminación con AF, en concentraciones de 4 mg/kg; Iqbal *et al.* (2012), determinaron la presencia de AF en arroz *paddy* procedente de Pakistán, con una frecuencia de 33 – 64 %, con un rango promedio entre 7,10 y 16,35 mg/kg; Majeed *et al.* (2018), estudiaron los niveles de AF en 180 muestras de arroz de Punjab, Pakistán, encontrando una prevalencia del 56 % de AFB₁;

Onyedum *et al.* (2020) establecieron contaminación de AF en arroz de Nigeria, mostrando una ocurrencia del 100 %, en concentraciones de 2,10 – 248,20 µg/kg. Estas incidencias son superiores a las encontradas en el presente estudio.

En las muestras recolectadas durante el 2017 y 2018, sin distinción del sistema de cultivo aplicado, no se evidenció la presencia de AFG₁ y AFG₂. Este hecho, se puede atribuir a que, no se detectó *A. parasiticus* (Tabla 34), lo que explica la ausencia de AFG. Así mismo, estas aflatoxinas son menos frecuentes y casi nulas en ausencia de AFB₁ (Urrego & Díaz, 2006).

Finalmente, cabe destacar que para el 2017, en el sistema de cultivo por riego y en el seco, el 57 y el 50 %, respectivamente, de las muestras positivas para AF, superaron el valor máximo permitido por la Resolución del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia No. 2671 de 2014, (10.0 µg/kg para AF) y el Reglamento (EU) N°165/2010, (10.0 µg/kg para AF). De otro lado, en el 2018, en el sistema de cultivo seco, el 50 % de las muestras superaron los valores permisibles por las normativas mencionadas; en el sistema riego, ninguna de las muestras superó dichos valores. Este comportamiento refleja un riesgo sanitario para AF, debido a los efectos adversos agudos y crónicos en los seres humanos y en este mismo sentido, estableciendo la necesidad de procesos de control y vigilancia exhaustivos que permitan contribuir con la seguridad alimentaria.

5.1.3.2 Incidencia de Zearalenona (ZEA) en el arroz en cultivo

Según los resultados obtenidos durante el año 2017, ZEA fue, después de las AF, la segunda micotoxina de mayor incidencia a nivel nacional. Se observó que el mayor número de muestras contaminadas con esta micotoxina, procedían del sistema de cultivo por riego, en contraste con el sistema seco (Tabla 27). Dos de las cuatro zonas arroceras del país que hacen siembra por riego, presentaron incidencias significativas. Estas zonas correspondieron a la zona Norte (25 %) y la zona de los Llanos Orientales (38 %). Por su parte, la zona Centro fue la única zona del sistema seco con incidencia por ZEA (33 %) (Figura 31).

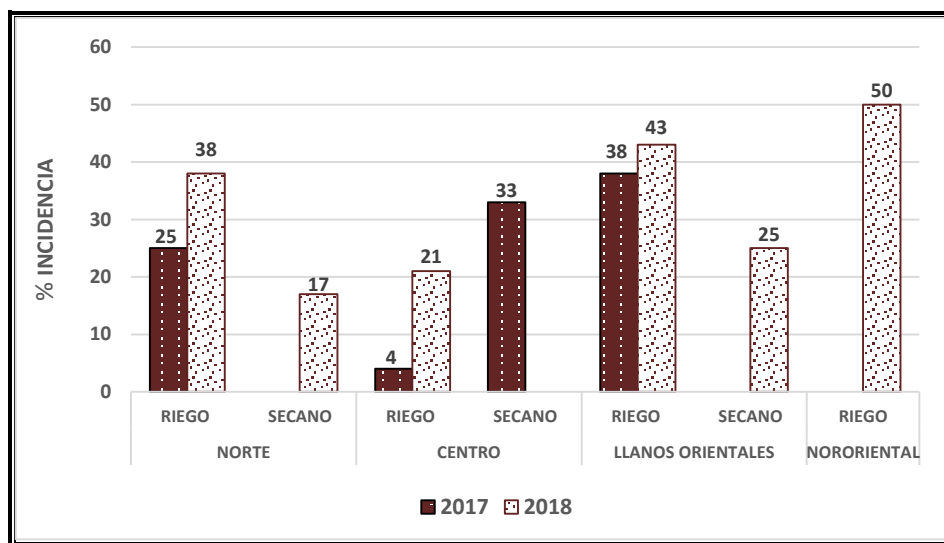


Figura 31. Incidencia de Zearalenona en las zonas arroceras de Colombia (2017 – 2018)

La zona Centro evidenció la mayor incidencia de micotoxinas para el año 2017, en primer lugar, la mayor incidencia de AF (Figura 30) y en segundo lugar de ZEA. En consecuencia, la producción de micotoxinas se ve afectada drásticamente cuando varias especies comparten el mismo nicho ecológico (Marín *et al.*, 2001). Generalmente, en los alimentos, las especies toxigénicas coexisten con bacterias y otras especies fúngicas, cuya presencia puede inhibir o favorecer la producción de micotoxinas. Estas interacciones pueden ser intra e interespecíficas. Por ejemplo, la producción de ZEA disminuye cuando crece *A. flavus* a 16 °C. De otro lado, la producción de ZEA por *F. graminearum* no se ve afectada por *F. verticillioides* ni por *F. proliferatum* (Sanchis *et al.*, 2000; Velluti *et al.*, 2000; Soriano & Dragacci, 2004).

Para el año 2018, ZEA pasó a ser la micotoxina de mayor incidencia, siendo especialmente claro este comportamiento en el sistema de cultivo por riego (Tabla 28). La zona Nororiental presentó la mayor incidencia (50 %). Esta zona, representada por el Departamento Norte de Santander, donde las regiones arroceras se encuentran en el área circundante al río Zulia y con una temperatura máxima media entre 31,7 y 34,3 °C, humedad relativa mensual de 60 % en agosto hasta 71 % en enero, y donde la evaporación anual alcanza los 2088 mm (distribuidos mensualmente entre 121,1 mm en noviembre y 255 mm en julio), hacen que esta región sea idónea para el cultivo del arroz. Estas características climáticas interactúan con las zonas geográficas, es decir, que el clima húmedo de la región puede ser debido a la proximidad de un cultivo al río o a su ubicación cercana a la zona que presenta fuertes vientos, favoreciendo así la dispersión de las esporas fúngicas (Ariño *et al.*, 2015).

En el caso del sistema seco, se encontró que en comparación con el 2017, la incidencia de ZEA se incrementó en todas las zonas de cultivo, excepto en la zona Centro (Figura 31). Obedeciendo a que la incidencia y severidad de las infecciones fúngicas varían considerablemente según los años y las ubicaciones de los cultivos (López *et al.*, 2013; Ariño *et al.*, 2015). El efecto del clima es clave durante el periodo vegetativo de los cultivos y por ello se puede explicar la variación de la contaminación de las cosechas con micotoxinas entre diferentes años.

A pesar de la poca información con respecto a la presencia natural de micotoxinas de *Fusarium* spp. en arroz, en algunos países se ha encontrado una elevada incidencia de ZEA. Savi *et al.* (2018), recolectaron muestras de granos de arroz durante la cosecha de 2017 en Brasil, mostrando resultados significativos para ZEA (60 %) en niveles entre 90,56 - 126,31 µg/kg, donde el 36 % de las muestras fueron significativamente más altas que el límite máximo estipulado en la normativa brasileña y por la Comisión Europea. De igual manera, Majeed *et al.* (2018) cuantificaron micotoxinas en 180 muestras de arroz en Pakistán, ZEA presentó una prevalencia del 15 %.

Lee *et al.* (2011), recolectaron 201 muestras de arroz integral, arroz pulido y dos tipos de subproductos (arroz teñido de azul y arroz decolorado) en Corea. Las muestras de arroz integral estaban contaminadas con ZEA (47 a 235 ng/g). Las muestras de arroz pulido estaban en gran parte libres de micotoxinas. En arroz decolorado se encontró ZEA (25 a 3305 ng/g); en arroz teñido de azul (menos maduro) se cuantificó ZEA (26 a 3156 ng/g). Las muestras de arroz decolorado fueron las más contaminadas, 80 % de las muestras contenían ZEA. Las muestras de arroz teñidas de azul también estaban muy contaminadas 98 %. De las muestras de arroz integral analizadas el 27 % estaban contaminadas con ZEA.

5.1.3.3 Incidencia de Desoxinivalenol (DON) en el arroz en cultivo

De las micotoxinas evaluadas, DON fue la de menor incidencia. Resulta llamativo, sólo fue detectada en muestras cultivadas por el sistema riego del año 2018, tal como se presenta en la Figura 32, en este mismo año ZEA fue la micotoxina más frecuente. Lo cual puede estar relacionado con una mayor proliferación de *Fusarium* spp. En este sentido, una especie de *Fusarium* puede producir las dos micotoxinas ya que la ruta biosintética es la misma, sin embargo, sólo lo hacen *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*; el resto de especies

únicamente producen ZEA (*F. crookwellense*, *F. heterosporum*, *F. semitectum* y *F. equiseti*). A pesar de ello, lo más probable es que hay una mayor proliferación de especies productoras de ZEA por encima de DON.

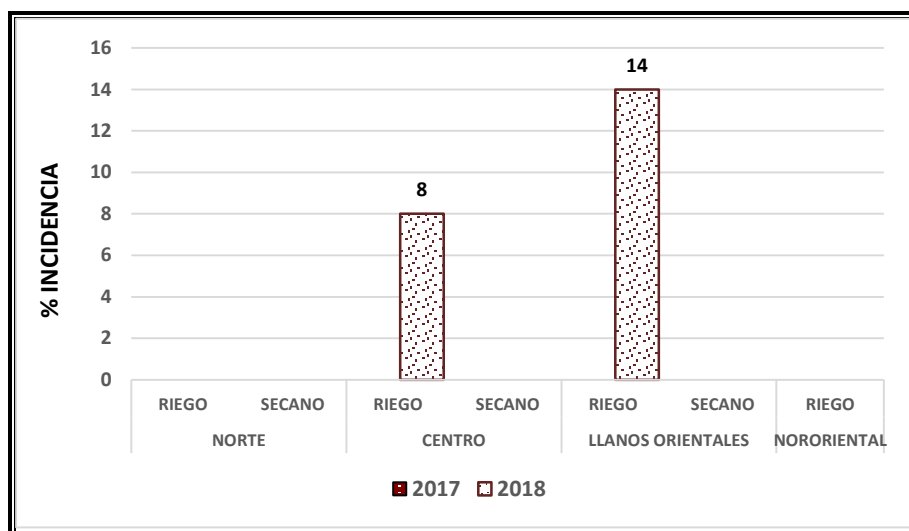


Figura 32. Incidencia de Desoxinivalenol en las zonas arroceras de Colombia 2017 – 2018

La zona de los Llanos Orientales, presentó una incidencia del 14 %, se caracteriza por su alta pluviosidad, la cual está alrededor de los 3.000 mm anuales, distribuidas en una sola temporada que inicia en marzo y finaliza a principio de diciembre. Estas lluvias pueden provocar retraso en la cosecha y de esta manera se puede incrementar sustancialmente el contenido de DON en el arroz (West *et al.*, 2012). Además, la contaminación con esta micotoxina depende de muchos factores, como las condiciones climáticas, la temperatura y la humedad (Xu, 2003). También influyen factores agronómicos como la rotación de los cultivos, gestión de residuos y la susceptibilidad de la variedad (Pirgozliev *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2006).

Existen pocos datos sobre la contaminación fúngica y la presencia de DON en el arroz a nivel nacional y en otros países los estudios son escasos. Majeed *et al.* (2018) cuantificaron micotoxinas en 180 muestras de arroz en Pakistán. DON presentó una incidencia del 8 % con un rango de concentración media entre 0,61 y 22,98 µg/kg.

En Corea, Lee *et al.* (2011), recolectaron 201 muestras de arroz integral, arroz pulido y dos tipos de subproductos (arroz teñido de azul y arroz decolorado). Las muestras de arroz decolorado fueron las más contaminadas, 68 % presentaban DON (59 a 1355 ng/g); el 4 %

de las muestras de arroz teñidas de azul presentaron DON (86 a 630 ng/g). Así mismo, el 4 % de las muestras de arroz integral estaban contaminadas con DON.

Makum *et al.* (2011), en Nigeria analizaron 21 muestras, 10 de arroz del campo, 6 de tiendas y cinco de mercados de una arrocería tradicional del estado Níger. La incidencia de DON fue del 23,8 %.

En Brasil, Nunes *et al.* (2003), tomaron 56 muestras de arroz integral, arroz sancochado y arroz blanco pulido, una de las muestras estaba contaminada con DON (300 µg/kg).

5.2 Arroz comercial

Las muestras de arroz comercial analizadas correspondieron al arroz cultivado en las diferentes zonas durante el año 2017. Posteriormente, este arroz fue distribuido en los diferentes molinos del país, estos molinos se encargan de recepcionar arroz de diversos lugares de Colombia, y de acuerdo a la demanda en ocasiones importan el mismo, razón por la cual, no necesariamente el arroz comercializado es procedente de la zona donde se encuentra ubicado el molino.

5.2.1 Características microbiológicas del arroz comercializado en Colombia

En el arroz comercial no se observó presencia de *C.T* y *E. coli*, y se puede considerar que este hecho obedece a que el grano fue sometido a procesos físicos como son la pre-limpieza y limpieza. Esta última es una práctica muy importante que permite la disminución y eliminación de estos microorganismos (Abadía & Bartosik, 2013). No obstante, se evidenció en todas las muestras de arroz comercial procedentes de las zonas arroceras la incidencia de M y L (Tabla 35). Esto pudo ser debido a que las esporas fúngicas permanecen viables en los granos de arroz, durante el transporte y almacenamiento.

Tabla 35. Incidencia de Mohos y Levaduras en el arroz comercial

ZONA	INCIDENCIA (%)
NORTE	50
CENTRO	50
LLANOS ORIENTALES	75
NORORIENTAL	75

Después de cosechados, los granos de arroz continúan respirando. Algunas investigaciones concluyeron que una parte significativa del gas carbónico (CO₂) que se produce durante la respiración, se debe al metabolismo de los insectos presentes en los granos secos y a los hongos que prevalecen en los granos húmedos (FAO, 1993; Castaño *et al.*, 2001; Jiménez, 2014). Cuando los hongos son los principales agentes responsables del aumento del proceso respiratorio se puede llegar a un punto en que los granos húmedos pasan a ser un sustrato alimenticio de los mismos, que siguen respirando y transformando la materia seca de los granos en gas carbónico, agua y calor (FAO, 1993).

5.2.2 Características fisicoquímicas del arroz comercializado en Colombia

Los factores físicos y químicos tienen una influencia decisiva en la calidad de los granos. Las condiciones del grano seco y comercializado (Figura 33) no permiten la germinación de las esporas fúngicas que permanecían en el grano.

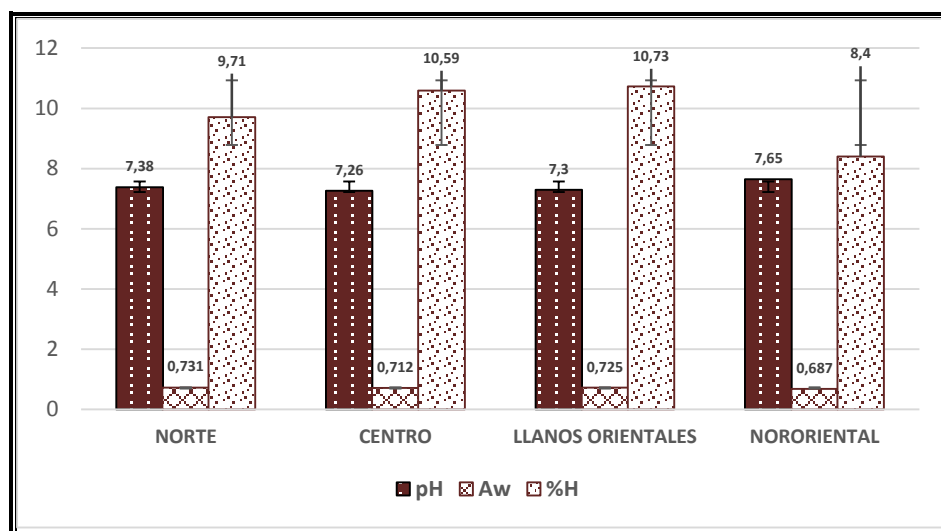


Figura 33. Características fisicoquímicas del arroz comercial

La humedad es el factor de mayor influencia en la conservación del grano, su importancia radica en su relación con factores biológicos, especialmente hongos. Entre más seco se encuentre el grano almacenado (humedad 13 – 15 %), menor será su índice de deterioro aun cuando otros factores sean desfavorables (García, 2005; Gastón *et al.*, 2007). En este sentido, las muestras de arroz evidenciaron contenidos de humedad inferior a lo estipulado en la noma del Codex Stan 198-1995 (15 % m/m máximo).

Los valores medios de Aw evidenciados en las muestras de arroz comercial procedentes de las diferentes zonas arroceras son bajos. Este hecho parece determinar que, la mayor tolerancia de los hongos a disponibilidades bajas de agua suele darse a temperaturas próximas a la óptima de crecimiento. La germinación de las esporas ocurre, generalmente, a menores valores de Aw que las requeridas para el crecimiento micelial, mientras que la esporulación suele ocurrir a valores superiores (Lacey, 1989). Habitualmente, la Aw mínima que permite el crecimiento de hongos es más baja, así como más amplio es el rango de temperaturas, que aquellas condiciones que permiten la producción de aflatoxinas y otras micotoxinas (Lacey y Magan, 1991; Diener & Davis, 1970).

Los hongos de almacén son normalmente capaces de germinar y crecer a Aw más bajas que los hongos de campo. De igual manera, es preciso constatar que la fase de latencia previa a la germinación aumenta a medida que disminuye la Aw (Magan & Lacey, 1988).

5.2.3 Incidencia de micotoxinas en el arroz comercializado en Colombia

El arroz comercial procedente de las diferentes zonas arroceras del país mostró presencia de AF (Figura 34), evidenciando una incidencia del 50 % en concentraciones que variaron entre 2,4 – 93,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$; niveles considerables si se comparan con lo reportado por estudios previos (Reiter *et al.*, 2010; Majeed *et al.*, 2013, Lai *et al.*, 2014). De igual modo, sólo una muestra presentó DON manifestando una incidencia del 6 % (128 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

El 31 % de las muestras de arroz comercial positivas para AF superaron el valor máximo permitido por la Resolución MPS No. 2671 del 2014 de Colombia y por el Reglamento 165/2010 de 09 de marzo de 2010 de la UE, situación que afecta notoriamente la inocuidad alimentaria en virtud a que estas micotoxinas son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas; además son teratogénicas y mutagénicas, producen daño hepático y afecciones de los pulmones. Esto sugiere la implementación de medidas de vigilancia y control en la cadena productiva del arroz y más aun teniendo en cuenta, la mezcla de arroz que realizan los molinos antes de su transformación y comercialización.

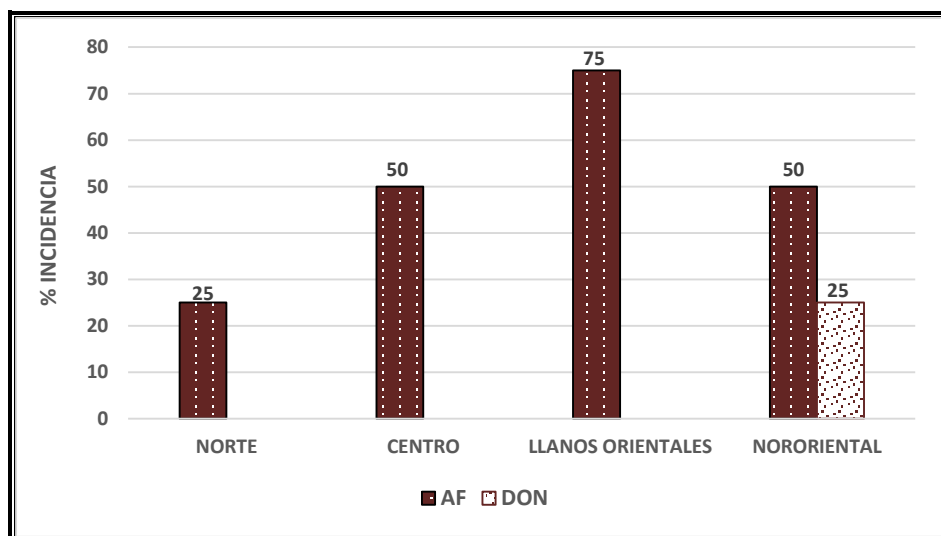


Figura 34. Incidencia de micotoxinas en arroz comercial

No se evidenció presencia de ZEA, en las muestras de arroz comercial procedentes de las diferentes zonas arroceras del país, lo cual obedece a que, en función de las bajas Aw presentadas en dichas muestras, *A. flavus* se vuelve muy competitivo y puede convertirse en una de las especies dominantes (Giorni *et al.*, 2007), con la subsecuente producción de AF. Por el contrario, las especies de *Fusarium* productoras de ZEA raramente crecen después de la cosecha, ya que las condiciones de almacén generalmente no son convenientes para su desarrollo (González, 2009).

5.3 Diversidad fúngica asociada al grano de arroz en cultivo

Respecto a los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de las muestras de arroz en cultivo correspondientes al muestreo del año 2017, *Aspergillus* fue el género con mayor frecuencia (74 %) seguido de *Penicillium* (20 %), coincidiendo con lo reportado por Jedidi *et al.* (2018).

Katsurayama *et al.* (2019), informaron que especies de *Aspergillus*, estaban presentes en muestras de arroz en cultivo y arroz en todas las etapas de procesamiento en zonas agroclimáticas en Brasil. *Aspergillus* fue la especie más frecuente en muestras de campo de humedales (50 %) que en las de secano (8%). Interesantemente, especies de ninguna otra sección de *Aspergillus* se encontró en muestras de arroz en cultivo en las zonas agroclimáticas.

5.3.1 Análisis de la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos de *Aspergillus*

spp.

Con el fin de verificar el potencial aflatoxigénico de los aislamientos fúngicos (19) aislados del arroz, correspondientes al género *Aspergillus*, se determinó que el 52 % de las cepas presentaron fluorescencia UV de colonias en el medio ALC.

Después de caracterizar fenotípica y molecularmente los 19 aislamientos se estableció que 17 correspondían a *A. flavus*. En primera instancia, se aplicó una metodología cualitativa basada en la emisión de fluorescencia. Se estableció que 10 de las 17 cepas evidenciaron capacidad aflatoxigénica manifiesta en el agar ALC. La fluorescencia natural de las AF es debida a su estructura pentaheterocíclica oxigenada (derivados difuranocumarínicos). La parte más reactiva de dicha estructura es el anillo lactónico (Palmgren & Hayes, 1987).

La técnica cualitativa usada tiene potencial para ser aplicada como un método que podría ser útil y económico para el cribado rápido de aislamientos con el fin de detectar AF, especialmente en los países donde la determinación de la producción de micotoxinas se ve obstaculizada por la falta de herramientas discriminatorias avanzadas.

Adicionalmente, con la finalidad de contrastar estos resultados se aplicó una metodología cromatográfica, como se describió en el apartado 3.2.3.1. Se observó una relación directa entre la concentración de aflatoxinas y la fluorescencia emitida. La concentración de AF producidas fue muy variable dependiendo del aislamiento. Es relevante mencionar que, la AF producida en mayor porcentaje, por todas las cepas sin excepción, fue la AFB₁. La mayoría de los aislamientos produjo AFB₁ y AFB₂ en el rango de 0,2 – 300 g/kg; el 100 % de ellos produjeron AFB₁ y el 88 % produjeron AFB₂. Con respecto a AFG₁ y AFG₂, ninguna cepa de *A. flavus* las produjo. Por lo anterior, se evidenció que las 17 cepas aisladas del arroz cultivado en el 2017 correspondían a *A. flavus* aflatoxigénicos. De otro lado, *A. caelatus* y *A. niger* no emitieron fluorescencia y tampoco cuantificaron concentraciones de AF.

La capacidad aflatoxigénica se clasificó en cuatro grupos, atendiendo a la intensidad de la fluorescencia emitida (baja, media baja, media alta y alta) y a la concentración de AF obtenida (Tabla 34), como se evidencia en la Figura 35.

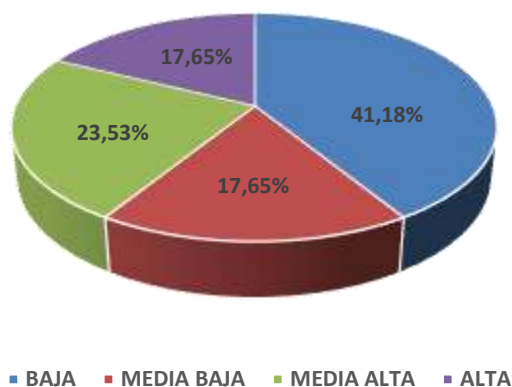


Figura 35. Relación de la capacidad aflatoxigénica de los aislamientos

Algunos autores han reportado concentraciones de AF más bajas en aislamientos de *A. flavus* procedentes de materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos para animales en Colombia. Se observaron rangos de concentración entre 0,16 a 93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_1 y de 0,2 a 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB_2 para *A. flavus* (Acuña, 2003).

Thathana *et al.* (2017) confirmaron mediante TLC que el 30 % de cepas aisladas del maíz y del suelo correspondientes a *A. flavus* eran productoras de AF, mientras que las cepas de *A. caelatus* y *A. niger* no emitieron fluorescencia, y los resultados cromatográficos no cuantificaron concentración alguna de AF.

5.4 Correlación entre la incidencia de micotoxinas, las zonas arroceras y los grupos de microorganismos presentes en el arroz cultivado en Colombia, durante los años 2017 y 2018

Después de aplicar la técnica estadística multivariada *Análisis Canónico de Correspondencias* (ACC) se obtienen los planos factoriales mostrados en la Figura 36.

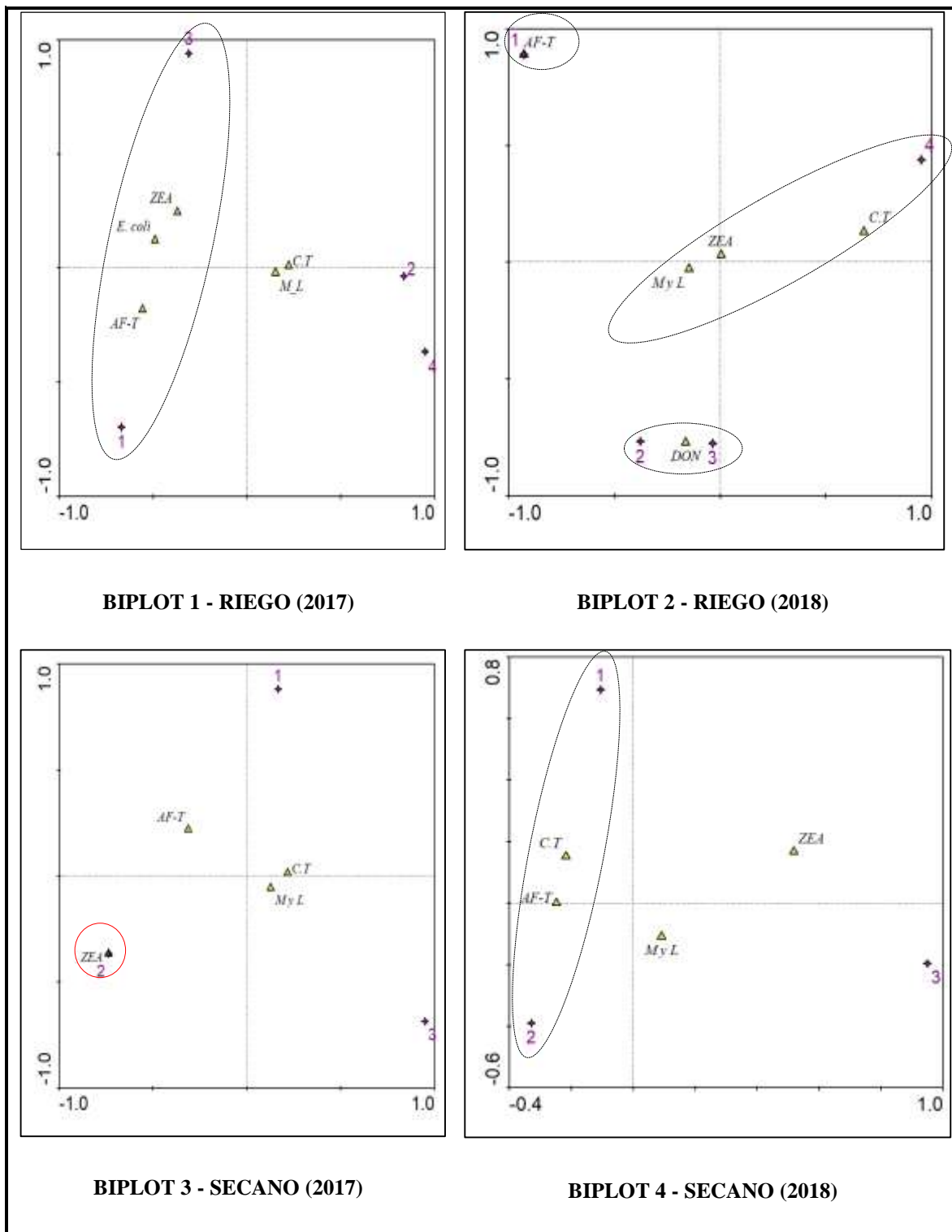


Figura 36. Plano factorial del ACC. Zonas arroceras, incidencia de micotoxinas, y grupos de microorganismos en el arroz en cultivo 2017 – 2018
 Zonas arroceras: 1. Zona Norte, 2. Zona Centro, 3. Zona Llanos Orientales, 4. Zona Nororiental

Biplot 1: En el 2017, las muestras procedentes del sistema riego presentaron incidencias similares de CT y M y L. De igual manera, estos grupos de microorganismos estuvieron presentes en todas las zonas arroceras de Colombia.

E. coli sólo se presentó en las zonas Norte (1) y Llanos Orientales (3); en estas mismas zonas se evidenció la presencia de AF y de ZEA.

Biplot 2: La ubicación de ZEA en el centro del plano factorial, de una manera casi equidistante de los puntos 1, 2, 3 y 4, indica la incidencia de esta micotoxina en todas las zonas arroceras de Colombia. Este hecho se atribuye a que el contenido de humedad en las diferentes muestras de arroz obtenidas de las zonas arroceras es menor comparado con el año anterior. Por lo tanto, se asume que cuando las condiciones son más austeras para el desarrollo fúngico, empiezan a prevalecer hongos del género *Fusarium* spp. y bajo estas circunstancias se inicia el proceso para sintetizar ZEA. Las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. se encuentran prácticamente en todas las áreas del mundo donde se producen cereales, y pueden ser muy agresivas en zonas de temperaturas medias y humedades bajas (Cook, 2010).

Aunado a lo anterior, *Aspergillus* spp. es un hongo débil, y es mal competidor con otros hongos que crecen en el mismo sustrato bajo las mismas condiciones ambientales (Moreno & Gil, 1991). 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 AF o crear un efecto sinérgico en su producción (Moreno & Gil, 1991). Así mismo, las fuentes de nitrógeno y carbono, el pH, la temperatura, la disponibilidad y actividad de agua y los metabolitos de las plantas, afectan la síntesis de AF (Bhatnagan *et al.*, 2006) y están asociadas de manera directa con las rutas metabólicas correspondientes. De esta manera, cuando el hongo se somete a condiciones de estrés por temperaturas altas o por humedad, las AF se sintetizan pero en cantidades mínimas (Schmidt *et al.*, 2009).

Las condiciones de menor humedad conllevaron a una menor incidencia, la micotoxina que emergió fue ZEA en todas las zonas arroceras, contrario a lo observado en el 2017, donde la micotoxina de mayor prevalencia fue AF, puesto que las condiciones climatológicas eran diferentes y la humedad disminuyó.

En la Figura 37 se evidencia el comportamiento de la incidencia global de las micotoxinas estudiadas durante el 2017 – 2018 en las muestras procedentes del sistema riego.

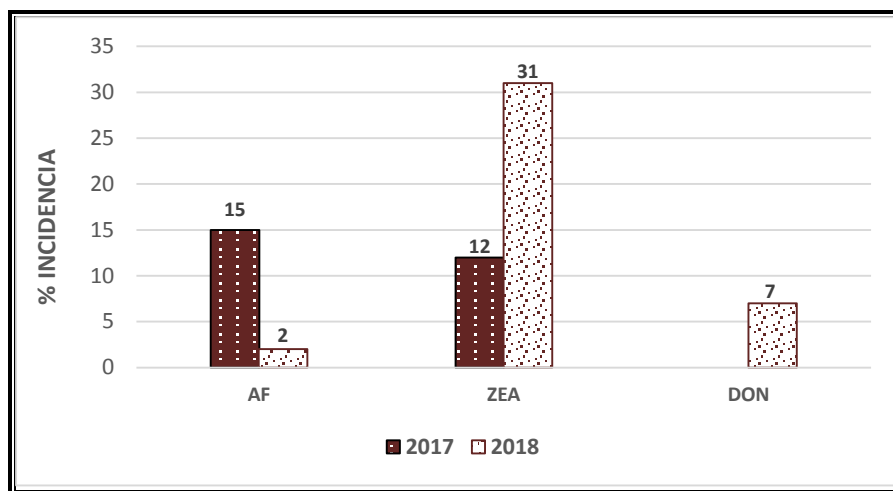


Figura 37. Incidencia de micotoxinas 2017 – 2018, sistema riego

Las muestras de arroz recolectadas durante el 2018, evidenciaron menor humedad que las del 2017 (Figura 38), y se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de humedad en las muestras de arroz por zona (p -valor < 0.05). De forma general, la temperatura promedio en el año 2018 también fue superior a la evidenciada en el 2017, lo cual propició la proliferación de hongos micotoxigénicos.

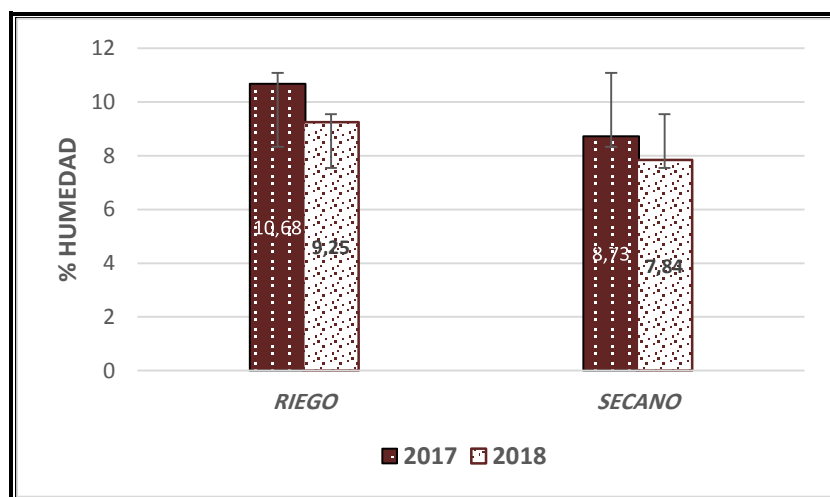


Figura 38. % Humedad 2017 – 2018

Biplot 3: En el 2017, las muestras del sistema seco, evidenciaron incidencia de AF en las zonas Norte (1) y Centro (2). ZEA sólo se hizo presente en la zona Centro (2).

En relación a los microorganismos, las muestras recolectadas bajo el sistema seco presentaron incidencia de C.T en todas las zonas arroceras del país, en forma similar, la incidencia de M y L fue del 100% en todas las zonas. No hay presencia de *E. coli*.

Biplot 4: En las muestras procedentes del sistema seco durante el 2018 se presentó una tendencia que se repite en los dos años, y es que la mayor incidencia de AF se presentó en las zonas Norte (1) y Centro (2), aunque en la zona Norte (1) la incidencia de AF disminuyó con respecto al año anterior.

Se identifica en el mapa incidencia de ZEA en las zonas Norte (1) y Llanos Orientales (3). En ninguna de las zonas se identificó la presencia de DON.

En la zona Centro (2) se presenta un comportamiento excepcional; la incidencia de M y L se mantiene (100%). No hay presencia de ZEA. De otro lado, es la única zona donde la incidencia de AF se mantiene, no varía con el año, esto se puede atribuir a que las AF se encuentran con más frecuencia en cereales de zonas cálidas; de otro lado, también influyen las prácticas agrícolas (Swanson, 1987).

La incidencia de las micotoxinas estudiadas durante el 2017 – 2018 en las muestras provenientes del sistema seco se muestran en la Figura 39.

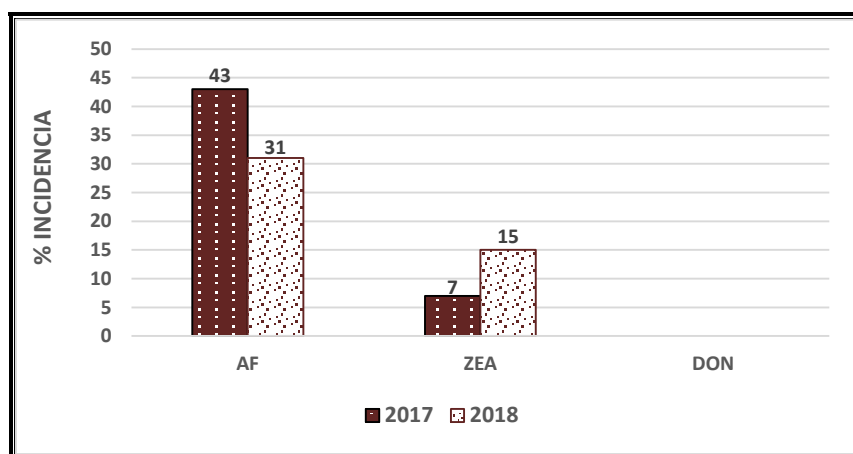


Figura 39. Incidencia de micotoxinas 2017 – 2018, sistema seco

En el sistema de cultivo seco, tanto en el 2017 como en el 2018, se evidenció la presencia de AF y de ZEA. En contraste, en ninguno de los dos años se presentó prevalencia de DON.

5.4.1 Correlación entre la incidencia de micotoxinas, las zonas arroceras y los grupos de microorganismos presentes en las muestras de arroz comercial

En la Figura 40, se presenta el plano factorial obtenido para las correlaciones entre incidencia de micotoxinas, zonas arroceras y grupos de microorganismos implicados en los análisis del arroz comercial.

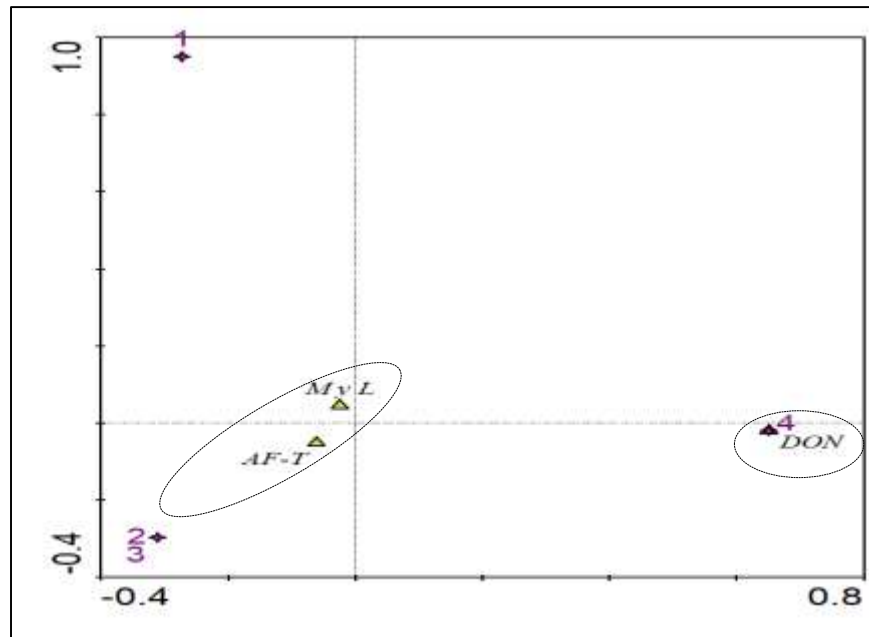


Figura 40. Plano factorial del ACC. Zonas arroceras, incidencia de micotoxinas, y grupos de microorganismos en el arroz comercial.

En todas las zonas muestreadas se detectó incidencia de AF y M y L (ubicados en el centro del plano factorial), la zona Nororiental (4) fue la única zona donde se evidenció incidencia de DON. En ninguna de las zonas estudiadas se estableció incidencia de ZEA.

Las condiciones climáticas de estas regiones (fundamentalmente temperaturas cálidas y aire seco) reducen el tiempo de secado y la demanda energética, pero pueden generar sobresecado de la capa inferior del grano, favoreciendo de esta manera el desarrollo de hongos. De otro lado, el consumo de este arroz supone un alto riesgo en la inocuidad alimentaria.

Capítulo VI
Conclusiones

6. Conclusiones

- Las características microbiológicas evaluadas en las muestras de arroz *paddy* durante el año 2017, evidenciaron presencia de Coliformes Totales en los granos procedentes de todas las zonas arroceras de Colombia por los dos sistemas de cultivo aplicados en el país. Se detectó la presencia de *Escherichia coli* en las muestras cultivadas por el sistema riego de las zonas Norte y Llanos Orientales, el probable origen de esta bacteria atendería al uso de aguas de riego contaminadas. En el 2018, se observó una disminución de Coliformes Totales y no se evidenció *E. coli* en ninguna muestra de arroz.
- La presencia de hongos en los granos de arroz en cultivo durante el 2017 fue muy elevada, en los dos sistemas de cultivo y en todas las zonas estudiadas. En el 2018, se apreció una disminución de este grupo de microorganismos en todas las zonas y en los dos sistemas de cultivo, excepción hecha de la zona Centro en el sistema de cultivo seco.
- El arroz cultivado en el 2017, evidenció mayores contenidos de humedad que las muestras recolectadas en el 2018 indistintamente del sistema de cultivo aplicado, exceptuando la zona Centro que mostró un comportamiento inverso. Lo anterior, se correlaciona con las condiciones climáticas específicas de cada año en el país. Las características fisicoquímicas (pH, Aw y contenido de humedad) establecidas en el grano de arroz producido en Colombia y sus interacciones con los factores abióticos son los principales determinantes etiológicos en la regulación del crecimiento fúngico y la producción de metabolitos secundarios.
- En el año 2017, se registró una alta incidencia de aflatoxinas en el arroz cultivado en el país, estableciéndose como la micotoxina de mayor incidencia a nivel nacional. Esta incidencia disminuyó para el 2018, lo cual estuvo relacionado con las condiciones climáticas que sufrió el país de un año para otro. La zona más crítica por la presencia de AF fue la zona Norte, en los dos sistemas de cultivo.

-
- Se evidenció la presencia de AFB₂ en el año 2017, en las muestras de arroz procedentes de la zona Norte, en los dos sistemas de cultivo; en la zona Centro, sólo se presentó en el sistema seco y en la zona de los Llanos Orientales, en las muestras del sistema riego. En el 2018, las zonas Norte y Centro mostraron una incidencia de AFB₂ del 33 %, en las muestras procedentes del sistema seco. No se evidenció la presencia de AFG₁ y AFG₂ en las muestras de arroz recolectadas durante el 2017 y 2018.
 - De un año para el otro, ZEA pasó de ser una micotoxina de importancia secundaria a ser una micotoxina de alta relevancia por su mayor ocurrencia. En las muestras del sistema riego se pasó de una incidencia del 13 al 31 %, mientras que en el sistema seco la incidencia se incrementó del 7 al 15 %. Estos resultados, sugieren mayor atención y la necesidad de establecer parámetros normativos específicos para el arroz.
 - DON fue la micotoxina de menor incidencia, sólo se presentó en las muestras cultivadas por el sistema de riego en el año 2018, presentando una incidencia del 7 %. Sin embargo, es imperante la necesidad de establecer lineamientos normativos para esta micotoxina en el arroz.
 - Las muestras de arroz comercial mostraron incidencia de AF y DON, el 31 % de las muestras positivas para AF superaron el valor máximo permitido por la normativa colombiana y la establecida por la Unión Europea (10 µg/kg), circunstancia que permite recomendar la necesidad de mayor control y vigilancia en cuanto a la cadena productiva del arroz se refiere.
 - *Aspergillus* fue el género aislado con mayor frecuencia (74 %) a partir de las muestras de arroz en cultivo correspondientes al muestreo del año 2017. El 52 % de la población fúngica aislada y caracterizada como *A. flavus* demostró *in vitro* su capacidad aflatoxigénica.

Capítulo VII
Referentes Bibliográficos

- Abadía, B. y Bartosik, R. (2013). Manual de buenas prácticas en poscosecha de granos hacia el agregado de valor en origen de la producción primaria. Proyecto de eficiencia de poscosecha. Primera edición. Ediciones INTA. CABA. ISBN: 978-987-679-264-6.
- Abdel-Hadi, A., Carter, D. and Magan, N. (2010). Temporal monitoring of the nor1 (aflD) gene of *Aspergillus flavus* in relation to aflatoxin B1 production during storage of peanuts under different environmental conditions. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1914–1922. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04820.x
- Abarca, M.L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals (Microbiologia).
- Abd-Elsalam, K., Aly, I., Abdel-Satar, M., Khalil, M. & Verreet, J. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal DNA sequence data. En: *African Journal of Biotechnology*. Vol.; 2. No 4; p. 82-85.
- Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Amra HA. (2000). Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat. *J Appl Toxicol.*; 19:199-204.
- Abdulkadar, A., Al-Ali, A.A., Al-Kildi, A.M., Al-Jedah, J.H. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control* Volume 15, Issue 7, Pages 543-548. Doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.008.
- Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ovanes, Z., Mobio, T.A., Anane, R., Crppy, E.E., Bacha, H. (2003). DNA fragmentation apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells; prevention by vitamin E. *Toxicology*; 192: 237-248.
- Abrar, M., Anjum, F.M., Pasha, I., Randhawa, M.A., Saeed, F., Wagas, K. (2013). Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53, N° 8: 862-874. Doi: 10.1080/10408398.2011.563154
- Acevedo, M.A., Castrillo, W.A. y Belmonte, U.C. (2006). Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agronomía Tropical*. 56(2): 151-170. ISSN 0002-192X.
- Acuña, C.A, Díaz, G.J. y Espitia M.E. (2003). Aflatoxinas en maíz: reporte de un caso en la Costa Atlántica colombiana. *Rev Med Vet Zoot*; 52: 156-162.
- Afshar, P., Shokrzadeh, M., Kalhori, S., Babae, Z., Saeedi, S.S. (2013). Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control* 31. 525-529.
- Agnes, V.F. and Akbarsha, M.A. (2001). Pale vacuolated epithelial cells in epididymis of aflatoxin-treated mice. *Reproduction* 122, 629–641. Doi: 10.1530/ rep.0.1220629.
- AGRONET. (2014). Área, producción y rendimiento nacional por cultivo. En: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.

- Ahamed, S., Foster, J.S., Bukovsky, A., Wimalasena, J. (2001). Signal transduction through the ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells. *Mol. Carcinog.* 30, 88–98.
- Alcalá, L., Muñoz, B.E., Guinea, J., Peláez, T., Pérez-Molina, J. (2008). Workload due to *Aspergillus fumigatus* and significance of the organism in the microbiology laboratory of a general hospital. *J Clin Microbiol*; 43:2075-9.
- Alexander, N.J., Proctor, R.H and McCormick, S.P. (2009). Genes, gene clusters and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, 28 (2-3):198-215.
- Almeida, M.I., Almeida, N.G., Carvalho, K.L., Gonçalves, G.A., Silva, C.N., Santos, E.A., García, J.C., Vargas, E.A. (2012). Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, Abingdon, v. 29, n. 4, p. 694-703. Doi: 10.1080/19440049.2011.651750.
- Al-Zorekyfarag, N.S. & Saleh, F.A. (2017). Limited survey on aflatoxin contamination in rice. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Doi:10.1016/j.sjbs.2017.05.010
- Amaike, S. & Keller, N.P. (2011). *Aspergillus flavus*. *The Annual Review of Phytopathology* 49:107-133.
- Andino, R.F. & Castillo, Y. (2010). Curso Microbiología de los Alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Universidad Nacional de Ingeniería UNI – Norte. Estelí, Nicaragua.
- Andrade, P.D., Homem De Mello, M., França, J.A. and Caldas, E.D. (2013). Aflatoxins in food products consumed in Brazil: a preliminary dietary risk assessment. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30, N° 1: 127-136.
- Andrade, P. and Caldas, E. (2015). Aflatoxins in cereals: worldwide occurrence and dietary risk assessment. *World Mycotoxin Journal* 8, N° 4: 415-431.
- Anfossi, L., Giovannoli, C., Baggiani, C. (2016). *Current Opinion in Biotechnology*. 37, 120-126.
- Aparecida, R., Batista, L.R., Prado, G., Resende, B., Da Silva, D.M. (2010). Incidência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em arroz. *Ciência e Agrotecnologia*. Vol. 34, No.4. Doi: 10.1590/S1413-70542010000400021.
- Ariño, A., Herrera, M., Giménez, I., Lorán, S., Herrera, A., Carramiñana, J.J. Anadón, R., Diego, A., Adiego, E., Bailly, J.D. (2015). Manual para el desarrollo de buenas prácticas que prevengan la contaminación de maíz y trigo con las micotoxinas aflatoxinas y deoxinivalenol. UNIZAR, PCTAD, ENVT. 28p.

- Arrúa, A., Moura, J. & Fernández, D. (2013). Aflatoxinas, un riesgo real. *Reportes Científicos de la FACEN*, 4(1), 68 – 81.
- Association of Official Agricultural Chemists, AOAC. (1981). Official Method 981.12 pH of Acidified Foods.
- Association of Official Agricultural Chemists, AOAC. (2010a). AOAC method 986.18. Deoxynivalenol in wheat Gas Chromatography Method.
- Association of Official Agricultural Chemists, AOAC. (2010b). AOAC Official Methods 986.17, Deoxynivalenol in wheat. Thin- Layer Chromatography Method.
- Atanda, O., Makun, H., Ogara, I., Edema, M., Idahor, K., Eshiett, M. y Oluwabamiwo, B. (2013). Fungal and Mycotoxin Contamination of Nigerian Foods and Feeds. En: H. A. Makun (Ed.). *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries*. pp. 3–38.
- Aydin, A., Aksu, H., Gunsen, U. (2011). Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. *Environ. Monit. Assess*; 178(1-4):271-80. Doi: 10.1007/s10661-010-1688-9.
- Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. Stored Prod. Res.* 5:669 – 687 pp.
- Babu, D. & Muriana, P. (2014). Sensitive quantification of aflatoxin B1 in animal feeds, corn feed grain, and yellow corn meal using immunomagnetic bead-based recovery and realtime immunoquantitative-PCR. *Toxins*. 6(12): 3223-3237.
- Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D., Marr, K.A. (2005). *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 4:625-632.
- Bansal, J., Pantazopoulos, P., Tam, J., Cavlovic, P., Kwong, K., Turcotte, A.M., Lau, B.P., Scott, P.M. (2011). Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 28(6):767-74. Doi: 10.1080/19440049.2011.559279.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Fontana, A.J., Schmidt, S.J. & Labuza, T.P. (2007). *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. Blackwell publishing Ltd.
- Barnett, H.L., & Hunter, B.B. (2000). Illustrated genera of imperfect fungi, *The American Phytopathological Soc.* USA. P. 94-95.
- Bartoli, A. & Maggi, O. (1978). Four new species of *Aspergillus* from Ivory Coast soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 71(3), 383–394.
- Becerra, I.C., Díaz, A.M., García, E.R., Giraldo, J. A., Maluendas, A.V., Quintero, L.E., Reina, D.M., Ortegón, M.R., Samacá, H.A., Viveros, J.S. (2019). Análisis situacional cadena productiva del arroz en Colombia. Unidad de planificación rural agropecuaria (UPRA).

- Bennett, J. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497 – 516.
- Berek, L. Petri, I., Mesterházy, B., Téren, J. and Molnár, J. (2001). Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 15: 25-30.
- Bhatnagar, D., Yu, J. & Ehrlich, K.C. (2002). Toxins of filamentous fungi. In M. Breitenbach, R. Cramer & S. B. Lehrer (Eds.), *Fungal allergy and pathogenicity* (Vol. 81, pp. 167–206). S Karger Ag.
- Blanco, A.O. (2014). Agronomía del cultivo del arroz en riego por aspersión: variedades, riego, fertilización y control de malas hierbas. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Departamento de Producción Vegetal y Ciencia Forestal. Universidad de Lleida. Lleida. España.
- Blandon, J.C. (2011). Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo en el pienso de animales de renta. Tesis doctoral. Programa de producción animal del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Beckwith, A.C., Vesonder, R.F. and Ciegler, A. (1975). Action of weak bases upon aflatoxin B1 in contact with macromolecular reactants. *J Agric Food Chem* 23: 582 – 587.
- Bennett, J. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497 – 516.
- Bilgrami, K. and Sinha, K. (1992). Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. pp. 59 – 86. En: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar, D. *et al.*, editores. Marcel Dekker, New York.
- Blunden, G., Roch, O., Rosers, D., Coker, R., Bradburn, N. and John, A. (1991). Mycotoxins in Food. *Medical Laboratory Sciences* 48: 271 – 282.
- Bräse, E., Encinas, A., Keck, J. & Nising, C.F. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.* 109, 3903-3990.
- Brechbuehler-Bader, S., Buechi, G. & Milne, G. (1967). The absolute configuration of the aflatoxins. *Journal of Organic Chemistry*, 32(8), 2641–2642.
- Bryden, W.L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*. 173(1), 134- 158.
- Büchi, G. & Rae, I.D. (1969). Th estructure and chemistry of aflatoxins. En *Aflatoxins*. Goldblatt, L.A. (Ed) Academic Press, New York, USA. Pp. 55 -75.
- Butler, W.H. (1974). Aflatoxin. En: Purchase, I.F.H. Ed. *Mycotoxins*. Ámsterdam. Elsevier. Pp. 1 .28.

- Buyukunal, S.K., Tolga, K., Gurhan, R.C. (2010). Occurrence of AF, AFB₁, OTA in Rice Commercialized in Eastern Turkey. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 19, No. 5, 907-912.
- Cabañes, F., Abarca, L., Bragulat, M., Catellá, G. (2007). Micotoxinas en Alimentos. Especies productoras de micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 29-61.
- Cabello, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Editorial Médica Panamericana.
- Cadena, A.M.P. (2018). Gestión del agua para riego en prácticas de agricultura desde la complejidad ambiental. Fundación Universidad de América. Facultad de Educación Permanente y Avanzada. Especialización en Gestión Ambiental. Bogotá, Colombia.
- Carriazo, F., Ibáñez A.M., & García M. (2003). Valoración de los beneficios económicos provistos por el Sistema de Parques Nacionales Naturales: Una aplicación para el análisis de transferencia de beneficios. Bogotá, Colombia.
- Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola. Primera edición. Universidad Nacional de Salta. Argentina.
- Carvajal, M. (2010). Investigación sobre aflatoxinas ¿Para qué? Departamento de Botánica. Instituto de Biología, UNAM. 5 pp.
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 109–120.
- Cary, J.W., Chang, P.K. & Bhatnagar, D. (2001). Clustered metabolic pathway genes in filamentous fungi. *Applied Mycology and Biotechnology*, 1, 165–198.
- Castaño, J. & Zepeda, J. (2001). Microorganismos asociados con granos almacenados de arroz, maíz, frijol, soya, y chile y efectividad del tratamiento químico de la semilla. *Ceiba* 28(1): 59-65.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. (2005). Morfología de la planta de arroz. Guía de estudio. Cali, Colombia.
- Céspedes, A.E., Díaz, G.J. (1997). Analysis of aflatoxins in poultry and pig feed and feedstuffs used in Colombia. *Journal of AOAC International* 80, 1215.
- Chatel, M., Guimarães, E.P., Ospina, Y., Rodríguez, F. y Lozano, V.H. (2010). Mejoramiento de poblaciones de arroz de secano empleando selección recurrente y desarrollo de variedades. In: Degiovanni, V.B., Martínez, C.P.R., y Motta, F.O. (eds). Producción Eco-eficiente del Arroz en América Latina. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT No. 370. Cali, Colombia. Pp: 207-222.

- Chauhan, Y., Tatnell, J., Krosch, S., Karanja, J., Gnonlonfin, B., Wanjuki, I., Wainaina, J., y Harvey, J. (2015). An improved simulation model to predict pre-harvest aflatoxin risk in maize. *Field Crops Research*. 178:91-99. Doi:10.1016/j.fcr.2015.03.024.
- Chica, J., Tirado, Y.C. y Barreto, J.M. (2016). «Indicadores de competitividad del cultivo del arroz en Colombia y Estados Unidos.» *Revista de Ciencias Agrícolas* 33, N° 2: 16-31.
- Christensen, C.M. (1974). Storage of cereal grains and their products. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul. 549 pp.
- Codex Alimentarius. (1995). Norma del Codex para el arroz. Codex Standard 198-1995.
- Cómbita, P.A. & Mildenberg, O.S. (2009). Detección de Aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de Elisa. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá. Colombia.
- Commission Europea. (2006). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*; 364:5-24.
- Commission Europea. (2007). Reglamento No. 1126/2007, que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos del maíz.
- Commission Europea (2010). Reglamento No. 165/2010 de la Comisión, de 26 de febrero de 2010., que modifica, en lo que respecta a las aflatoxinas, el Reglamento (CE) No. 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Corrales, R.L., Sánchez, L.L. y Quimbayo, S.M. (2017). Microorganismos potencialmente fitopatógenos en aguas de riego proveniente de la cuenca media del río Bogotá. *NOVA*. 16(29): 71 -89.
- Cotty, P.J. (1994). Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavi* group fungi. *Mycopathologia* 125: 157 – 162.
- Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S. and Elias, K.S. (1994). Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. En: Powell, K.A., Renwick, A. and Peberdy, J. F. (Eds.), *The genus Aspergillus*. Plenum Press. N.Y. pp. 1-27.
- Cotty, P.J. y Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 109-115.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST) (2003). *Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems*. Ames, Iowa. USA.

- Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127: 19-28.
- Crous, P.W. (2004). Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus. *Studies in Mycology*. 50(1):195-214
- De Iongh, J. Beerthuis, R.K. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 65 (548-51).
- De Jimeno, M., Ruiz, N. and Peña, N. (1980). Incidence of Aflatoxins in Animal Feedstuffs: A Decade's Scenario in India. *Journal of AOAC International*, 78 (3): 693 – 698.
- Detroy, R. (1971). Aflatoxin and related compounds. pp. 4-178. En: *Microbial Toxins* vol. 6. Ciegler A. et al., editores. Academic Press, New York.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE -. (2014). Dirección de Síntesis y Cuentas Nacionales DSCN. Grupo de cuentas satélite. Cuenta satélite piloto de la agroindustria del arroz 2005-2012. Bogotá. Colombia.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE -, Federación Nacional de Arroceros – Fedearroz -, Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado – ENAM-. (2017). Boletín Técnico. Bogotá. Colombia.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE - & Federación Nacional de Arroceros – Fedearroz -. (2017). IV Censo Nacional Arrocerero Año 2016. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) y Federación Nacional de Arroceros (FEDEARROZ).
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE -, Federación Nacional de Arroceros – Fedearroz -, Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado – ENAM-. (2018). Boletín Técnico. Bogotá. Colombia.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística – DANE -, Federación Nacional de Arroceros – Fedearroz -, Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado – ENAM-. (2019). Boletín Técnico. Bogotá. Colombia.
- Departamento de Nutrición y Dietética. DND. (2003). El Arroz. Área de Antropología Alimentaria. Facultad de Medicina. Universidad de Colombia. 20p.
- Desjardins, E., & Proctor, R.H. (2007). Molecular biology of Fusarium mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 119(1-2):47–50. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024.
- Detroy, R.W. (1971). Aflatoxin and related compounds. Pp. 4 – 178. En: *Microbial Toxins*. Vol. 6. Ciegler, A. *et al.*, editors. Academic Press. New York.
- Devi, Q. and Polasa, H. (1987). Interference in toxin production among toxigenic *Aspergillus* species. *Journal of Stored Products Research* 23: 149 – 150.

- Diagnóstico del mercado del arroz en Colombia. (2012). Superintendencia de Industria y Comercio.
http://www.sic.gov.co/recursos_ser/documentos/publicaciones/pdf/Arroz2012.pdf
- Díaz, G. and Céspedes, A. (1996). Natural occurrence of zearalenone in feeds and feedstuffs used in poultry and pig nutrition in Colombia. *Mycotoxin Research*; 13: 81-8738
- Díaz, G.J., Perilla, N., Rojas, Y. (2001). Occurrence of aflatoxins in selected Colombian foods. *Mycotoxin research*; 17(1):15-20.
- Díaz, G.J., Krska, R. & Sulyok, M. (2015). Mycotoxins and cyanogenic glycosides in staple foods of three indigenous people of the Colombian Amazon. *Food Addit Contam Part B. Surveill.* 8(4): 291-7. Doi: 10.1080/19393210.2015.1089948.
- Díaz de Castro, F.J., Restrepo, M.A., Rojas, W. (2007). Microbiología de las infecciones humanas. Primera edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.
- Diekman, M.A. & Green, M.L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock, págs 1615-1627.
- Diener, U.L. & Davis, N.D. (1970). Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *A. flavus* in stored peanuts. *Journal American Oil Chemistry Society*. Vol 47 pp: 347 -351.
- D'Mello, J.P.F & Mac Donal, A.M.C. (1997). Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 155 – 166.
- Dohnal, V., Wu, Q. & Kuča, K. (2014). Metabolism of aflatoxins: Key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Archives of Toxicology*, 88(9), 1635–1644. Doi.org/10.1007/s00204-014-1312-9
- Duque, O.S., Hernández, E.N., Ortiz, B.P., Toro, H.A., Forero, E.O., Pulido, C.A., Ramos, M.H., Díaz, A.M., Velásquez, Z.M. (2019). Línea base cadena productiva del cultivo de arroz. Unidad de Planificación Rural Agropecuaria (UPRA). Bogotá. Colombia.
- Durán, R.D. (2015). Caracterización del sistema de presión de selección por incremento progresivo de la concentración del filtrado crudo (FC) *in vitro*, para la obtención de variantes resistentes de arroz (*Oryza sativa* L.) a *Pyricularia grisea*. Universidad de Carabobo. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. Departamento de Biología. Naguanagua, Venezuela.
- Eaton, D.L. & Gallagher, E.P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34: 135-172.
- Ehrlich, K. & Cotty, P.J. (2004). An isolate *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:473-478.

- Ehrlich, K.C. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5:50-9.
- Eley, R. (1992). Intoxicaciones Alimentarias en Etiología Microbiana. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 280 p.
- Ellis, H. (1987). Series in food science and technology. Natural toxicant in foods: progress and prospects. Editado por D.H. Watson. Alemania.
- Ellis, W., Smith, J., Simpson, B. and Oldham, J. (1991). Aflatoxins in food: Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30(3): 403-439.
- Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM). (2017). Departamento Administrativo Nacional de Estadística –DANE-. <http://www-dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-de-arroz-mecanizado>.
- Encuesta Nacional de Arroz Mecanizado (ENAM). (2018). Departamento Administrativo Nacional de Estadística –DANE-. <http://www-dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-de-arroz-mecanizado>.
- Eppley, R.M. (1968). Screening method for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin. *J Assoc Off Anal Chem* 51: 74 -78.
- ERIA-INS. (2015). Evaluación de riesgo de carcinoma hepatocelular en población colombiana por consumo de arepa de maíz contaminada con aflatoxina B1 (AFB1). <http://www.ins.gov.co>.
- Escrivá, L., Font, G and Manyes, L. (2015). In vivo toxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 2015. 78: p. 185-206.
- Espinal, C., Martínez, H. & Acevedo, X. (2005). La Cadena del Arroz en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica. 1991-2005. Documento de trabajo No. 52. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112141728_caracterizacion_arroz.pdf.
- Etzel, R.A. (2002). Mycotoxins. *JAMA* 287, 425–427. Doi: 10.1001/jama.287.4.425.
- European Food Safety Authority – EFSA -. (2011). Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal* 9(6):2197. 124 pp. Doi:10.2903/j.efsa.2011.2197.
- Fagbamila, I.O., Meseko, C.A., Adedeji, J.A., Ngulukun, S.S., Akalusi, Y., *et al.* (2010). *Fusarium graminearum* in a papilloma virus infected friesian bull in om, Nigeria: Case Report. *Nigerina Veterinary Journal* 31(4): 302-305.

- Faisal, K., Periasamy, V.S., Sahabudeen, S., Radha, A., Anandhi, R. and Akbarsha, M.A. (2008). Spermatotoxic effect of aflatoxin B1 in rat: extrusion of outer densefibres and associated axonemal microtubule doublets of sperm flagellum. *Reproduction* 135, 303–310. Doi: 10.1530/REP-07-0367.
- Fallah, A.A., Rahnama, M., Jafari, T. and Saei-Dehkordi, S.S. (2011). Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control* 22, 1653–1656. Doi: 10.1016/j.foodcont.2011.03.024.
- Federación Nacional de Arroceros. Fedearroz. (2008). III Censo Nacional Arrocerero. Bogotá, Colombia. 196 pp.
- Federación Nacional de Arroceros. Fedearroz. (2013). Historia del Arroz. En: <http://www.fedearroz.com.co/new/historiaarroz.php>.
- Federación Nacional de Arroceros. Fedearroz. (2014). Manejo integrado del cultivo de arroz. Produmedios.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M. *et al.* (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 136(5):E359-E86.
- Fernández, O., Vergara, B.S., Yapit, N. & García, O. (1985). Crecimiento y etapas de desarrollo de la planta de arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. FAOSTAT. (2017). Cantidades de producción de arroz, cáscara en el mundo, promedio 1994 – 2018. En: <http://fao.org/es/#data/QC/visualize>.
- Foroud, N.A. & Eudes, F. (2009). Trichothecenes in cereal grains. *International Journal of Molecular Science*, 10: 147-173.
- Franquet, B.J.M. (2018). El nuevo sistema de siembra en seco del arroz. Primera edición. ISBN: 978-84-697-5393-4. Edita: Comunitat de Regants – Sindicat Agrícola de l'Ebre. España.
- Franquet, B.J.M. & Borràs, P.C. (2004). Variedades y Mejora del Arroz (*Oryza sativa*, L.). Universitat Internacional de Catalunya. Escola Universitaria de Ciències Experimentals i Tecnologia. UIC – Campus de l'Ebre.
- Fredlund, E., Thim, A.M., Gidlund, A., Brostedt, S., Nyberg, M., Olsen, M. (2009). Moulds and mycotoxins in rice in Swedish retail. *Food Additives and Contaminants*, 26 (04), pp.527-533. Doi: 10.1080/02652030802562912
- Frisvad, J.C. & Larsen, T.O. (2015). Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 7859-7877.

- Gaffoor, I. & Trail, F. (2006). Characterization of Two Polyketide Synthase Genes Involved in Zearalenone Biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and environmental microbiology* 72: 1793-1799.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G. and Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 162–169. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I., Samson, R.A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: Samson, R.A. y Pitt, J.I. (Eds.). *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. New York. Plenum Press. P 55-64.
- García, M. (2005). *Tecnología de cereales*. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias. España.
- Gastón, A., Abalone, R., Cassinera, A., Lara, M. (2007). Modelización de la distribución de la temperatura y humedad en granos almacenados en los silos – bolsa. *Asociación Argentina de Mecánica Computacional I* (26): 3547 – 3571. Argentina.
- Geiser, D.M. (2004). Practical molecular taxonomy of fungi. In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*. Lange, L. & Tkacz, J. Ed. New York: *Kluwer Academic Publishers*. pp. 1-12.
- Gendy, S.M., Marth, E.H. (1989). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection* 44: 211-221 pp.
- Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili, A. (2008). Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in tunisian food. *Food Control*, 19, 921-924.
- Gil-Durán, C., Ravanal, M.C., Ubilla, P., Vaca, I., Chávez, R. (2018). Heterologous expression, purification and characterization of a highly thermolabile endoxylanase from the Antarctic fungus *Cladosporium* sp. *Fungal Biology* 121: 754-762.
- Gilmore, S., Gräfenhan, T., Seifert, K. (2007). Multiple copies of Cox1 in species of the Fungal Genus *Fusarium*. Canada.
- Gimeno, A. (1999). Revisión genérica del problema de los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal. Pp 1 -153. En www.mycotoxin.com.
- Gimeno, A. y Martins, M.L. (1987). Curso teórico práctico sobre micotoxinas y hongos toxicogénicos. Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología y Sanidad Animal en colaboración con la Asociación Española de Especialistas en Micología (AEEM). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España.
- Gimeno, A. & Martins, M.L. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. *Special Nutrients*, Ina. USA (Ed.) 3ª Edition. pp. 1 – 128.

- Giorni, P., Mazan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T. and Battiloni, P. (2007). Studies de *Aspergillus* section *Flavi* isolated in northern Italy from maize. *International Journal of Food Microbiology*. 113:330-338.
- Giray, B., Girgin, G., Engin, A.B., Aydın, S., Sahin, G. (2007). Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. *Food Control* 18 23–29. 10.1016/j.foodcont.2005.08.002.
- Goldblatt, L. (2012). Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications. Elsevier.
- Gómez, G. (1978). Utilización de las puliduras (polvillo) de arroz en raciones para cerdos en crecimiento y acabado. Centro Internacional de Agricultura Tropical (Ciat). Colombia. 26p.
- Gong, Q., Han, F., Dai, J., Liu, H., Guan, H., Yu, W. (2007). Rapid isolation and sequence analysis of the beta-tubulin gene from *Porphyraezoensis* (Rodophyta). *Journal of Applied Phycology*. Vol.; 17; p.1-5.
- González, F.J. (1985). Origen, taxonomía y anatomía de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.). In: Tascón J., Eugenio; García Durán, Elías (eds.). Arroz: Investigación y producción: Referencia de los cursos de capacitación sobre arroz dictados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Cali, CO. p. 47-64.
- González, M.N. (2005). Micotoxinas. Revisión general y situación actual. Universidad de Los Andes. Departamento de Ciencias Biológicas. Colombia.
- González, O.C. (2009). Metodología para el control de hongos y bacterias en sistemas de producción de forraje verde hidropónico. Centro de Investigación en Química Aplicada. Especialización en Química Aplicada. México.
- Global Rice Science Partnership – Grisp -. (2013). Rice almanac: source book for one of the most economic activities on Earth. (4th editio). Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute. Retrieved from. <http://irri.org/resources/publications/books/rice-almanac-4th-edition>.
- Groopman, J., Wogan, G.N., Roebuck, B.D. & Kensler, T.W. (1994). Molecular biomarkers for aflatoxins and their application to human liver cancer prevention. *Cancer Research*, 54, S171–S176.
- Gross-Steinmeyer, K., & Eaton, D.L. (2012). Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology*, 299 (2–3), 69–79. Doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.016.
- Gupta, R. and Sharma, V. (2011). Ameliorative effects of *tinospora cordifolia* root extracton histopathological and biochemical changes induced by aflatoxin-b (1) in mice kidney. *Toxicol. Int.* 18, 94–98. Doi: 10.4103/0971-6580.84259.

- Hack, A.G. (2008). Almacenamiento de granos, aireación y secado. Agrimedia.
- Hagler, W.M., Mirocha, J.R., Pathre, C.J. y Behrens, J.C. (1979). Identificación del isómero natural de zearalenol producido por *Fusarium roseum* 'Gibbosum' en cultivo de arroz. *Apl. Reinar. Microbiol.* 37, 848–853.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Heenan, C.N. *et al.* (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology* 1: 67:72.
- Hendrickse, R.G. (1997). Of sick Turkeys, Kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, Herion addicts and food poisoning: research on influence of aflatoxins on child health in the tropics. *J. Trop. Med. Parasitol.* 91, 87–93.
- Hernández, B.N. & David, R.P. (2005). Efectos del Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos en el Sub Sector Arrocero Colombiano. [Repositorio Digital]. Trabajo de grado. Administrador de Negocios Internacionales. Universidad del Rosario. Facultad de Administración. Bogotá. P.1-72.
- Hernández, R.S. (2006). El Sistema AIB (American Institute Of Baking) en el almacenamiento de cereales. Monografía. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. División de Ciencia Animal Departamento de Nutrición y Alimentos. México.
- Holvoet, K., Sampers, I., Seynnaeve, M., Uyttendaele, M., (2014). Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. *Int. J. Food Microbiol.* 171, 21–31.
- Horwitz, W. (2002). Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, 17th Ed.
- Hughes, D.M., Gahl, M.J., Graham, C.H., Grieb, S.L. (1999). Overt signs of toxicity to dogs and cats of dietary deoxynivalenol. *Journal of Animal Science* 77: 693-700
- Huong, B., Tuyen, L.D., Thanh, D.O., Tran, T.D., Madsen, H. & Brimer, L. (2016). Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. *Food Control* 70: 191-200. Doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.052.
- Inan, F., Pala, M., Doymaz I. (2007). Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. *J. Stored Prod. Res.* 43 425–429. 10.1016/j.jspr.2006.11.004.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. ICONTEC. (1996). Norma Técnica Colombiana NTC 1232: Método de análisis de aflatoxinas de ocurrencia natural (B1, B2, G1 y G2).

- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. ICONTEC. (2000). Norma Técnica Colombiana NTC 4881: Método de análisis de zearalenona de ocurrencia natural.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. ICONTEC. (2012). Norma Técnica Colombiana NTC 5961: Determinación de deoxinivalenol (DON) de harina de trigo blanca, harina de trigo integral y salvado de trigo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia / extracción en fase sólida.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. ICONTEC. (2017). Norma Técnica Colombiana 4458. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de Coliformes y *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorógenicos y cromogénicos.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias –INIAP-. (2010). Producción de arroz de calidad. Manual. p 25.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), (1993). WHO IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Toxins derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X. IARC, Lyon, France, 56: 397 – 444.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2006). WHO IARC. Disponible en <http://www.iarc.fr/>
- International Agency for Research on Cancer (IARC), (2015). Disponible en: <http://www.iarc.fr/>.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1982). Microorganismos de los alimentos. Técnica de análisis microbiológico. Vol 1. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Arino, A., Akram, N., & Zuber, M. (2012). Aflatoxin contamination in different fractions of rice from Pakistan and estimation of dietary intakes. *Mycotoxin Res.*, 28(3), 175–180. Doi.org/10.1007/s12550-012-0131-1.
- Iqbal, S.Z., Mustafa, H.G., Asi, M.R., Jinap, S. (2014). Variation in vitamin E level and aflatoxins contamination in different rice varieties. *Journal of Cereal Science*. Volume 60, Issue 2, Pages 352-355. Doi.org/10.1016/j.jcs.2014.05.012.
- Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Hanif, U., Zuber, M., Jinap, S. (2016). The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake. *Food Chemistry*. Volume 210, Pages 135-140. Doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.104.
- ISO 6887-1:2017. (2017). Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

- Ito, Y., Peterson, W., Wicklow, D., Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological Research* 105: 233-239.
- Jansen, C., Von Wettstein, D., Schafer, W., Kogel, K.H., Felk, A., Maier, F.J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 16892-16897.
- Jedidi, I., Cruz, A., González-Jaén, M.T., Said, S. (2018). Aflatoxins and ochratoxin A and their *Aspergillus* causal species in Tunisian cereals. *Food Addit. Contam. Part B surveill.* 10 (1), 51-58.
- Jiménez, H. Navarrete, J.L. y Botello E. (2014). Estudio numérico de la convección natural de calor y masa 2-D en granos almacenados en silos cilíndricos. *Agrociencia*: 38(2), 325-342.
- Jin, P.G., Han, Z., Cai, Z.X., Wu, Y.J., Ren, Y.P. (2010). Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using ¹³C¹⁵-deoxynivalenol as internal standard. *Food Addit. Contam.* 27, 1701–1713.
- Josephs, R.D., Derbyshire, M., Stroka, J. (2001). Trichothecenes: reference materials and method validation. *Toxicology Letters.* 153:23–132.
- Joshua, H. (1993). Determination of aflatoxins by reversed phase high-performance liquid chromatography with postcolumn in line photochemical derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 654: 247-254.
- Juárez-López, P., Bugarín-Montoya, R., Bojórquez-Serrano, J.I., Soto-Ceja, E. (2010). “Cambio climático y sus efectos en la agricultura del futuro”.
- Juliano, O. (1994). El arroz en la nutrición humana. Instituto internacional de investigación sobre el arroz (FAO). Roma. 178p.
- Kabak, B. (2009). The fate of mycotoxins during thermal food processing. *J Sci Food Agric.* 89: 549 – 554.
- Kana, J.R., Gnonlonfin, B.G., Harvey, J., Wainaina, J., Wanjuki, I., Skilton, R.A. *et al.*, (2013). Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. *Toxins (Basel)* 5, 884–894.
- Khan, S.J., Roser, D.J., Davies, C.M., Peters, G.M., Stuetz, R.M., Tucker, R. *et al.*, (2008). Chemical contaminants in feedlot wastes: concentrations, effects and attenuation. *Environ. Int.* 34, 839–859.

- Katsurayama, A.M., Martins, L.M., Iamanaka B.T., Fungaro, M.H.P., Silva J.J., Frisvad, J.C., Pitt, J.I., Taniwaki, M.H. (2018). Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in brazilian rice: from field to market. *Int J Food Microbiol.* 266:213–221.
- Kim, Y.T., Lee, Y.R., Jin, J., Han, K.H., Kim, H., Kim, J.C., Lee, T., Yun, S.H., Lee, Y.W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* 58: 1102-1113.
- Kim, D.H., Hong, S.Y., Kang, J.W., Cho, S.M., Lee, K.R., An, T.K., Lee, C. & Chung, S.H. (2017). Simultaneous Determination of Multi-Mycotoxins in Cereal Grains Collected from South Korea by LC/MS/MS. *Toxins*, 9(3), 106. Doi.org/10.3390/toxins9030106.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. (2001). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9^a Ed. CAB International, Oxon.
- Klich, M.A. & Samson, R.A. (1996). *Aspergillus* reference cultures. International Union of Microbiological Societies.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and Other Closely-Related Species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91, 99-108. Doi.org/10.1016/S0007-1536 (88)80010-X.
- Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergilli*. CBS, Utrecht, the Netherlands.
- Koch, H.J., Pringas, C., Maerlaender, B. (2006). Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. *Eur. J. Agron.* 24, 357–366.
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., Van Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J. and Wösten, H.A.B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studyes en Micology* 74:1–29.
- Kumagai, S., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S., Sato, T., Saito, S., Yoshiike, N. & Sugita-Konishi, Y. (2008). Aflatoxin and Ochratoxin A contamination of retail food and intake of these mycotoxins in Japan. *Food Additives and Contaminants*. Vol 25 N°9, 1101-1106. Doi: 10.1080/02652030802226187
- Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J., Wicklow, D.T. (1986). DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*; 78:955-959.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. & Hesseltine, C.W. (1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53:147-158.
- Lacey, J. (1989). Pre and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of food and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology. Symposium Supplement*, 11S – 25S.

- Lacey, J. & Magan, N. (1991). Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Chelkowski, J. (Ed). Amsterdam: Elsevier. Pp: 77 -118.
- Lacey, J., Ramakrishna, N., Hamer, A., Magan, N., Marfleet, L.C. (1991). Grain fungi. Handbook of applied mycology: foods and feeds. Marcel Dekker, Inc., New York. Vol 3, 121 – 178 pp.
- Lai, X., Liu, R., Ruan, C., Zhang, H., Liu, C. (2014). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control*. 50:401-4. Doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.029.
- Lasso, E.L. (1991). Zonificación agroclimática de los cultivos de mayor importancia económica del territorio colombiano (Primera parte: cultivo del arroz). Instituto colombiano de hidrología, meteorología y adecuaciones de tierra –HIMAT-. Colombia. p 3 -186.
- Lee, T., Lee, S.H., Lee, S.H., Shin, J.Y., Yun, J.C., Lee, Y.W., Ryu, J.G. (2011). Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in rice and its milling by-products in Korea. *J Food Prot.*; 74(7):1169-74. Doi: 10.4315/0362-028X
- Leszczyńska, J., Masłowska, J., Owczarek, A., Kucharska, U. (2000). Determination of aflatoxins in food products by the ELISA method. *Czech Journal of Food Science*, 19: 8-12.
- Leslie, J.F. & Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blacwell. Iowa USA. 388 p.
- Lillehoj, E. (1992). Aflatoxin: genetic mobilization agent. pp. 1 – 22. En: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar, D. *et al.*, editores. Marcel Dekker, New York.
- López, G., Park, D., Phillips, T. (1999). Sistema integrado de gestión de micotoxinas. Tercera conferencia internacional sobre micotoxinas. FAO/OMS/PMA sobre micotoxinas. Túnez, Túnez.
- López-Vásquez, J.M., Marulanda, M.L., López, A.M. (2013). Factores climáticos y su influencia en la expresión de enfermedades fúngicas en cultivares de Heliconias. *Universitas Scientiarum* 18(3): 331344. Doi: 10.11144/Javeriana.SC18-3.fcie.
- Lukubye, B. & Andama, M. (2017). Bacterial analysis of selected drinking water sources in Mbarara municipality, Uganda, *J. Water Resour. Prot.* 9 (2017) 999–1013, Doi: 10.4236/jwarp.2017.98066.
- Luo, Y., Zhou, Z., Yue, T. (2017). Synthesis and characterization of nontoxic chitosan-coated Fe₃O₄ particles for patulin adsorption in a juice-pH simulation aqueous. *Food Chemistry*. Volume 221, 15 April 2017, Pages 317-323.

- Luque, J. (2009). La Producción de Arroz. En: Portal besana Agrícola. (Portalbesana.es/información).
- Lutfullah, G., Hussain, A. (2012). Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. *Food Control*, Volume 23, Issue 1, Pages 32-36. Doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.004.
- McEgan, R., Mootian, G., Goodridge, L.D., Schaffner, D.W. and Danyluk, M.D. (2013). Predicting Salmonella populations from biological, chemical, and physical indicators in Florida surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4094–4105. Doi: 10.1128/AEM.00777-13.
- MacEvoy, T.G., Robinson, J.J., Ashworth, C.J., Rooke, J.A., Sinclair, K.D. (2001). *Theriogenology*. 55. p. 113 – 129.
- Magan, N. and Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 131–139. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034
- Majeed, S., Iqbal, M., Asi, M.R., Iqbal, S.Z. (2013). Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. *Journal of Cereal Science*; 58(3):446-50.
- Majeed, S., De Boevre, M., De Saeger, S., Rauf, W., Tawab, A., Fazal, E.H., Rahman, M., Iqbal, M. (2018). Multiple Mycotoxins in Rice: Occurrence and Health Risk Assessment in Children and Adults of Punjab, Pakistan. *Toxins (Basel)*; 10(2). Pii: E77. Doi: 10.3390/toxins10020077.
- Mannaa, M., Kim, K.D. (2018). Effect of temperature and relative humidity on growth of *Aspergillus* and *Penicillium* spp. and biocontrol activity of *Pseudomonas protegens* AS15 against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in stored rice grains. *Mycobiology*, 46: 287–295.
- Makun, H.A., Dutton, M.F., Njobeh, P.B., Mwanza, M., Kabiru, A.Y. (2011). Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotoxin Res.*, 27(2):97-104. Doi: 10.1007/s12550-010-0080-5.
- Marín, G.P. (2010). Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas de especies de *Fusarium*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III. Madrid. España.
- Marín, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60, 218–237.
- Martínez, A.J. *et al.*, (1994). Distribution of ammonia/aflatoxin reaction products in corn following exposure to ammonia decontamination procedure. *Food Additives and Contaminants* 11: 659 – 667.

- Martínez, M.M., Vargas Del Río, L.M. & Gómez, V.M. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12(2), 89 – 109.
- Mazzani, C., Luzón, O., Chavarry. M. (2004). *Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela. *Entomotropica* 19:157 – 159 pp.
- McCormick, S.P., Alexander, N.J. and Proctor, R.H. (2004). *Fusarium Tri4* encodes a multifunctional oxygenase required for trichothecene biosynthesis. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 636-642.
- McLaughlin, J.E., Bin-Umer, M.A., Tortora, A., Mendez, N., McCormick, S., Tumer, N.E. (2009). A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a critical role for the mitochondria in the toxicity of a trichothecene mycotoxin. *PNAS* 106, 21883–21888.
- Medina, F., Irey, J., Roque, M. (2002). Determinación de aflatoxinas en algunos productos naturales utilizando el medio agar coco y Elisa ligada. *Ciencia e Investigación* 2: 46-54.
- Medina, A., Rodríguez, A. and Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Front. Microbiol.* 5:348. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00348.
- Medina, A., *et al.* (2017). Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology*, 256: 36–44.
- Merhej, V. & Raoult, D. (2012). Rhizome of life, catastrophes, sequence exchanges, gene creations, and giant viruses: how microbial genomics challenges Darwin. *Front Cell Infect Microbiol.* 28; 2:113. Doi: 10.3389/fcimb.2012.00113.
- Miller, J.D. (1995). Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J. Stored Prod. Res.* 31: 1–16.
- Miller, J.D. *et al.*, (2001). Desoxivalenol: a 25 year perspectiva on a trichothecene of agricultural importance. pp. 310 – 320 En: *Fusarium*. SUMMERELL B.A. *et al.*, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Minervini, F. and Dell'Aquila, M.E. (2008). Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int. J. of Molecular Sci.* 9: 2570-2584.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). (2010). Boletín de Análisis por Producto. No 1. Bogotá: Dirección de Política Sectorial-Grupo de Análisis Sectorial.
- Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS). (2013). Resolución Número 2674 de 2013.
- Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS). (2014). Resolución Número 2671 de 2014.

- Minter, D.W., Hawksworth, D.L., Onions, A.H.S., Kozakiewicz, Z. (1985). Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium*. En: Samson, R.A. y Pitt, J.I. (Eds.). *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, New York, Plenum Press, p 71-82.
- Miranda, D.L., López, C.C., Benítez, R.I., Mejía, C.J. (2016). Desarrollo radical y rendimiento en diferentes variedades de trigo, cebada y triticale bajo condiciones limitantes de humedad en el suelo. *Terra Latinoam.* 34:393-407.
- Mirocha, C.J., Schauerhamer, B. and Pathre, S.V. (1974). Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J Assoc off Anal Chem* 75: 1104 – 1110.
- Mohammed, A.M. and Metwally, N.S. (2009). Antiaflatoxicogenic activities of some aqueous plant extracts against AFB1 induced renal and cardiac damage. *J. Pharmacol. Toxicol.* 4, 1–16. Doi: 10.3923/jpt.2009.1.16
- Moquete, C. (2010). Guía Técnica: El Cultivo de Arroz. Serie Cultivos No. 37. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF). República Dominicana. 166p.
- Moreno, E. (1988). Manual para la identificación de hongos de granos y sus derivados. UNAM. México, D.F. 109 p.
- Moreno, E. y Gil, M. (1991). La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. México, D.F. 42 p.
- Moreno, J. (2004). Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis para obtener el grado de Maestría en Microbiología. FES-Cuautitlán-UNAM. México. D.F.
- Morris, N.L.F. (2011). Determinación de aflatoxinas en muestras de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana mediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. p. 50.
- Mosiello, L. & Lamberti, I. (2011). Biosensors for Aflatoxins Detection. [Aut. libro] and Lamberti Ilaria Mosiello L. [ed.] Dr Irineo Torres-Pacheco. *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control.* p. 147-160.
- Moss, M.O. (1991). The environmental factors controlling mycotoxin formation. Pp. 37-56. En: Smith, J.F., Henderson, R.S., eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca ratón.
- Mousa, W., Farinazleen, M.G., Jinap, S., Hasanah, M.G., Son, R. and Abd, E.S. (2016). Temperature, water activity and gas composition effects on the growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Stored Products Research.* 1-7. pp 49 – 55. Doi.org/10.1016/j.jspr.2016.01.003.

- Mugal, M.J., Peng, X., Kamboh, A.A., Zhou, Y., Fang, J. (2017). Aflatoxin B1 Induced Systemic Toxicity in Poultry and Rescue Effects of Selenium and Zinc. Springer Science+Business Media New York. Doi 10.1007/s12011-016-0923-9
- Nguyen, M.T., Tozlovanu, M., Tran, T.L., Pfohl-Leszkowicz, A. (2007). Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin a in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food chemistry*; 105(1):42- 7.
- Nguyen, T.T.X. & Dehne, H.W. (2015). Factors affecting the infection of maize leaves by *Fusarium* species. *J Sci* 3:1–11
- Nguyen, T.T.X. (2014). Comparative studies on the infection and colonization of maize leaves by *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum* and *F. verticillioides*. Inaugural-Dissertation 2014, Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz-Phytomedizin, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, hss.ulb.uni-bonn.de/2014/3470/3470.pdf. 154 pp
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 53, n. 1, p. 17–37. Doi.org/10.1006/pmpp.1998.0170.
- Nierman, W.T. (2008). Mycotoxin production and prevention of aflatoxin contamination in food and feed. *Aspergilli Genomics Medical Aspects Biotechnology & Research Methods*, 8(8): 84–88.
- Niessen, M.L. & Vogel, R.F. (1998). Group specific PCR-detection of potential trichothecene producing *Fusarium* spp. in pure cultures and cereal samples. *Systematics and Applied Microbiology*. 21: 628– 631.
- Northolt, M. & Van Egmond, H. (1982). Contamination of ripening chees with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. In: Proceedings of a fourth meeting on micotoxinas in animal disease. Patterson, D. y Gray, D. (editors). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Alnwick, Northumberland. Pp: 90- 92.
- Nucci, M. & Anaissie, E. (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews* 20(4): 695-704.
- Nunes, I., Magagnin, L., Bertolin, G., Furlong, E.B. (2003). Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [Online]. Vol. 23, n.2, pp.190-194. ISSN 0101-2061. Doi.org/10.1590/S0101-20612003000200015
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, Å. Klemsdal, S.S. (2008). Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genet Biol.*; 45:1514–1522.

- Ok, H.E., Kim, D.M., Kim, D. and Chun, H.S. (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control* 37: 284-291. Doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.020.
- Olivares, R., Alfaro, J., Díaz, C., Thompson, L. (2005). Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. *Revista Chilena de Infectología* 22(4): 356–360.
- Olmos, S. (2006). Apunte de morfología, fenología, ecofisiología y mejoramiento genético del arroz. Cátedra de Cultivos II. Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE. Argentina.
- Onyedum, S.C., Adefolalu, F.S., Muhammad, H.L., Apeh, D.O., Agada, M.S., Imienwanrin, M.R., Makun, H.A. (2020). Occurrence of major mycotoxins and their dietary exposure in North-Central Nigeria staples. *Scientific African*. Vol 7. Doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00188.
- Onyeke, C.C. (2020). Review of mycotoxins in foods in Nigeria. *Food Control*. Vol 118. Doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107376
- Organización Panamericana de la Salud OPS. (1997). Guías para la calidad del agua potable. Vol. 2, criterios relativos a la salud y otra información base. Publicación científica No. 506. Washington. EE.UU.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO -. (1993). Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Chile.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO -. (1991). Micotoxinas, rol e importancia en nutrición acuícola. <http://www.fao.org/3/ab482s/AB482S13.htm>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO -. (2004). El Arroz y la Nutrición Humana. <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf> - 49k.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO -. (2017). «SMA Julio 2017.» Seguimiento del mercado del arroz de la FAO XX, N° 2. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Images/RMM/SMA_Jul17.pdf
- Ortoneda, M., Guarro, J., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Roncero, M.I., Mayayo, E., Di Pietro, A. (2004). *Fusarium oxysporum* as a Multihost Model for the Genetic Dissection of Fungal Virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity*; 72: 1760-66.
- Osman, N.A., Abdelgadir, A.M., Moss, M.O., Bener, A. (1999). Aflatoxin contamination of rice in the United Arab Emirates. *Mycotoxin Research* 15, 39.

- Osweler, G.D. (2000). Mycotoxins: Contemporary issues of food animal health and productivity. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 16 (3): 511-530.
- Oueslati, S., Romero-Gonzalez, R., Lasram, S., Frenich, A.G., Vidal, J.L. (2012). Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 50(7):2376-2381.
- Pachepsky, Y., Shelton, D., Dorner, S., & Whelan, G. (2014). Can *E. coli* or thermotolerant coliform concentrations predict pathogen presence or prevalence in irrigation waters? *Critical Reviews in Microbiology*, 1–10. Doi:10.3109/1040841x.2014.954524.
- Palmgren, m.S. & Hayes, A.W. (1987). Aflatoxins in foods. En: *Mycotoxins in foo*. Editorial Academic Press: London, p. 65-95.
- Park, J.W., Choi S.Y., Hwang, H.J., Kim, Y.B. (2004). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology* 103, (3), 305.
- Parry, D.W. & Nicholson, P. (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*. 45: 383-391
- Parsons, D.B. & Berlijn, J.D. (2003). Arroz. Manuales para educación agropecuaria. Producción vegetal. Editorial Trillas S.A. México. 62 p.
- Pascale, M, (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. (117):15-25.
- Paterson, R. & Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43 1902–1914. 10.1016/j.foodres.2009.07.010
- Paterson, M. & Lima, M. (2011). Further mycotoxin effects climate change. *Food Research International* 44: 2555 – 2566.
- Payne, G.A. & Brown, M.P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 329-362.
- Pérez, G.A., Espinosa, A.E., Terán, V.O. (2016). Seguridad alimentaria, actores territoriales y desarrollo endógeno. Ediciones Laberinto. ISBN: 978-607-9695-54-5. México.
- Peterson, S., Ito, Y., Horn, B., Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93:689-703 pp.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D., Varga, J. & Samson, R.A. (2008). Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 725–735.

- Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C., Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*. 109, 731–742.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (2009). The ecology of fungal food spoilage. In *Fungi and food spoilage*. Springer Science. Doi: 10.1007/978-0-387-92207-2.
- Pleadin, J. (2015). Mycotoxins in grains and feed-contamination and toxic effect in animals. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 31(4): 441-456.
- Pozas, R.S. & Abad, A.J. (2010). Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros. Proyecto final de carrera de Ingeniería Técnica Industrial Especialidad Química. Universidad Politécnica de Cataluña.
- Prietto, L., Moraesa, P.S., Kraus, R.B., Meneghetti, V., Fagundes, C.A.A and Furlong, E.B. (2015). Post-harvest operations and aflatoxin levels in rice (*Oryza sativa*). *Crop Protection* 78: 172-177.
- Pringle, A., Baker, D.M., Platt, J.L., Wares, J.P., Latge, J.P., Taylor, J.W. (2005). Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59:1886-1899.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P. (1995). Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 593-601.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Organización Mundial de la Salud. (1983). Criterios de Salud Ambiental 11. Micotoxinas. Publicación Científica No. 453. Washington, Estados Unidos.
- Rangel, M.E.J. (2019). Caracterización morfológica y molecular de aislados nativos de *Aspergillus flavus* eficaces para el control de la contaminación con micotoxinas del ensilaje de maíz en Aguascalientes. Tesis doctoral. Centro de Ciencias Básicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Reddy, G. and Reddy, S. (1992). Production of roridin by *Myrothecium roridum* in mixed culture. *Indian Journal of Microbiology* 31: 281 – 284.
- Reddy, K.R., Reddy, C.S., Muralidharan, K. (2009). Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B in rice in India. *Food Microbiol*, 26(1):27-31. Doi: 10.1016/j.fm.2008.07.013.
- Reiter, E., Zentek, J., Razzazi, E. (2009). Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Mol. Nutr. Food Res.* 53 508–524. 10.1002/mnfr.200800145.
- Reiter, E.V., Vouk, F., Böhm, J., Razzazi-Fazeli, E. (2010). Aflatoxins in rice—a limited survey of products marketed in Austria. *Food Control*. 21(7):988-91.

- Reyes, A., Alejo, J.C., Ruiz, E., Suárez, J. (2012). Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* spp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad* 16(3): 161–165.
- Richardson, K.E., Hagler, J.R. y Mirocha, C.J. (1985). La producción de zearalenona, α - y β -zearalenol por *Fusarium* spp. en el cultivo del arroz. *J. Agric. Food Chem.* 33, 862–866.
- Riddel, R.W. (1950). Permanent stained micological preparations obtained by slide cultura. *Mico.* 43: 265-270.
- Rodríguez, B.L.A. (1996). Impact of agronomic factor on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern México. *Plant Disease* 80:988-993.
- Rodríguez, J.H. (2004). Fertilización del cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Disponible en www.mag.go.cr/congreso_agronomico_xi/a50-6907-III_123.pdf.
- Rodríguez, M.V. (2007). Determinación de la Composición Química y Propiedades Físicas y Químicas del Pulido de Arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencia de los Alimentos. Universidad Austral de Chile.
- Rodríguez, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N., Venancio, A. (2007) Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current research and Educational topics and Trends in Applied Microbiology. Mendez-Vilas (Ed). 527-534.
- Rodríguez, P., Soares, C., Kozakiewicz, Z., Paterson, R., Lima, N. and Venancio, A. (2007). Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Méndez-Vilas (Eds.). 527-534 pp.
- Ruadrew, S., Craft, J., Aidoo, K. (2013). Occurrence of toxigenic *Aspergillus* spp. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food Chem Toxicol* 55: 653–8.
- Ruiz, M. & Font, G. (2007). Micotoxinas en Alimentos. Toxicidad y Evaluación de Riesgos. Díaz de Santos. España. 15-27 p. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Safara, M., Zaini, F., Hashemi, S.J., Mahmoudi, M., Khosravi, A.R., Shojai-Aliabadi, F. (2010). Aflatoxin detoxification in rice using citric acid. *Iranian J Publ Health.* 39(2):24-2962.
- Sales, A.C. & Yoshizawa, T. (2005). Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus* section Flavi contamination in rice and its byproducts from the Philippines. *Food Additives and Contaminants*, London, v. 22, n. 5, p. 429-436. PMID: 16019814. Doi.org/10.1080/02652030500058387

- Samson, R.A., Hong, S.B., Peterson, S.W., Frisvad, J.C., Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59:147-207.
- Samson, R.A. and Varga, J. (2007). *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology* 59:1-206.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsub, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. and Frisvad, J.C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 78:141-173.
- Samsudin, N.I. & Abdullah, N. (2013). A preliminary survey on the occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins contaminating red rice at consumer level in Selangor, Malaysia. *Mycotoxin Res.* 29(2):89-96. Doi: 10.1007/s12550-012-0154-7.
- Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. (2000). Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual. *Revista Iberoamericana de Micología*. Vol., 17. P 69 – 75.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Santin, E. (2005). Mould growth and mycotoxin production. In: *The mycotoxin Blue Book*. (D.E. Díaz, ed.) Nottingham University Press, pp. 225 – 234.
- Santini, A. & Ritieni, A. (2013). Aflatoxins: Risk, Exposure and Remediation. In M. Razzaghi-Abyaneh (Ed.), *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. InTech.
- Sarver, B.A.J., Ward, T.J., Gale, L.R., Broz, K., Kistler, H.C., Aoki, T., Nicholson, P., Carter, J., O'Donnell, K. (2011). Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal Genet Biol.*; 48:1096–1107.
- Savi, G.D., Piacentini, K.C., Rocha, L.O., Carnielli-Queiroz, L., Furtado, B.G., Scussel, R., Zanoni, E.T., Machado-De-Ávila, R.A., Corrêa, B.; Angioletto, E. (2018). Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. *Int J Food Microbiol.* 270:5-13. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.004.
- Schilling, A.G., Möller, E.M. and Geiger, H.H. (1996). Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86: 515-522.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N. and Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *A. flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 231–237. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.026

- Schmidt-Heydt, M., Rufer, C.E., Abdel-Hadi, A., Magan, N. and Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. *Mycotoxin Res.* 26, 241–246. Doi: 10.1007/s12550-010-0062-7.
- Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., and Magan, N. (2011). Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by two *Fusarium* species. *J. R. Soc. Interface* 8, 117–126. Doi: 10.1098/rsif.2010.0131.
- Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Van Egmond, H.P., De Mul, A., Boon, P.E. and Van Klaveren, J.D. (2005). Determination of trichothecenes in duplicate diets of young children by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *Food Additives and Contaminants*, 22:1, 48 – 55.
- Secretaría de Agricultura y Ganadería –SAG- (2003). Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA). Manual técnico para el cultivo de arroz. (*Oryza sativa*) (para extensionistas y productores). Comayagua, Honduras.
- Selvaraj, J.N., Zhao, Y., Sangare, L., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Xue, X., Liu, Y., (2015). Limited survey of deoxynivalenol in wheat from different crop rotation fields in Yangtze-Huaihe river basin region of China. *Food Control*, 53, 151-155.
- Selvig, K. & Alspaugh, J.A. (2011). pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. *Mycobiology*. Dec;39(4):249-56. Doi: 10.5941/MYCO.2011.39.4.249.
- Sepúlveda, C. & Piontelli, E. (2005). Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación argentina: énfasis en la sección *Flavi*. *Boletín Micológico* Vol. 20:41-55.
- Sharmila, B.G., Kumar, G. and Murugesan, A.G. (2009). Ethanolic leaves extract of *Trianthema portulacastrum* L. ameliorates aflatoxin B (1) induced hepatic damage in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 24, 250–256. Doi: 10.1007/ s12291-009-0074-2.
- Shephard, G.S. (2008). Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Additives and Contaminants* 25, No. 10: 1246–1256.
- Shephard, G.S. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chem Soc Rev*; 37:2468-2477.
- Shephard, G.S. (2011). *Fusarium* mycotoxins and human health. *Plant Breeding and Seed Science* 64: 113 – 121.
- Shotwell, O.L., Goulden, M.L. and Bennett, G.A. (1976). Determination of zearalenone in corn: Collaborative study. *J Assoc off Anal Chem* 59: 666 – 670.
- Silvestre, A. (1995). Toxicología de los alimentos. Primera edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos aires, Argentina. p.161.

- Sirot, V., Fremy, J.M., Leblanc, J.C. (2013). Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food Chem Toxicol.*; 52:1-11.
- Smith, J.E. y Ross, K. (1991). The toxigenic *Aspergilli*. p. 101-108. En: *Mycotoxins and Animal Foods*. Smith, J. & Henderson, R. editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Smith, T. (2005). Update: mycotoxins and adsorbents. *Feed International*. 15 – 20 p.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R. (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, Vol. 3, p. 94.
- Soriano, J.M. & Dragacci, S. (2004). Occurrence of fumonisins in foods. *Food Res. Int.*, Vol., 37, p 985 – 1000.
- Soriano del Castillo, J.M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. ISBN 8479788089, 9788479788087. 424 p. España.
- Sosa, D., Escobar, A., Faure, R. (2017). Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granjas. *Rev. Salud Anim.*, Vol 39, No. 2, ISSN:2224-4697.
- Sreenivasa, M.Y., Sharmila, A.P., Charith, R., and Janardhana, G.R. (2008). PCR Method for the detection of genus *Fusarium* and Fumonisin producing isolates from freshly harvested sorghum grains grown in Karnataka, India. En: *Journal of Food Safety*. Vol.; 28; p. 236-247.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J., O'Donnell, K. (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet Biol.*; 44:1191–1204.
- Steyn, P.S. & Stander, M.A. (1999). Mycotoxins as causal factors of disease in humans. *J. Toxicol.-Toxin Review*. 18: 229-243.
- Stoev, S.D. (2013). Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 887–901.
- Stroka, J., Anklam, E., Joerissen, U., Gilbert, J. (2000). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 83, 320- 340.
- Stubblefield, R.D., Shotwell, O.L. and Shannon, G.H. (1972). Aflatoxins M₁ and M₂ and parasiticol: Thin layer chromatography and physical and chemical properties. *Zentralb Veterinaarmed B*, 21: 395 – 400.
- Suárez, B.E., Carvajal, M., Méndez, R.I., Castillo, U.P., Corteslava, J., Gómez, A.S. & Melero, V.J. M. (2013). Aflatoxin (B₁, B₂, G₁ and G₂) contamination in rice of

- Mexico and Spain, from local sources or imported. *J Food Sci*, 78(11), T1822-1829. Doi: 10.1111/1750-3841.12291.
- Summerbell, R.C. (2003). *Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia*, and their relatives, p. 237-498. In D.H. Howard (ed.), *Pathogenic fungi in humans and animals*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Sun, X.D., Su, P., Shan, H. (2017). Mycotoxin Contamination of Rice in China. *J Food Sci.*; 82(3):573-584. Doi: 10.1111/1750-3841.13631.
- Sundaram, B.M., Krishnamurthy, R., Subramanian, S. (1988). Aflatoxin-producing fungi in stored paddy. *Proceedings of the Indian Academy of Science – Plant Science* 98, 291.
- Superintendencia de Sociedades. (2014). Cámara de Comercio Industria y Turismo. Obtenido de <http://www.supersociedades.gov.co/Paginas/default.aspx>.
- Tabata, S., Kamimura, H., Ibe, A., Hashimoto, H., Iida, M., Tamura, Y., Nishima, T. (1993). Aflatoxin contamination in foods and foodstuffs in Tokyo. *Journal of AOAC International* 76, 32.
- Tai, B., Chang, J., Liu, Y., Xing, F. (2020). Recent progress of the effect of environmental factors on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production on foods. *Food Quality and Safety*, 4, 21 – 28. Doi:10.1093/fqsafe/fyz040.
- Tantaoui El Araki, A. (2014). "Facteurs conditionnant la production des mycotoxines" in "Les mycotoxines. Production, transfert et persistance dans les denrées alimentaires". Fenex, Rabat.
- Thathana, M.G., Murage, H., Luther, A.K.A. and Pillay, M. (2017). Morphological Characterization and Determination of Aflatoxin-Production Potentials of *Aspergillus flavus* Isolated from Maize and Soil in Kenya. *Agriculture*, 7, 80. Doi: 10.3390/agriculture7100080.
- Tortajada, J., García, J., Tornero, O.B., Gimeno, S.C. (2001). Micotoxinas y cáncer pediátrico. *Rev. Esp. Pediatr.* 57: 279-280.
- Trucksess, M., Stack, M. and Nesheim, S. (1994). Multifunctional Column Coupled with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Com, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 77 (6): 1512 – 1521.
- Turner, A. S., Lees, A.K., Rezanoor, H.N., Nicholson, P. (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phonetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathol*;47:278-288.
- Uribe, B.E. (2015). Estudios del cambio climático en América Latina. El cambio climático y sus efectos en la biodiversidad en América Latina. Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).

- Urrego, N.J. & Díaz, G.J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Rev Fac Med. Universidad Nacional de Colombia*. 54, 2.
- Vaamonde, G. (1987). Zearalenone production by *Fusarium* species isolated from soybeans. *International Journal of Food Microbiology* 4: 129 – 133.
- VanWormer, E., Carpenter, T.E., Singh, P., Shapiro, K., Wallender, W.W., Conrad, P.A., et al. (2016). Coastal development and precipitation drive pathogen flow from land to sea: evidence from a *Toxoplasma gondii* and felid host system. *Scientific Reports*; 6: 29252.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. and Samson, R.A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. Doi: 10.3114/sim.2011.69.01.
- Varga, J., Szigeti, G., Barany, N., Kocsubé, S., O’Gorman, C. and Dyer, P.S. (2014). *Aspergillus*: Sex and recombination. *Mycophatologia*. 178:349-362.
- Velluti, A., Marín, S., Betucci, L., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2000). The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. *Int. J. Food Microbiol*, Vol., 59, p 59 – 66.
- Verma, R.J. (2004). Aflatoxin causes DNA damage. *Int. J. Hum. Genet.* 4, 231–236.
- Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S., Klaassen, C., & Perrone, G. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371. Doi: 10.1016/j.simyco.2014.09.001.
- Weiland, J., Sundsbak, J. (2000). Differentiation and Detection of Sugar Beet Fungal Pathogens Using PCR Amplification of Actin Coding Sequences and the ITS Region of the rRNA Gene. USA.
- Weller, D., Belias, A., Green, H., Roof, S. and Wiedmann, M. (2020). Landscape, water quality, and weather factors associated with an increased likelihood of foodborne pathogen contamination of New York streams used to source water for produce production. *Front. Sustain. Food Syst.* 3:124. Doi: 10.3389/fsufs.2019.00124.
- West, J.S., Holdgate, S., Townsend, J.A., Edwards, S.G., Jennings, P., Fitt, B.D.L. (2012). Impacts of changing climate and agronomic factors on *Fusarium* ear blight of wheat in the UK. *Fungal Ecol* 5:53-61.
- Widstrom, N. (1992). Aflatoxin in developing maize: interactions amongf involved biota and pertinent econiche factors. pp. 23 – 58. En: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar, D.; Lillehoj, E.B.; Arora, D.K. editores. Marcel Dekker, New York.
- Wild, C. P. & Turner, P.C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471–481.

- Withanage, G.S., Murata, H., Koyama, T. (2001). Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines. *Veterinary and Human Toxicology*; 43 (1): 6-9
- Wogan, G.N., Kensler, T.W. & Groopman, J.D. (2012). Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(2), 249–257.
- Wu, F., Bhatnagar, D., Bui-Klimke, T., Carbone, I., Hellmich, R., Munkvold, G., *et al.* (2011). Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin J.* 4, 79–93. Doi: 10.3920/WMJ2010.1246.
- Xu, X.M. (2003). Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 683–689.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C., O'Donnell, K. (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*; 101:841–852.
- Yoder, W.T. & Christianson, L.M. (1998). Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. Taxonomic status of the edible “Quorn” fungus reevaluated. *Fungal Genetics and Biology.* 23: 68-80.
- Yu, J., Nierman, W.C., Bennett, J.W., Cleveland, T.E., Bhatnagar, D., Campbell, D.C., Deand, R.A. and Payne, G. (2010). Genetics and genomics of *Aspergillus flavus*. In Rai, M. and Kövics, G. *Progress in Micology*. Springer Science. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins* 4: 1024-1057. Doi: 103390/toxins/4111024.
- Yu, J. & Arora, D.K. (2004). Genetics and biochemistry of mycotoxin synthesis. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*, 21, 343–361.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society.* 15(29), 129-144 p.
- Zaki, M.M., El-Midany, S.A., Shaheen, H.M. and Rizzi, L. (2012). Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4(1): 13-28.
- Zamalloa, C.E.E. (2008). Comparativo de rendimiento de cuatro variedades de arroz en Pozas con enmiendas en dos localidades de la Selva del Manú en Perú. <http://www.edym.com/pm/pro ma nu/web01/literat.htm>.

- Zarate, T.E. (2011). Problemática del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en la provincia Gran Chimú, La Libertad. Tesis Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. P 92.
- Zhang, S. & Tao, F. (2013). Modeling the response of rice phenology to climate change and variability in different climatic zones: Comparisons of five models. *European Journal of Agronomy*, Elsevier.