



Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano

Ramón F. Lazo¹ y Gonzalo Sierra²

¹Centro de Investigación de Enfermedades Parasitarias y por Hongos CIDRALAS S.A.- Cátedra de Micología, Facultad de Ciencias Médicas Universidad de Guayaquil, Ecuador; ²Profesor de Higiene de los Alimentos, Universidad Agraria, Guayaquil, Ecuador

Resumen

El propósito de esta investigación es estudiar la presencia de las aflatoxinas en Ecuador. El escaso conocimiento en nuestro país a este respecto, nos llevó a un equipo de investigadores de las universidades de Guayaquil y Agraria del Ecuador, a realizar un proyecto de investigación, titulado "Las aflatoxinas y otras micotoxinas en los alimentos y su relación con la salud humana en nuestro medio". Siendo la micotoxicosis aquella intoxicación resultante de la ingesta de los metabolitos secundarios producidos por diferentes especies de mohos que generan diferentes cuadros clínicos, ¿por qué no investigar metabolitos de *Aspergillus* en la orina de una paciente con aspergiloma pulmonar? Consideramos que el propio organismo podría generar metabolitos secundarios, por lo que incluimos en este estudio nuestro caso de aspergiloma pulmonar comprobado. La determinación de las micotoxinas se realizó por ELISA, utilizando reactivos específicos de Neogen Corporation, que permiten determinaciones cuantitativas en orina. Se instauró a la paciente tratamiento con itraconazol durante nueve meses, realizando controles clínicos, radiológicos y determinación de aflatoxinas. Se estudiaron, también, tres casos de niños con desnutrición en grado III, detectándose únicamente la presencia de vomitoxina. Además, se encontraron trazas de aflatoxinas en uno de tres casos de otomicosis por *Aspergillus niger*.

Palabras clave

Aflatoxinas, Aspergiloma, Micotoxicosis, Micotoxinas

Micotoxins research in humans

Summary

This study investigates the occurrence of aflatoxins in Ecuador. Early investigators proved the presence of aflatoxins on human and animal food, but the disturbing data lead to the formation of two research teams at Guayaquil University and the Agrarian University of Ecuador to investigate aflatoxins and other mycotoxins on food and its relationship to human health. Because the concept of mycotoxicosis as a result of the secondary metabolites produced by different species of moulds could cause different clinical patterns, the research team includes *Aspergillus* metabolites found in the urine for a patient with pulmonary aspergilloma. We considered that the body itself could create secondary metabolites. An ELISA method was used to detect mycotoxins with the specific reactive compounds using a company base assay. This allows the detection quantitative of such metabolites in 24 h collected urine. The patient was treated with itraconazole for nine months, after clinical, radiological and aflatoxins testing. We also investigated three other cases in children with a second level of malnutrition and only with vomitoxins results and on three investigated cases of otomycosis caused by *Aspergillus niger* only in one case traces of aflatoxins was found.

Key words

Micotoxins, Aflatoxins, Micotoxicoses, Aspergilloma

Dirección para correspondencia:

Dr. Ramón Lazo
Centro de Investigación de Enfermedades Parasitarias y por Hongos
CIDRALAS S.A.
Cdl. Kennedy Vieja Calle 2da Oeste 121
Guayaquil, Ecuador
Tel.: +593 42281546
Fax: +593 42283486
Email: rlazo@cidralas.med.ec

Hasta 1985, sólo se conocía en Ecuador un trabajo realizado por S. Espin, quien encontró que 39 de 52 muestras de maíz estudiadas estaban contaminadas con aflatoxina B₁ [12]. En 1994, Gonzalo Sierra B. comenzó, en Ecuador, el estudio de las micotoxinas en los alimentos y las consecuencias de su ingesta en la vida de los animales. Este estudio fue publicado en un libro titulado "Aflatoxinas" [30]. Se logró comprobar que de 38 muestras de alimentos tomados al azar en un mercado de carnes, vísceras y alimentos procesados –bovinos, cerdos y pollos–, 21 muestras presentaban hongos, aislándose *Aspergillus flavus* en el 56% de las muestras. En 1997, Marc Mühlemann y cols., en su estudio *Mycotoxin Contamination of Food in Ecuador*, afirmaban que la ingestión de aflatoxinas de alimentos contaminados representa un grave problema para la salud humana y animal en Ecuador, con una ingesta de aflatoxinas por parte de los ecuatorianos de 15 ng/kg/día (basado en las medias aritméticas) y con una incidencia anual de cáncer de hígado de 49 casos / 100.000 habitantes [22]. En Europa, con un consumo aproximado de 0,1 ng/kg/día por habitante, la incidencia encontrada era de 1 caso / 100.000 habitantes.

Hemos revisado todos estos aspectos y el alto porcentaje en la presencia de micotoxinas encontrado en los estudios anteriores [17,23,30], desarrollando un nuevo proyecto de investigación titulado "Las aflatoxinas y otras micotoxinas en los alimentos, y su relación con la salud humana en nuestro medio" [31] y tratar de evaluar la gravedad del problema.

Los efectos micotóxicos conllevan la disminución del rendimiento físico y, en ocasiones, la muerte. La mayor parte de la exposición humana a los agente cancerígenos ambientales es a través de la dieta [18,31,32].

Aspectos generales de los hongos queratinófilos, anemófilos y sus micotoxinas en Ecuador

En el año 1958, P. Naranjo (Quito) publica un importante trabajo sobre los agentes etiológicos de las alergias respiratorias en países del centro y sur de América. Encuentra un porcentaje de esporas de *Penicillium* y *Aspergillus* de 10 a 100 veces superior que en otras zonas geográficas [23].

En 1964, J. D. Rodríguez publica "Hongos: agentes de vida, dolor y muerte para el hombre", donde expone sus experiencias producto de 15 años de dedicación al estudio de los hongos, afirmando que algunos ascomicetos de la familia Erysiphaceae deterioran los alimentos, especialmente los de origen vegetal [27].

En 1965, R. F. Lazo hace sus observaciones, realizadas por primera vez en el país, con el estudio de la forma perfecta o sexuada de *Microsporium gypseum* en tierras procedentes del litoral ecuatoriano, siendo *Nannizia incurvata* su forma sexuada y *Arthroderma tuberculatum*, forma sexuada de *Cryosporium* [14]. En la observación de las muestras de cada tierra se encontraron otros hongos que se consideraron de la familia Aspergillaceae. En 1966, V. de Coronel demostró la existencia de diferentes especies de hongos atmosféricos en la ciudad de Guayaquil y la importancia de actuar como alérgenos, provocando numerosos y variados estados de sensibilidad en el organismo humano [6]. En esta investigación se encontró la presencia de 31 géneros diferentes, siendo los más frecuentes *Aspergillus* (18,3%), *Penicillium* (14,4%), *Hormodendrum* (13,4%), *Aureobasidium* (*Pullularia*) (9,1%), y *Oospora*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, entre otros. E. Cornejo investiga en 1976 el grado de contaminación micótica en áreas quirúrgicas de un hospital de la ciudad de Guayaquil, demostrando la existencia de un 35,6% de *Penicillium*,

32,1% de *Aspergillus*, 22,8% de *Candida*, 3,2% de *Mucor* y 2,4% de *Fusarium* [5]. En 1978, R. F. Lazo consideró necesario fijar la atención en el aislamiento de algunas colonias de hongos negros, conocidos como contaminantes, que podrían ser los responsables de micosis superficiales provocadas por levaduras negras, siendo el resultado una coexistencia de mohos que producían cuadros clínicos diferentes a los ya establecidos en la clínica micológica [15]. En el examen en fresco del material escamoso dérmico de estos casos se observó micelio y esporas negros, que certificaban que las colonias negras en los cultivos eran las responsables de las lesiones dérmicas encontradas. En 1981, en el IX Congreso Nacional de Neumología, celebrado en Quito, R. F. Lazo, como coordinador de la ponencia oficial "Aspergilosis broncopulmonar", hizo una revisión de la patogenia, diagnóstico micológico, formas clínicas y tratamiento de esta enfermedad, sin considerar las aflatoxinas como otro factor. Se presentaron los casos de nueve pacientes con diversos cuadros clínicos de aspergilosis, estudiados por un grupo de profesionales de forma interdisciplinaria [16]. Son numerosas las investigaciones realizadas en diferentes países de Latinoamérica, especialmente en aquellos que tienen algunos factores comunes, contrastando con grandes diferencias climáticas y culturales [1,3,4,7-10,17,26,28,29].

En los países tropicales y subtropicales con clima cálido y húmedo, predominan los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, cuyas sustancias tóxicas producidas por el metabolismo secundario son las aflatoxinas y las ocratoxinas [11,13,19-21,24]. Debido al alto riesgo de contaminación de los alimentos con aflatoxinas y otras micotoxinas en la costa de nuestro país [33-36], y al no existir controles de los niveles de aflatoxinas contenidos en los alimentos [25], siendo los campesinos pobres y la población de áreas marginales grupos de alto riesgo, seleccionamos un grupo de pacientes.



Figura 1. Aspergiloma pulmonar. Se observa la presencia de una masa redondeada en el vértice de la región subclavicular izquierda, con una banda radio-opaca que se separa de la cavidad en que está contenida (A). Imagen después de ocho meses de tratamiento (B). Seguimiento radiológico dos meses después de finalizar el tratamiento (C y D).

Pacientes y métodos

Las observaciones se realizaron en los siguientes pacientes: tres niños con desnutrición de grado III, un enfermo con aspergiloma pulmonar, un enfermo con posible aspergilosis pulmonar y tres adultos con otomicosis por *Aspergillus niger*.

Niños con desnutrición de grado III. Se trataba de tres casos procedentes de población rural y marginal con escasa alimentación y sin medidas higiénicas, habiendo sido seleccionados del área infantil del hospital.

Caso clínico 1. N.M., niña de 12 años, residente en una población rural, que presentaba pérdida de peso desde hacía dos años, siendo más evidente en los últimos 10 meses. Los principales síntomas eran la presencia de vómitos y disfagia, habiendo ingresado con un déficit de desnutrición del 58%. Con un diagnóstico de megaesófago, se determina por endoscopia acalasia primaria y gastritis erosiva leve-moderada del cuerpo gástrico, además de antritis leve. Con la presunción de enfermedad de Chagas, se realizaron las pruebas de hemaglutinación indirecta y ELISA para *Trypanosoma cruzi*. Los resultados negativos descartaron dicha enfermedad parasitaria.

Caso clínico 2. F.P., niño de ocho años, residente en una población rural, que ingresa por vómitos continuados, diarrea, boca seca, lengua saburral, astenia y anorexia. Se detecta afectación respiratoria de las vías altas con sibilancias, aleteo nasal y tiraje intercostal. En una radiografía de tórax, se observa un infiltrado algodonoso parahiliar. Cinco exámenes de esputo son negativos para tuberculosis. Por serología con inmunofluorescencia indirecta se descarta tuberculosis, toxoplasmosis, e histoplasmosis.

Caso clínico 3. A.B., niño de dos años, residente en una población marginal, que comienza con diarreas, vómito post-prandial y fiebre. El cuadro se agudiza en 48 h con diarreas y vómitos continuos, por lo que es ingresado. Evolucionan favorablemente con el tratamiento convencional, hidratación, trimetoprim-sulfametoxazol y vitamina A.

Caso de aspergiloma pulmonar. Siendo la micotoxicosis el resultado de una intoxicación debida a la producción de metabolitos secundarios por diferentes especies de mohos que generan diferentes cuadros clínicos, ¿por qué no investigar metabolitos de *Aspergillus* en la orina de una paciente con aspergiloma pulmonar? Se consideró que dichos metabolitos secundarios podrían generarse en el mismo organismo de la paciente. La paciente, mujer de 39 años de edad, procedía de la ciudad de Milagro y padecía de un aspergiloma pulmonar de cinco años de evolución. Los signos clínicos eran evidentes, con inmunofluorescencia indirecta positiva para *Aspergillus* y apreciándose la clásica bola fúngica mediante radiología [16,17] (Figura 1). En el estudio integral de esta paciente se encontraron otras patologías significativas: estrongiloidiasis, uncinariasis, enterobiasis y amigdalitis críptica crónica supurante con abundante material cáseo en el que se aislaron *Candida albicans* y un *Streptococcus* α -hemolítico. La mujer tenía un peso de 38,6 kg, había sido tratada de tuberculosis y el marcado parasitismo intestinal por *Strongyloides stercoralis* y la importante infección de amígdalas hacían sospechar de un estado inmunodeficiente. Instauramos el tratamiento correspondiente a cada una de sus patologías infecciosas.

Caso sospechoso de aspergilosis pulmonar. Hombre de 63 años de edad con signos de cuadro respiratorio agudo, de dos años de evolución, que presenta en la radiografía de tórax lesiones en el vértice y el tercio medio de ambos pulmones. La serología para *Aspergillus* fue posi-

tiva (1:120) y en el examen parasitológico de heces se encontró *S. stercoralis*.

Tres casos con otomicosis. Los pacientes presentaban tímpanos opacos y blanquecinos en ambos oídos, tenían prurito, y del cerumen blanco amarillento presente se aisló *Aspergillus niger*. La serología por inmunofluorescencia indirecta fue positiva para *Aspergillus* en los tres casos. Además, se observó la presencia de signos gastrointestinales, con predominio de gastritis. En uno de los pacientes se detectó una inflamación crónica difusa inespecífica del intestino grueso; en otro, se diagnosticó por gastroscopia úlcera duodenal, bulbitis y gastritis crónica.

Metodología

Para el estudio de los casos clínicos utilizamos el método de ELISA con reactivos C. Kure (CENSA, La Habana, Cuba) y Neogen Corporation, para determinar la presencia de aflatoxina B1 en la orina de los pacientes recogida durante 24 h.

Después de practicar la determinación de micotoxinas con los reactivos correspondientes, se utilizó el lector de micropocillos Microwell Strip Reader (modelo EL 301) de Bio Tek Instruments (EE.UU.).

Resultados

Niños con desnutrición de grado III (Tabla 1). La niña N.M. presentó unos niveles de vomitoxina de 3,75 ppm. Tras la mejoría clínica, fue dada de alta para control en consulta externa. El niño F.P. presentaba vomitoxina en concentración de 2,5 ppm. Sufre descompensación hemodinámica y fallece por paro respiratorio al octavo día de hospitalización. Los niveles de vomitoxina en el niño A.B. eran de 2,4 ppm. Tras una clara mejoría, se le da de alta para llevar un control posterior en la consulta externa.

Aspergilosis pulmonar. La paciente con aspergiloma pulmonar recibió tratamiento con itraconazol durante nueve meses, observándose un notable cambio de salud, con disminución del tamaño de la bola fúngica, como se observa en la secuencia radiológica (Figura 1). En el examen de orina se observó la presencia de aflatoxina al mes de iniciado el tratamiento y en las siguientes dos muestras se estableció marcada disminución como se observa en la tabla 2. La evidente mejoría clínica coincide

Tabla 1. Examen de la orina recogida durante 24 h a los paciente pediátricos procedentes de poblaciones rurales y marginales de Guayaquil.

Paciente	Aflatoxina	Zearalenona	Vomitoxina
N.M. 12 años	(-)	(-)	3,75 ppm*
F.P. 8 años	(-)	(-)	2,5 ppm
A.B. 2 años	(-)	(-)	2,40 ppm

*ppm= partes por millón

Tabla 2. Seguimiento de los niveles de micotoxinas en orina en el caso del aspergiloma pulmonar.

Muestra orina (fecha)	Aflatoxina	Zearalenona	Toxina T-2
23 de julio de 1997	33 ppb *	(-)	(-)
27 de agosto de 1997	Trazas	(-)	8 ppm **
7 de enero de 1998	Trazas 0,4 ppb	(-)	(-)

* ppb = partes por billón ** ppm= partes por millón

Tabla 3. Casos de otomicosis con diagnóstico de aspergilosis. Solo en uno de los casos se presentaron trazas de aflatoxinas.

Paciente	Procedencia	Serología I.F.I.	Presencia de micotoxinas en orina recogida durante 24 horas	
		<i>Aspergillus</i>	Aflatoxina	Zearalenona
F.P. (21 años)	Urbana	+ 1:60	(-)	(-)
E.M. (46 años)	Urbana	+ 1:80	(-)	(-)
L.C. (39 años)	Rural	+ 1:40	Traza 1/ppb*	(-)

* ppb: partes por billón

con la disminución de los niveles de aflatoxina en las orina, siendo concluyente en el proceso infeccioso la acción micotóxica de *Aspergillus*.

Caso sospechoso de aspergilosis pulmonar. La orina recogida durante 24 h no presentaba trazas de aflatoxina, pero sí de zearalenona (190 ppm). Si bien la presencia de zearalenona podría haber sido significativa, la falta de colaboración del paciente no hizo posible su valoración.

Casos de otomicosis. En uno de los pacientes se detectaron trazas de aflatoxinas en la orina.

Discusión

Con los resultados obtenidos en la investigación de la presencia de micotoxinas en los alimentos de consumo popular en la ciudad de Guayaquil, se concluyó que la contaminación de los alimentos por aflatoxinas era del 54%, por vomitoxina del 60%, por zearalenona del 59%, por toxina T-2 del 60% y por ocratoxina del 45%, que se relacionan con el estudio de los casos humanos seleccionados.

Las orinas de los pacientes estudiados incluían aflatoxinas, toxina T-2, zearalenona, o vomitoxina. En los tres niños con desnutrición en grado III, negativos para aflatoxinas, se detectó vomitoxina, hecho que concuerda con el síndrome gastrointestinal agudo de vómito, diarrea y anorexia que sufrían, originando en uno de ellos la muerte. En este caso se buscaron también otras patologías. Los tres niños procedían de un estrato social bajo, cuya alimentación precaria es a base de arroz, avena y cereales, con muy escasa ingestión de proteínas; estos casos constituyen un ejemplo de la gravedad del problema.

En el primer caso de aspergiloma pulmonar, establecimos que las aflatoxinas observadas procedían de los metabolitos secundarios, generados en el propio organismo de la paciente al estar presente la bola fúngica de *Aspergillus*, la misma que al disminuir su tamaño con el tratamiento, redundó en la mejoría clínica y radiológica de la paciente, con una disminución del nivel de aflatoxinas en la orina. La presencia de aflatoxinas, sumada a la intensa parasitación de la paciente y la grave infección de amígdalas, sugiere una paciente inmunodeprimida. En ella también detectamos toxina T-2, cuyo efecto tóxico explicaría su bajo peso (38,6 Kg), con una edad de 39 años.

En el caso sospechoso de aspergiloma pulmonar, no se detectaron aflatoxinas, pero sí zearalenona en concentración de 190 ppm. Se consideró que los signos de carácter agudo presentes en este paciente eran debidos, en gran medida, a una micotoxicosis, que originó su inmunodepresión, favoreciendo la parasitación por *S. stercoralis*.

De los tres pacientes con otomicosis por *A. niger*, con signos gastrointestinales y predominio de gastritis, ninguno presentó zearalenona en la orina, y sólo uno tenía trazas de aflatoxinas (1 ppm). Tratándose de pacientes procedentes de zonas rurales, este último resultado estaría más relacionado con la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas que con la infección por *A. niger*.

Siendo la primera vez que se realizaba esta investigación, consideramos muy significativos los resultados obtenidos. La Dra. Sara Valdés Martínez, de la Universidad Nacional Autónoma de México, comenta sobre el trabajo del Dr. Ramón F. Lazo, a propósito del Segundo Simposio Virtual de la Asociación Latinoamericana de Micología sobre micotoxinas (octubre, 1998), lo siguiente: "Me parece que el seguimiento de excreción de aflatoxinas en casos humanos resulta por demás interesante y muestra datos que pocas veces se ven publicados por el temor de aceptar "oficialmente" la relación de ingesta de micotoxinas con condiciones adversas humanas como las ya mencionadas en su trabajo".

Respecto al trabajo del Dr. Gonzalo Sierra Briones, el Dr. Antonio J. Ramos Girona, de la Universidad de Lleida en España, comenta: "Desearía saber si cuando se refiere a que se ha encontrado un 69% de hongos micotogénicos se refiere a especies que potencialmente pueden producir micotoxinas o si esa potencialidad ha sido comprobada. Con respecto a los niveles de micotoxinas encontrados, quisiera saber, en cada caso, qué concentraciones considera "presumiblemente peligrosas". Por último, me interesaría saber si existe alguna legislación en Ecuador que regule los niveles de micotoxinas en los alimentos".

En nuestro país no existe un control de los niveles máximos aceptables para las aflatoxinas en alimentos y piensos [25].

Nuestro agradecimiento a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Agraria de Ecuador y a Cirdalas, que auspiciaron el trabajo de investigación. A los doctores Gustavo Rubio, Yolanda Morante, Kléver López y Manuel García que participaron eficientemente en el desarrollo del presente trabajo. Se agradece su valiosa contribución.

Bibliografía

1. Alozie O. Informe de la Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Nairobi, Estudio FAO: Alimentación y Desnutrición N° 2, 1977.
2. Basílico JC. Micotoxinas en alimentos, el riesgo sobre la Mesa. Santa Fe, Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral, 1995.
3. Carvajal M. Integración Latinoamericana En Micotoxicología- Micotoxinas Perspectiva Latinoamericana. Luiz Celso Hyginio Da Cruz. Rio de Janeiro, Editora da Universidad Federal Rural do Rio De Janeiro, 1996. 13-20.
4. Carvajal M. Investigación de las Micotoxinas en Latinoamérica - Micotoxinas Perspectiva Latinoamericana. Luiz Celso Hyginio Da Cruz. Rio de Janeiro, Editora da Universidad Federal Rural do Rio De Janeiro, 1996. 117-124.
5. Cornejo E. Investigación de la contaminación bacteriana y micoticas en Areas Quirúrgicas del Hospital Luis Vernaza. Monografía de Grado Doctoral, Guayaquil, Universidad de Guayaquil, 1977.
6. De Coronel VV. Contribución al estudio de los hongos atmosférico en la ciudad de Guayaquil. Rev. Ecuat Hig Med Trop 1966; 23: 47-65.
7. Da Silva Lacaz C, Fava Netto C. Fungos e Inmunología. O Grande Mundo dos Fungos. São Paulo, Editora da Universidad de São Paulo, 1970: 185-195.
8. Da Silva LC, Mendes E. Fungos e Alergia O Grande Mundo dos Fungos. São Paulo, Editora da Universidad de São Paulo, 1970: 207-220.
9. Da Silva LC. Fungos em Patología Humana Fungos Oportunistas. O Grande Mundo dos Fungos. São Paulo, Editora da Universidad de São Paulo, 1970: 137-163.
10. Da Rocha Rosa CA. Curso de Micotoxicología. Guayaquil, Universidad Agraria del Ecuador, 1998.
11. Echeverry M, Chulze S, Dalcerro A. Influencia de la concentración del inoculo sobre el crecimiento y acumulación de Aflatoxinas. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 101-106.
12. Espin S. Aflatoxin in Ecuador. CYMMYT and USAID, 1986.
13. Hygino Da Cruz LC. Micotoxinas: Sao tao importantes? Micotoxinas: Perspectivas Latinoamericana. Rio de Janeiro, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 1-12.
14. Lazo Ramon F. Formas sexuadas de *Fungi imperfecti* aisladas de tierras del litoral Ecuatoriano. Rev Ecuat Hig Med Trop 1965; 22: 119-130.
15. Lazo RF. Superficial mycoses induced by black yeasts. Proceedings of the Fourth International Conference of the Mycoses The Black and White Yeasts. Brasilia, 1978: 24-32.
16. Lazo RF. Aspergilosis broncopulmonar. Ponencia Oficial IX Congreso Nacional de Neumología. Sede Quito. Memorias, 1981.
17. Lazo RF. Actualización de las micosis oportunistas dentro de las infecciones nosocomiales. Revista ELITE 1995: 45-50.
18. Lefkowitz JH. The epidemiology and morphology of primary malignant liver Tumors. Surgical Clinics of North America 1981; 61: 169-179.
19. Luque A, Biasoli M, Alvarez D. Aumento de la incidencia de micosis superficiales producidas por hongos del género *Fusarium*. Rev Iberoam Micol 1995; 12: 65-67.
20. Mazzani C. Ocurrencia de hongos toxigénicos en granos. Micotoxinas: Perspectivas Latinoamericana. Rio de Janeiro, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 21-27.
21. Moreno MA, Olivares A, Pascuales C, Prieta J. Importancia de factores ambientales y nutricionales en el análisis de producción de aflatoxinas en una cepa de *Aspergillus favus*. Rev Iberoam Micol 1995; 12: 97-100.
22. Mühlemann M, Lüthy J, Hübner P. Mycotoxin Contamination of Food in Ecuador. Mitt Gebiete Lebensm Hyg 1997; 88: 474-496.
23. Naranjo P. Etiological agents of respiratory allergy in tropical countries of Center and South America. J Allergy 1958; 39: 362.
24. Purchio A. Fungos e Metabolitos Toxicos. O Grande Mundo dos Fungos. São Paulo, Editora da Universidad de Sao Paulo, 1970: 71-86.
25. Ramos AJ, Sanchis V. Micotoxinas: Principales criterios para el establecimiento de su legislación. Rev Iberoam Micol 1996; 13: 76-84.
26. Rodríguez JD. Aislamiento de hongos patógenos del suelo. Rev Ecuat Hig Med Trop 1958; 15: 5-12.
27. Rodríguez JD. Los hongos: agentes de vida y muerte para el hombre. Rev Ecuat Hig Med Trop 1964; 21: 15-22.
28. Rodríguez JD, Lazo RF. Hongos queratinofílicos en Ecuador. Rev Ecuat Hig Med Trop 1968; 25: 131-140.
29. Sánchez Regueiro O. Micotoxinas y micotoxicosis en Cuba. Micotoxinas: Perspectivas Latinoamericana. Rio de Janeiro, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996:132-140.
30. Sierra BG. Aflatoxinas. Guayaquil, Universidad Agraria del Ecuador, 1996.
31. Sierra BG, Lazo SR. Las aflatoxinas y otras micotoxinas en los alimentos y su relación con la salud en nuestro medio (2ª Ed.). Guayaquil, Docucentro Católica (Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.), 2004.
32. Strickland P, Groopman J. Biomarkers for assessing environmental exposure to carcinogens in the diet. Am J Clin Nutr 1995; 61 (Supl): 710S-720S.
33. Aragundi J. Contaminación fúngica y aflatoxínica en alimentos para personas y riesgo para animales en la ciudad de Quevedo. Tesis de Grado de Maestría, 2004.
34. Araujo L. Presencia de Aflatoxinas en alimentos comerciales para perros. Tesis de Grado en Universidad de Machala, 2000.
35. Delgado J. Contaminación Fúngica en Alimentos Balanceado para caninos. Tesis de grado en Universidad de Machala, 1999.
36. Maza F. Investigación Fúngica y Aflatoxínica en alimentos de consumo popular en la ciudad de Machala. Tesis de Grado, 1998.