



Universidad de Concepción del Uruguay

Facultad de Ciencias Agrarias

Centro Regional Rosario

**Incidencia de Micotoxinas en granos de soja almacenados en diferentes
localidades de la República Argentina.**

MARIA ALBERTINA BERTOLANO

Tesis presentada para completar los requisitos del plan de estudios de la
Licenciatura en Bromatología

Director de Tesis: Ing. Agrónoma Ana Clara Martino

Rosario-Diciembre 2015

IMÁGENES	6
GRÁFICOS	6
TABLAS	7
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN	12
ANTECEDENTES	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
MARCO TEÓRICO	19
Micotoxinas	23
Relación moho-micotoxina	26
Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de Micotoxinas	28
Factores Físicos.....	28
Humedad y Agua disponible o Actividad de agua (aw).....	28
Temperatura	32
Integridad física de los granos.....	36

Factores químicos	37
Rango de PH.....	37
Composición del sustrato	37
Nutrientes minerales.	39
Potencial de oxi - reducción (O ₂ /CO ₂).....	39
Factores biológicos	40
Presencia de invertebrados	40
Contaminación de los alimentos de acuerdo con las diferentes variaciones estacionales.....	40
Daños que provocan los mohos en las materias primas y alimentos compuestos.	41
Problemas que generan las Micotoxinas	42
1. Aflatoxinas	43
2. Deoxinivalenol	45
3. Toxina T-2	46
4. Fumonisina	47
5. Zearalenona	48
6. Ocratoxinas	48
Control de las Micotoxinas	52
Prevención de la contaminación y el crecimiento fúngico	52

Mejora de las prácticas agrícolas.....	52
Métodos de descontaminación.....	56
Métodos físicos	56
Métodos químicos.....	57
Métodos microbiológicos	58
Impacto económico del desarrollo de Micotoxinas	58
Legislación	59
Legislación de la Unión Europea sobre contenidos máximos de Micotoxinas en productos alimenticios.	60
Métodos analíticos para Micotoxinas	61
Cromatografía en capa fina (TLC)	63
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	64
Cromatografía de inmunoafinidad y determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución	65
Cromatografía de gases	66
MATERIALES Y MÉTODOS	68
Tipo de investigación y diseño metodológico.....	68
Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	68
Variables de estudio e indicadores	68
Muestreo	69

Método	70
Procedimiento	71
a) Preparación de la muestra	71
b) Expresión de los resultados	73
c) Eliminación de desechos	74
DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	99
Otras fuentes consultadas	99
Cuadro de resultados	100

IMÁGENES

Imagen Nº 1: Estructura de los hongos. 19

Imagen Nº 2: Estructura de los hongos 20

Imagen Nº 3: Micelio observado al MEB 800x..... 21

Imagen Nº 4: Hifas creciendo alrededor de un tricoma de *Mora* sp. MEB 800x 21

Imagen Nº 5: Estructura de las Micotoxinas. 24

Imagen Nº 6: Estructura de las Micotoxinas. 24

Imagen Nº 7: Estructura de las Micotoxinas. 25

Imagen Nº 8: Morfología del grano de Soja 37

Imagen Nº 9: Método Elisa competitivo directo 67

Imagen Nº 10: Procedimiento para Cuarteo de muestra 70

GRÁFICOS

Gráfico Nº 1: Porcentaje de incumplimientos por Micotoxinas en los años 2012-2013
..... 76

Gráfico Nº 2: Porcentaje de incumplimientos por Micotoxina en el año 2012 77

Gráfico Nº 3: Porcentaje de incumplimientos por Micotoxina en el año 2013 78

Gráfico Nº 4: Incumplimientos vs Provincias..... 79

Gráfico Nº 5: Cantidad de Incumplimientos por Toxina en los años 2012-2013 80

Gráfico Nº 6: Cantidad de incumplimientos por localidades en años 2012-2013 81

Gráfico Nº 7: Porcentaje de incumplimientos por etapas 82

Gráfico Nº 8: Incumplimientos de Aflatoxinas por localidad, etapas y años 83

Gráfico Nº 9: Incumplimientos de Ocratoxinas por localidad, etapas y años. 84

Gráfico Nº 10: Incumplimientos por localidades de Aflatoxina y Ocratoxina 85

Gráfico N° 11: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Zearalenona- 2012.....86

Gráfico N° 12: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA – Aflatoxina - 201287

Gráfico N° 13: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Ocratoxina- 201287

Gráfico N° 14: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Toxina-T2- 2012.....88

Gráfico N° 15: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Fumonisina - 201288

Gráfico N° 16 : Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Aflatoxina - 201389

Gráfico N° 17: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA – Ocratoxina - 2013.....89

Gráfico N° 18: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA – Toxina - T2- 2013.....90

TABLAS

Tabla N° I: Valores mínimos necesarios de aw para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas Micotoxinas.....31

Tabla N° II: Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y Micotoxinas.33

Tabla N° III: Producción de Aflatoxina (ppm) por el *Aspergillus parasiticus* en diversas semillas.39

Tabla N° IV: Variaciones estacionales.....41

Tabla N° V: Efectos nocivos para la salud.....	50
Tabla N° VI: Clasificación carcinogénica de las Micotoxinas.	51
Tabla N° VII: Contenidos máximos de Micotoxinas en productos alimenticios.	60
Tabla N° VIII: Preparación de las muestras.....	72
Tabla N° IX: Volúmenes y tiempo de incubación para la realización del análisis.	73
Tabla N° X: Rangos de cuantificación y límites de detección para las Micotoxinas..	74

RESUMEN

La contaminación por Micotoxinas de las materias primas tiene una elevada incidencia y puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, por lo cual es de gran importancia encaminarse hacia la detección temprana y las acciones preventivas.

En el presente trabajo se pretende evaluar los niveles de contaminación por Micotoxinas que presentan los granos de soja de diferentes acopios de la República Argentina durante los años 2012-2013 y compararlo con los límites de especificación que exige la reglamentación Europea.

De nuestro trabajo se desprende que el 50% de las muestras de granos de soja analizadas presentan contaminación al menos por una Micotoxina, y que estos valores detectados sobrepasan los límites de tolerancia exigidos por la Unión Europea.

La mayor incidencia fue de Ocratoxina con un 50% (26/52) de las muestras contaminadas, le sigue Aflatoxina con el 38,46% (20/52) de contaminación. La menor incidencia corresponden a Zearalenona, Toxina T-2 y Fumonisina con el 5,76% (3/52), 3,84% (2/52) y el 1,92% (1/52) respectivamente. De Deoxinivalenol no se obtuvieron resultados positivos.

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos evaluar cuáles son las Micotoxinas de mayor incidencia en los granos de soja, para poder hacer un mejor análisis de las medidas preventivas y de control durante toda la cadena agroalimentaria.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) continúan siendo en el tercer milenio el problema de salud pública más extendido en el mundo. Ello corrobora la significación que tiene en estos días difundir el conocimiento de cada uno de los peligros físicos, químicos y biológicos que producen las Etas. Al conocerlos, se facilita la prevención a través de la aplicación responsable de las Buenas Practicas de Manufacturas (GMP) en la elaboración de alimentos y del desarrollo de algunos sistemas, como el de Análisis de Peligros y Puntos críticos de control (HACCP) que permiten minimizar o eliminar riesgos (Rey, 2005).

Las ETAs pueden definirse como cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica, cuya causa parece tener origen en el consumo de alimentos o de agua de bebida (Bello Gutiérrez, 2000), un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por la ingesta de productos alimenticios e ingredientes, especias, bebidas y agua que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afecten la salud de una persona o grupo de personas en forma aguda o crónica.

Los hongos son causantes de diferentes Etas. El hombre conoce los hongos que crecen en los alimentos desde la antigüedad y los ha utilizado en su propio beneficio como alimento directo, para mejorar alimentos como en el empleo de la fermentación de bebidas y especialmente con fines terapéuticos (antibióticos). En el siglo X surgió una enfermedad en numerosas partes de Europa, la cual se conoció como el fuego de San Antonio debido a la sensación abrasadora experimentada por las víctimas. Sabemos ahora que el fuego de San Antonio se debía al consumo de centeno contaminado con "*alcaloides ergóticos*", producidos por el hongo *Claviceps*

purpúrea o cornezuelo del centeno y que alcanzó proporciones epidémicas en muchas partes de Europa en el siglo X. Su estudio comenzó en los años 60 por una intoxicación masiva en Inglaterra que provocó la muerte de 100.000 pavos y que asociaron a una contaminación por hongos (López, 2011).

El interés de los hongos y las Mico toxinas es enorme, no solo desde el punto de vista científico, sino desde la perspectiva económica. Son muchos los problemas que originan desde el agricultor hasta el consumidor final. La exposición del hombre a las Mico toxinas se produce por vía alimentaría, si bien se han descrito algunos casos muy particulares de afecciones por vía respiratoria; siendo la alimentación la principal fuente de riesgo para el hombre (FAO, 2003).

El término Micotoxina viene de una palabra griega "*mikes*" (hongo) y de una palabra del latín "*toxicum*" (toxina). Al expresarlo en forma greco-latina "*mykes toxicum*" su significado es toxina fúngica, o Micotoxinas. Son metabolitos secundarios de los hongos que se sintetizan durante el crecimiento de estos cuando las condiciones ambientales son apropiadas.

Este término se utiliza para designar un grupo de compuestos, altamente tóxicos, producidos por ciertos hongos, que causan dolencias o hasta la muerte, cuando son ingeridos por los animales domésticos y por el hombre.

Estas dolencias producidas por las Micotoxinas son denominadas micotoxicosis. Las micotoxicosis se puede adquirir por el consumo de alimento vegetal la cual se denomina "micotoxicosis primaria" o pueden transmitirse de través de productos de origen animal, luego de ser metabolizadas y se la denomina "micotoxicosis secundaria" (Knass, 2007).

JUSTIFICACIÓN

La semilla de soja es una de las leguminosas más importantes a nivel mundial en términos de comercio.

Nuestro país juega un rol importante como proveedor de alimentos frescos y elaborados para el resto del mundo, constituyendo el sector agroalimentario un motor para el desarrollo interno, además de una generosa fuente de divisas. Aún más, puede considerarse que el sector agroindustrial es uno de los ejes estratégicos para el crecimiento del país, en virtud de una serie de características muy ventajosas: es excedentario en producción agrícola, es el octavo productor de alimentos mundial y el quinto exportador, posee alta eficiencia en la producción y velocidad en la adopción de nuevas tecnologías, y posee capacidad para diferenciar productos y agregar valor (Báez, 2008 mencionado por Bernadette Abadía, 2010).

Su larga tradición exportadora le ha conferido a la Argentina la capacidad de interpretar las demandas de los mercados internacionales. En lo referente a la seguridad alimentaria, nuestro país ha ido respondiendo positivamente a las nuevas demandas de los consumidores y los gobiernos extranjeros. En efecto, algunas series estadísticas reflejan que las empresas argentinas han incorporado progresivamente Sistemas de Aseguramiento de Calidad a lo largo de los últimos años. No obstante, queda mucho por mejorar si se desea participar sostenidamente en los mercados más exigentes del mundo (IRAM, 2010 mencionado por Bernadette Abadía, 2010).

La soja, uno de los cultivos más importantes, cuya producción aumenta a grandes pasos en el mundo, ya que contribuye significativamente a la nutrición, tanto por las calorías como por las proteínas que aporta (Comité Nacional Sistema Producto

Oleaginosas, 2010). Sin embargo, solo el 2% de la proteína de soja es utilizada directamente para consumo humano; el 98% restante, se procesa para la producción de aceites, harinas y pellets de soja, siendo estos últimos alimento intermedio utilizados para la formulación de alimentos balanceados para el ganado vacuno, lechero, acuicultura, porcicultura y avicultura (Andreani, 2008).

ANTECEDENTES

Existen varios estudios sobre el desarrollo de las Micotoxinas en diferentes sustratos. Estas son objeto de interés mundial debido a las importantes pérdidas económicas acarrear sus efectos sobre la salud de las personas, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional (Pacin, 2006).

El crecimiento fúngico y la producción de Micotoxinas en los granos pueden ocurrir en las diversas fases del desarrollo: maduración, cosecha, transporte, almacenamiento o procesamiento de granos (López, 2011).

Es aceptado que la producción mundial de cereales posee aproximadamente un 25% de contaminación por una o más Micotoxinas (OMS), porcentaje que, aunque no cuantificado, se mantendría en nuestro país.

Los estudios realizados en el Centro de Referencia de micología de la U.N.R. (Ceremic) de las semillas de Soja producidos en los departamentos del Sur de Santa fe en el año 2006, demostraron que todas las muestras testeadas estaban contaminadas con Aflatoxinas, Deoxinivalenol, Zearalenona, o Toxina T-2. Aunque la mayoría de las muestras presentaban niveles aceptados por organismo de control, el 80% de las mismas contenían 2 o 3 Micotoxinas juntas, lo que aumentaría el riesgo toxico debido a fenómenos de Sinergismo (López, 2008).

En diferentes países se han realizado estudios donde se puede concluir que la incidencia de Micotoxinas en soja es muy baja. En la gran mayoría de chequeos de incidencia de Micotoxinas en los cuales se han incluido muestras de soja, los resultados han sido negativos. Hasta el momento las únicas Micotoxinas reportadas en soja son las Aflatoxinas, Ocratoxina A y T-2, contaminadas en forma natural. Los niveles de Aflatoxina detectados en soja han sido en general demasiado bajos (36

ppb) como para constituir una amenaza para la salud y/o producción animal. Sin embargo, los niveles reportados de Ocratoxina A y T-2 son potencialmente tóxicos (500 ppb) (Díaz, 1995).

En nuestro país varios laboratorios trabajaron con determinaciones por método ELISA. Uno de ellos ha detectado entre los años 2000 a 2005, algunas de las toxinas pero en baja frecuencia y con niveles bajos de contaminación, pero el incremento de alimentos manufacturados con soja, hace necesario evaluar la exposición de la población. Y, por otro lado, el caudal de exportación hace imprescindible mantener una calidad adecuada para mantener el volumen exportable (Pacin, 2006).

El último estudio sobre Micotoxinas de Biomin en 2013 se centró en los principales ingredientes alimenticios para aves (maíz, trigo, soja, arroz y DDGS) analizados entre enero y septiembre. Los datos relevados de este estudio muestran que niveles de Micotoxinas excedían los límites de detección en el 73% del total de las muestras analizadas (Kovalsky, 2013).

También se han realizado determinaciones sobre los granos almacenados en silo bolsas o en silos tradicionales para determinar si existen mayor desarrollo en unos u otros. Existe la percepción por parte el sector de la producción animal en forma intensiva, que el uso de cereales para elaboración de alimentos balanceados; provenientes de silos bolsa, trae aparejado un aumento de riesgo sobre la salud y la performance productiva de los animales; por la mayor posibilidad de estar contaminados con Micotoxinas y por la alteración de sus caracteres organolépticos, especialmente el olor (Venturino, 2007).

En estos muchos casos, se han podido relacionar los cuadros clínicos con la presencia de Micotoxinas mientras que en otros, no se han podido determinar la existencia de estas últimas (Venturino, 2007).

Debido a su amplio rango de efectos tóxicos, el desarrollo de Micotoxinas puede causar severas pérdidas económicas a los productores pecuarios y representan un riesgo para los consumidores de los alimentos que se obtengan de estas explotaciones pecuarias. Por lo tanto se hace necesario realizar ensayos rutinarios para tener idea del nivel de contaminación por estas toxinas. Desafortunadamente los ensayos para Micotoxinas encierran diferentes problemas que abarcan desde contar con un laboratorio perfectamente equipado, en cuanto a instrumentación y capacidad analítica y personal con suficiente experiencia en el manejo de muestras y estándares de referencia, esto es una limitante muy seria en los países latinoamericanos. Sin embargo desde hace cerca 20 años los intentos por simplificar estos procedimientos analíticos han dado lugar a que se desarrollen los sistemas inmunoquímicos, que encierran una gran dificultad en su elaboración, pero que se han simplificado de manera de adquirirlos en forma de "kits" que requieren el mínimo de instrumentación y que puede servirnos básicamente para realizar ensayos semicuantitativos, teniendo en cuenta la importancia de cada etapa del proceso analítico de detección. (Medina, 2015).

En Latinoamérica hasta hace unos años existía como limitante el hecho de que los distribuidores de estos kits contaban con poca información y que no existían cursos de capacitación sobre la teoría y utilización de los inmunoensayos. (Medina, 2015).

En los últimos años ha habido un desarrollo muy notorio en cuanto la aplicación de los ensayos inmunoquímicos. Estas técnicas han permitido simplificar los procesos analíticos de modo tal que han revolucionado en cuanto a facilidades analíticas. Otro

aspecto es el hecho de contar con instrumentación más sensible y versátil disponible en el mercado. De modo tal que los inmunoensayos representan una alternativa, aunque no se puede considerar que ya se haya llegado a un total de perfeccionamiento de estos sistemas. (Medina, 2015).

Durante los últimos años eso fue cambiando y ya se cuenta con cursos de capacitación referentes a esta problemática.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La contaminación por Micotoxinas en granos de soja provenientes de diferentes localidades de la República Argentina se encuentra dentro de los límites exigidos por la Unión Europea?

OBJETIVOS

Objetivo general

- ✓ Evaluar los niveles de contaminación por Micotoxinas que presentan los granos de soja de diferentes acopios de la República Argentina y compararlo con los límites de especificación que exige la reglamentación Europea.

Objetivos específicos

- ✓ Relevar datos de contaminación por Micotoxinas de los granos de soja que fueron almacenadas durante las cosechas 2012 y 2013 en diferentes localidades.
- ✓ Realizar un análisis estadístico sobre la incidencia de los distintos tipos de Micotoxinas que afectan al sustrato analizado.
- ✓ Realizar la comparación entre los resultados fuera de especificación obtenidos con los resultados de las mismas muestras analizadas en laboratorios externos certificados.
- ✓ Proporcionar información sobre los riesgos de la ingesta de granos o alimentos contaminados con Micotoxinas.

MARCO TEÓRICO

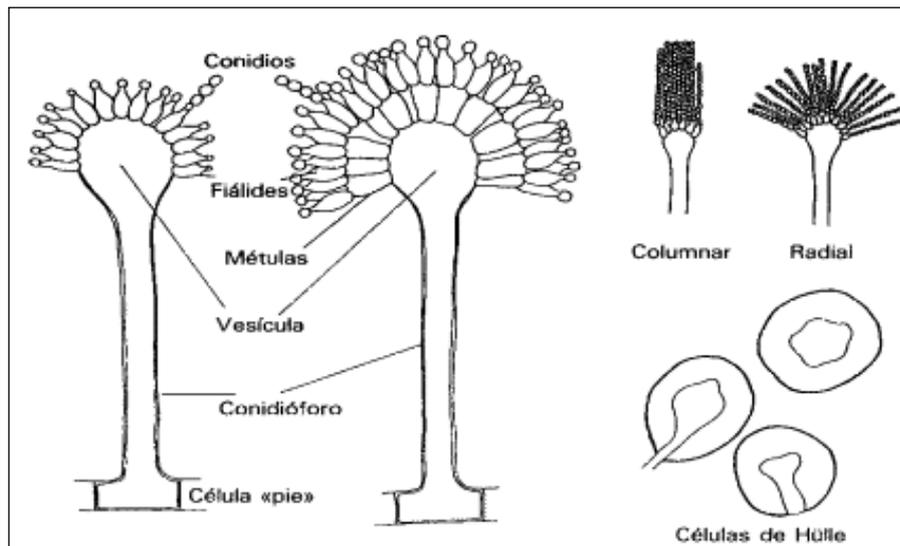
Desde hace siglos el hombre ha utilizado los hongos que se desarrollan en los alimentos para obtener otros alimentos con características organolépticas diferentes a la original (Soriano del Castillo, 2007).

No obstante, algunos hongos que crecen sobre granos con tenores de humedad bajos y en condiciones favorables y pueden producir Micotoxinas.

Los hongos están formados por filamentos denominados hifas. Las hifas crecen rápidamente a temperatura ambiente y se ramifican.

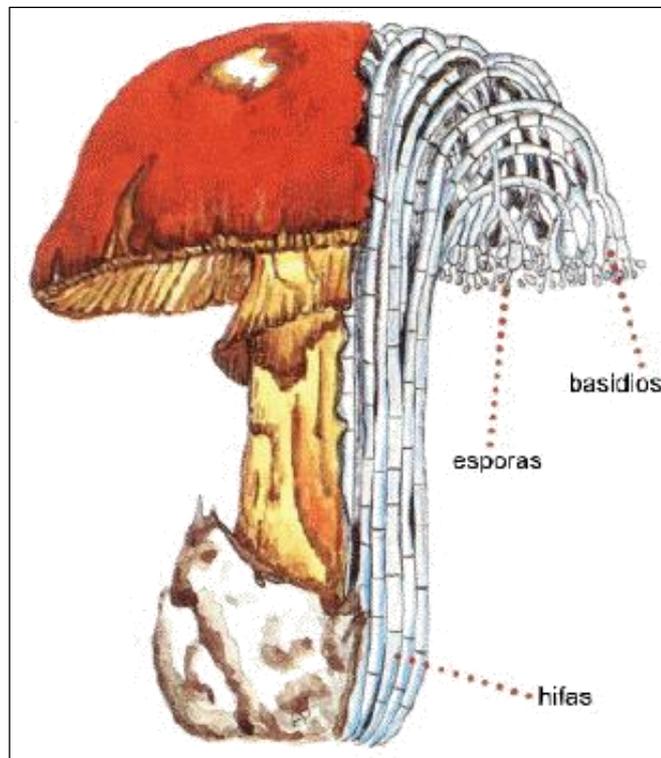
Este conjunto de hifas se denomina micelio y es el que ejecuta las funciones vegetativas y reproductivas.

Imagen N° 1: Estructura de los hongos.



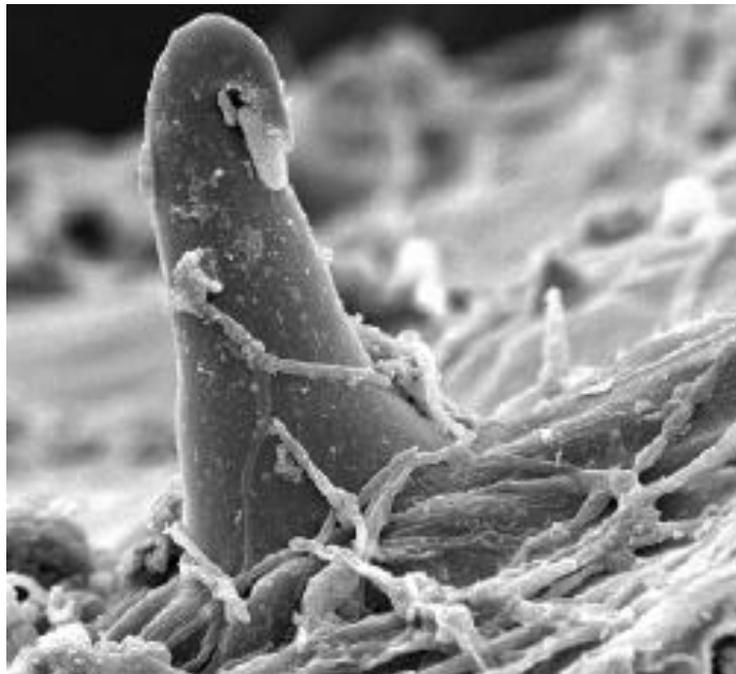
Fuente: www.biología.edu.ar

Imagen Nº 2: Estructura de los hongos



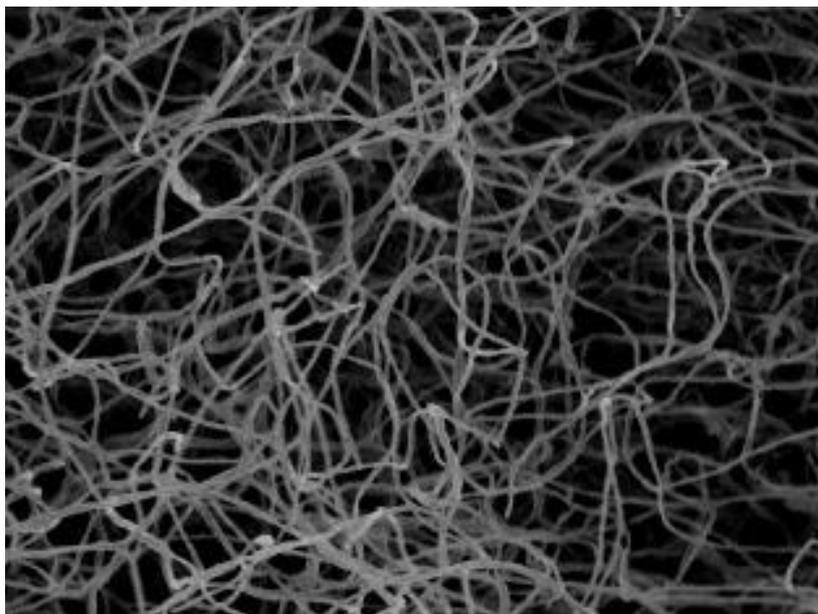
Fuente: www.biologia.edu.ar

Imagen N° 3: Micelio observado al MEB 800x



Fuente: www.biologia.edu.ar

Imagen N° 4: Hifas creciendo alrededor de un tricoma de *Mora* sp. MEB 800x



Fuente: www.biologia.edu.ar

Los esporos realizan las funciones vegetativas. Algunas especies se propagan únicamente por medio del micelio y otras por medio de los esporos. Millones de esporos son producidos por cada colonia de hongos los cuales garantizan la propagación y la perpetuidad de la especie. En condiciones favorables, los esporos germinan, produciendo hifas las cuales invaden semillas, granos y otros sustratos. Existen aproximadamente 100.000 diferentes especies de hongos. Están presentes en todas partes y crecen en muchos tipos de sustratos (Gimeno, 2001).

Los hongos carecen de clorofila y pertenecen al tipo talofitas. Esta carencia de clorofila es un condicionante importante en la actividad biológica de estos. El hecho de carecer de clorofila provoca que no son capaces de sintetizar materia orgánica utilizando la luz solar como fuente energética, por este motivo deben desarrollarse sobre un sustrato que contenga materia orgánica (Gimeno, 2001).

Este factor condiciona los lugares de crecimiento. Así pues, cada producto alimenticio es un sistema ecológico especial en el que la interacción de factores químicos, físicos y biológicos tienen un papel fundamental en el deterioro del alimento debido a un crecimiento y proliferación fúngica (Gimeno, 2001).

Los hongos tienen gran capacidad para infectar tejidos vegetales vivos, todo esto aumentado con el poder de invasión, diseminación y deterioro de productos almacenados. También hay hongos que se alimentan de otros seres vivos y tienen diferentes estrategias (Gimeno, 2001).

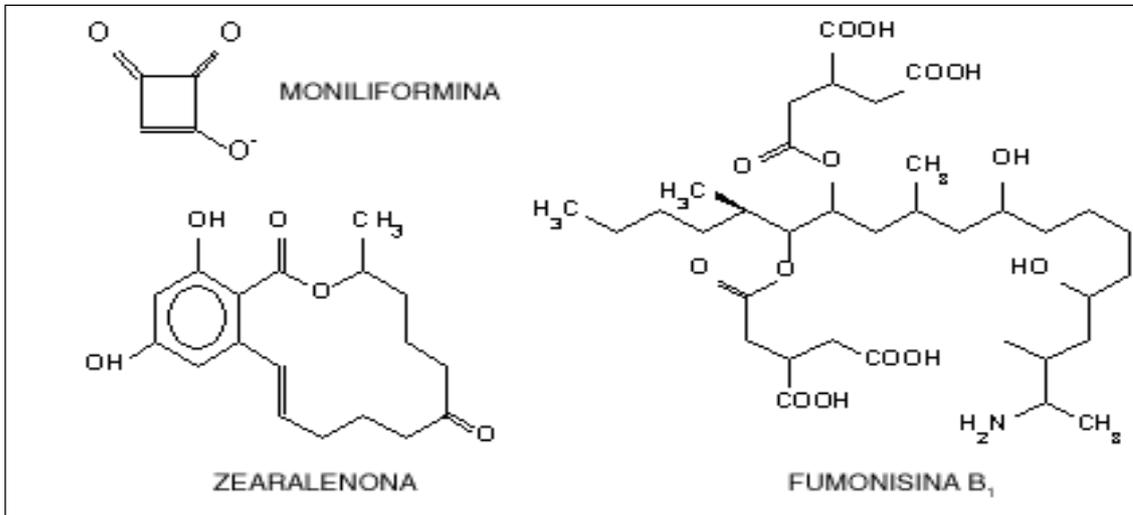
Micotoxinas

Han pasado casi 40 años desde que la mico toxicología comenzó con el descubrimiento de las Aflatoxinas. Desde entonces, numerosos otros Micotoxinas (metabolitos tóxicos de los hongos) han sido descubiertos, muchos de los cuales fueron encontrados más tarde para ser causas de las intoxicaciones (micotoxicosis) mientras que otros permanecieron como curiosidades de laboratorio. Estudios dirigidos a Micotoxinas, incluida su detección, la biosíntesis, y toxicología junto con los estudios sobre la epidemiología y el control de los hongos que produce, son fundamentales para mantener un suministro de alimentos seguros (Cast, 2003).

Las Micotoxinas se forman cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los mohos.

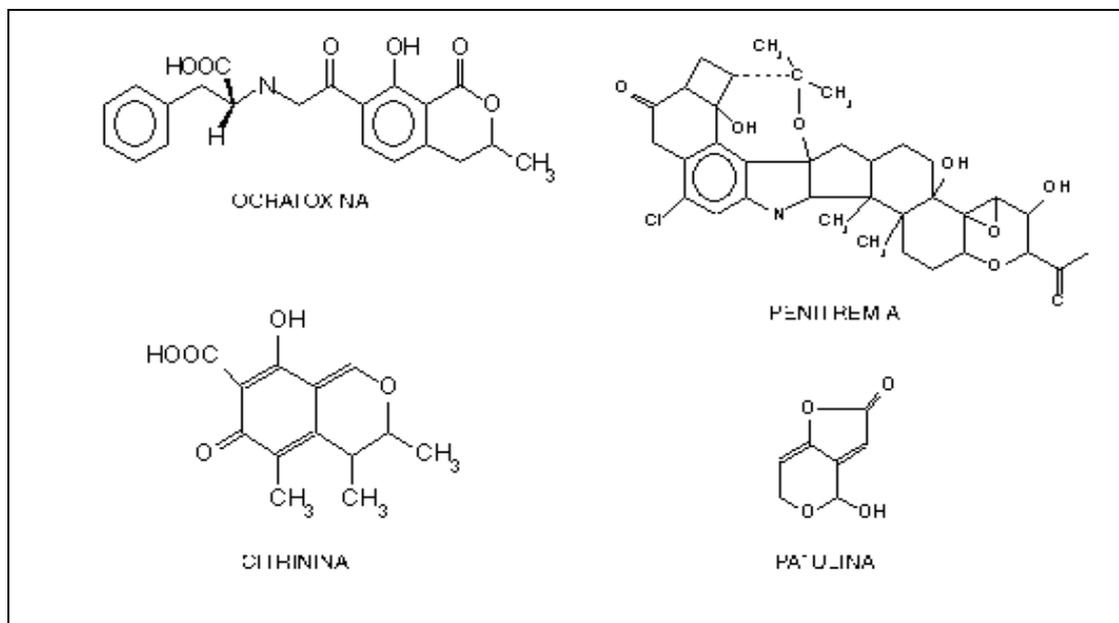
Se han identificado hasta ahora más de 400 Micotoxinas, sin embargo las que se pueden encontrar de una forma más frecuente, como contaminantes naturales en los alimentos para animales y humanos, son: Aflatoxinas, Ocratoxinas, Zearalenona, toxinas Tricotecenas (Toxina T-2, diacetoxiscirpenol, Deoxinivalenol o Vomitoxina, Nivalenol, Monoacetoxiscirpenol, Triacetoxiscirpenol escirpentriol), Citrinina, Patulina, Acido penicílico, sterigmatocistina, Toxinas de Alternaria (Alternariol, Alternariol Monometil éter, Alténuene, Alténuisol, etc.), Alcaloides del cornezuelo del centeno (Ergotamina, Ergotoxina, Ergometrina), Toxinas Tremorgénicas (Penitrem A y B), Rubratoxinas A y B, Luteoskirina, Islanditoxina, Rugulosina, Citreoviridina y Fumonisinias B1 y B2.

Imagen Nº 5: Estructura de las Micotoxinas.



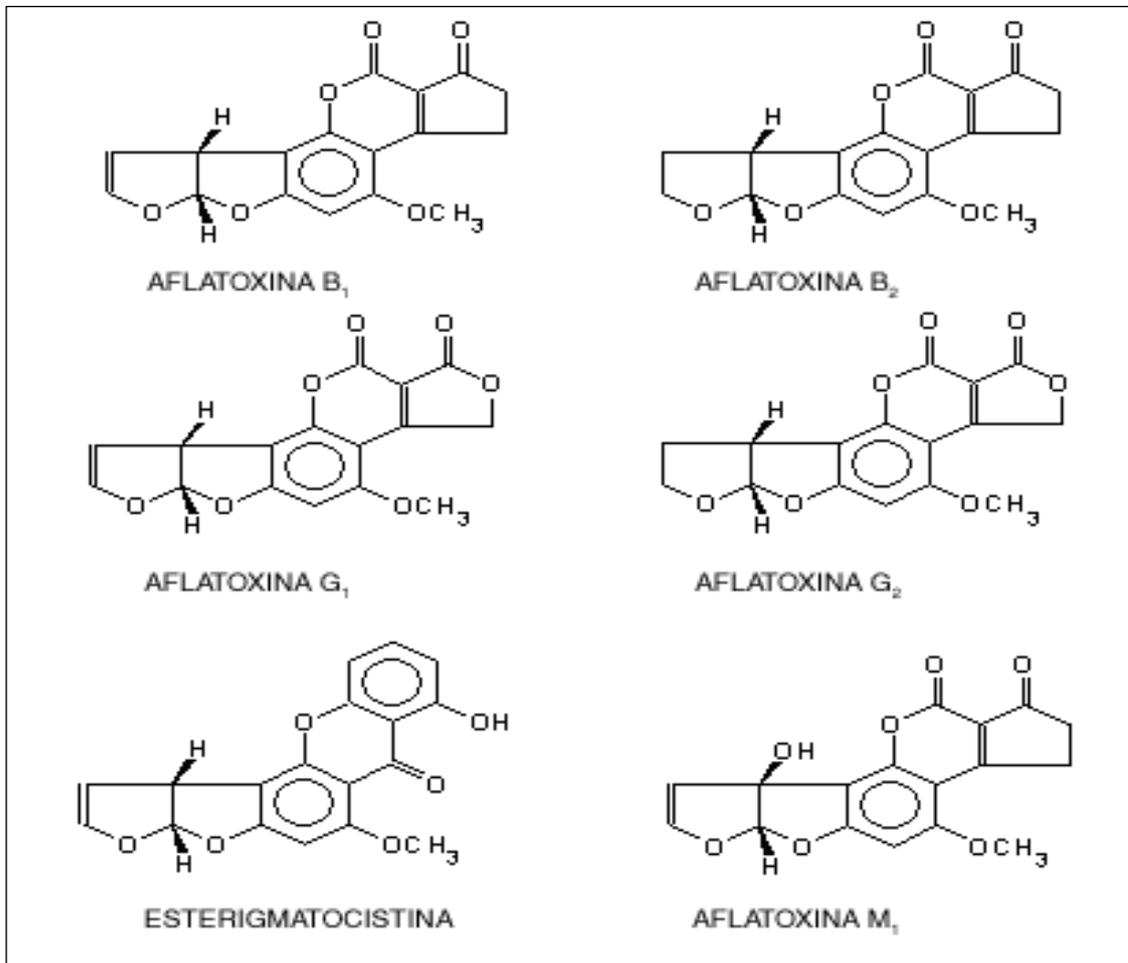
Fuente: Soriano del castillo, 2007

Imagen Nº 6: Estructura de las Micotoxinas.



Fuente: Soriano del Castillo, 2007

Imagen Nº 7: Estructura de las Micotoxinas.



Fuente: Soriano del Castillo, 2007

Todas ellas reportan en mayor o menor grado una serie de cuadros clínicos patológicos, trastornos y efectos tóxicos en los animales y ocupan un lugar muy importante en el mundo de los alimentos.

En base a los riesgos que las Micotoxinas tienen sobre la salud humana, diferentes organismos internacionales como las OMS y la FAO han establecido los límites permitidos de Micotoxinas en los piensos y los alimentos. Una comisión conjunta de estos dos organismos se ha reunido regularmente desde 1956 en su comité de

expertos en aditivos alimentarios con objeto de evaluar la presencia y riesgos de los aditivos alimentarios, contaminantes, compuestos tóxicos naturales y residuos de la industria veterinaria en los alimentos.

Relación moho-micotoxina

Los hongos como ya lo hemos dicho antes, son seres biológicos, que utilizan para su metabolismo principalmente hidratos de carbono de las matrices que colonizan. Estos absorben monómeros y dímeros (unidades moleculares pequeñas) y a partir de allí los incorporan al metabolismo. El metabolismo secundario, solamente se produce en la madurez fisiológica del hongo, y es allí donde se elaboran las Micotoxinas (Knass, 2008).

La aparición de Micotoxinas es la consecuencia de tres factores: hongos, matriz alimentaria y medio ambiente. Las modificaciones que puedan ocurrir sobre cualquiera de estos factores son las que van a determinar la aparición de Micotoxinas en los alimentos (Knass, 2008).

Aquí tenemos que tener en cuenta algo muy importante: los hongos son seres biológicos, capaces de crecer reproducirse y morir, en cambio las Micotoxinas son moléculas (en este caso un producto del metabolismo secundario de los hongos) por lo tanto no puede aparecer por generación espontánea en un alimento, en algún momento tuvo que existir un hongo que la haya elaborado, y no pueden morir, incluso son muy resistentes a la degradación, lo que hace que muchas veces permanezcan en los alimentos incluso luego del procesamiento de los mismos.

La presencia del moho no implica la producción de la Micotoxina ya que, más allá de la capacidad genética del hongo, es necesario que ciertos condicionantes sean satisfechos para que el moho produzca Micotoxina.

También puede ocurrir el hecho de detectar la Mico toxina sin la presencia del hongo productor, puesto que las formas vegetativas y germinativas del moho pueden ser inactivadas por procesos químicos o por alteración de los factores ecológicos, no ocurriendo el mismo con las Mico toxinas, que permanecen en el sustrato. Un ejemplo práctico de un caso de estrogenismo en caballos producido por una significativa contaminación con Zearalenona en residuos de maíz que los animales estaban comiendo. El análisis de Micotoxinas reveló la existencia de Zearalenona en concentraciones del orden de 3 ppm y en cambio el análisis micológico no reveló la existencia de *Fusarium spp* (especies de este moho son productoras de Zearalenona por excelencia, por ejemplo, el *Fusarium roseum*) (Gimeno, 2001).

Esto no llamó la atención ya que posiblemente el *Fusarium spp* produjo la Zearalenona en el campo y allí contaminó el maíz, posteriormente cuando el maíz fue cosechado y fue sometido a los procesos de secado, el *Fusarium spp* murió, sin embargo el producto químico Zearalenona resistió perfectamente y se mantuvo contaminando el alimento (Gimeno, 2001).

Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de Micotoxinas

Factores Físicos.

Humedad y Agua disponible o Actividad de agua (aw)

La actividad del agua (aw), junto con la temperatura, son los factores más determinantes del desarrollo fúngico. La aw se usa en microbiología como medida de la disponibilidad de agua por parte de los microorganismos, ya que dicha medida es independiente del sustrato o alimento al que se refiere, contrariamente a lo que ocurre cuando se utiliza la humedad como parámetro. (Soriano del castillo, 2007)

En el campo de las Micotoxinas, la aw es el parámetro responsable del hecho de que unas Micotoxinas se acumulen en los alimentos, generalmente cereales, en pos cosecha, y otras lo hagan en pos cosecha, en condiciones más bajas de humedad. Así por ejemplo, las toxinas de Fusarium (Fumonisin, Deoxinivalenol y Zearalenona, principalmente) se acumulan en cereales en campo, o durante el almacenamiento sin secado previo, mientras que las Micotoxinas de Aspergillus y Penicillium, como la Ocratoxina suelen acumularse en cereales almacenados. La presencia de Aflatoxinas suele ir ligada a la contaminación en campo por *A. flavus*, pese a que también puede sintetizarse en cereales almacenados con bajo niveles de humedad (Soriano del Castillo, 2007).

Dicha diferenciación entre "Micotoxinas de campo" y "Micotoxinas de almacén" ha ido ligada tradicionalmente a la contaminación en cereales. Sin embargo, la detección de Micotoxinas en una gama de sustratos alimenticios cada vez más amplia, ha llevado a la conclusión de que no todos los hongos micotoxigénicos

pueden acumular Micotoxinas en condiciones de baja aw, pero que, en cambio, todos aquellos conocidos por su capacidad de adaptación a bajos requerimientos hídricos, pueden ser potenciales productores en campo o en condiciones de moderada/alta aw, en aquellos sustratos que por su elevada incidencia, o por la ausencia de competidores, pueden colonizar (Soriano del castillo, 2007).

Además del aw también influye el agua existente en el ambiente. No sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de la misma. El agua se encuentra en forma libre y en forma combinada. El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales. La forma combinada está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con las proteínas y glúcidos. Para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre. Existen dos grandes unidades relacionadas con la cantidad de agua, a saber:

- Humedad relativa de equilibrio (HRE): es la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje y varía de unos alimentos a otros conforme su riqueza en glúcidos o en materia grasa.
- Agua disponible o Actividad de agua (aw): es la relación existente entre el agua libre en los alimentos y la capacidad de los microorganismos para proliferar en esas condiciones. La aw nos indica cual es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema - alimento/medio ambiente.

La a_w se expresa como la relación existente entre la tensión del vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura (P_0) a la misma temperatura, ($a_w = P/P_0$). Si la humedad del alimento está en equilibrio con la humedad relativa de equilibrio (HRE) de la atmósfera que lo rodea, la a_w en el alimento es numéricamente equivalente a esta, ($a_w = HRE/100$) (Gimeno, 2001).

La HRE se refiere a la atmósfera en equilibrio con el producto y la a_w se refiere al propio producto. El agua pura tiene una a_w de 1 y está en equilibrio con una atmósfera de 100% de HRE. La a_w de un alimento es siempre menor que 1.

Los valores de a_w que los diversos grupos de hongos necesitan, varían de acuerdo con el sustrato y la temperatura, veamos ahora algunos valores de a_w necesarios para el desarrollo de algunos hongos y para la producción de Mico toxinas (Gimeno, 2001).

Tabla N° I: Valores mínimos necesarios de aw para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas Micotoxinas.

Mohos	aw	Micotoxinas	aw
Aspergillus flavus	0,78	Aflatoxinas	0,83
Aspergillus parasiticus	0,70	Aflatoxinas	0,80
Fusarium sportrichioides	0,88	Toxina T2	-
Fusarium gramineum	0,87	Don	0,97
Fusarium moiliniforme	0,87	Fumonisina	-
Fusarium gramineum	0,87	Zearalenona	0,97
Aspergillus ochraceus	0,77	Ocratoxinas	0,88
Penicillium cyclopium	0,82	Ocratoxinas	0,90
Penicillium viridicatum	0,83	Ocratoxinas	0,90

Fuente: Gimeno, 2001

Así pues, la mayor parte de los hongos se desarrollan a partir de valores de aw de 0,70, en general es raro que haya hongos que germinen con valores de aw entre 0,60 y 0,70. Es de destacar que las bacterias por regla general no se reproducen con valores de aw por debajo de 0,90 (Gimeno, 2001).

La producción de Micotoxinas es nula o muy baja con aw inferior a 0,85 y no obstante el crecimiento de mohos toxico génicos ya se puede producir en un intervalo de aw de 0,70 - 0,85 (Gimeno, 2001).

Aunque el valor porcentual de humedad libre de un alimento solo da una orientación para juzgar las posibilidades de crecimiento y multiplicación de los hongos, en

valores de humedad total inferiores al 13% suelen presentar un crecimiento y proliferación fúngica bajos, y a medida que la humedad aumenta, el crecimiento y proliferación fúngicas se aceleran, pudiendo ser de forma exagerada para valores del 16% (Gimeno, 2001).

Temperatura

Los Mohos están adaptados a desarrollarse en un amplio rango de temperatura, de manera que las condiciones de producción, en campo, de la mayoría de las materias primas para la industria alimentaria pueden conducir a la existencia de un problema fúngico o de Micotoxinas. El almacenamiento de dichas materias primas a temperatura ambiente favorece el crecimiento fúngico, y la refrigeración, por si sola, no suele ser suficiente para frenar la alteración por parte de los mohos (Soriano del castillo, 2007).

La temperatura óptima es aquella en la cual el desarrollo del moho se realiza con la máxima eficiencia. Para los hongos esta temperatura se encuentra entre 25 y 30°C. La mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5°C y, sin embargo, hay hongos como el *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus*, que pueden crecer hasta los 55°C y otros como el *Penicillium expansum* y el *Penicillium cyclopium* que son capaces de hacerlo a 0°C (Gimeno, 2001).

Tabla N° II: Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y Micotoxinas.

Mohos	T (°C)	Micotoxinas	T (°C)
<i>Aspergillus flavus</i>	10	Aflatoxinas	10
<i>Fusarium sportrichioides</i>	0	Toxina T2	22,5-27,5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10 - 12	Ocratoxina	12
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	Ocratoxina	0 – 24
<i>Fusarium roseum</i>	15	Zearalenona	10
<i>Fusarium moiliniforme</i>	2,5	Fumonisina	-
<i>Fusarium</i>	24	DON	24-26
<i>Fusarium roseum</i>	24-27	ZEA	10-12

Fuente: Gimeno, 2001

Existe en algunos casos una proximidad entre la temperatura mínima necesaria para el crecimiento del moho y la óptima para la producción de la Micotoxina y, en general, también sucede con la temperatura óptima. Existen algunas excepciones, como por ejemplo el *Aspergillus flavus* que se desarrolla en el arroz entre 6°C y los 45°C con temperatura óptima de 37°C y la producción de Aflatoxina se efectúa entre 11°C y 36°C con un máximo de producción de 30°C (Gimeno, 2001).

El *Fusarium roseum* (moho productor de zearalenona), se desarrolla bien entre 24 y 27°C, no obstante solo producirá Micotoxina a temperaturas entre 10°C y 12°C. Hay variedades de *Fusarium roseum*, como *Fusarium roseum* "gibbosum" y *Fusarium roseum* "semitectum" capaces de producir en granos de sorgo a 25°C, cantidades de Zearalenona equivalentes a las producidas a 10°C (Gimeno, 2001).

A pesar de estas temperaturas mínimas necesarias para el crecimiento de algunos mohos, se pueden generalizar condiciones óptimas para un crecimiento y proliferación fúngica: una aw superior a 0,75, una temperatura superior a 20°C y orientativamente una humedad del sustrato de 14% o más.

Con una actividad de agua a 20° C del 0,85 que aproximadamente puede corresponder a un 15-16% de humedad en el sustrato, las esporas fúngicas germinan en 5 a 12 días, con una actividad de agua de 0,75 (que corresponde aproximadamente al 13-14% de humedad en el sustrato) a la misma temperatura, las esporas fúngicas tardan en germinar de 4 a 12 semanas. Sin embargo, puede haber variaciones según el tipo de semilla (alimento) del que se trata (Gimeno, 2001).

La HRE varía de semilla en semilla, conforme ésta sea amilácea u oleaginosa.

Los granos de cereales (maíz, trigo y sorgo) mantenidos en estado de equilibrio a un nivel de humedad de 13% o menos (lo que correspondería a una humedad relativa de equilibrio del 65%), se pueden almacenar con seguridad durante un tiempo indefinido. Esto no pasa con la soja en estas mismas condiciones ni con el girasol, donde un 13% de humedad en estado de equilibrio correspondería a una HRE de casi 85% (Gimeno, 2001).

Esto indica que cualquier semilla almacenada en estado de equilibrio con una HRE por debajo de 65%, no será invadida por hongos propios.

Cereales con niveles de humedad de 13,5 - 14%, como el trigo, maíz y sorgo, podrán ser invadidos por hongos tales como *Aspergillus restrictus* y *Aspergillus halophilicus*. Sí la humedad fuera de 15% o mayor, la invasión fúngica más común sería por *Aspergillus glaucus* (Gimeno, 2001).

Los valores de humedad necesarios para la metabolización de la Mico toxina Aflatoxina B1 por el *Aspergillus flavus* varía según el tipo de alimento. Trigo, maíz y sorgo necesitan un 18% de humedad. La soja necesita un 17-18% (Gimeno, 2001).

La conclusión lógica, es que el almacenamiento de un cereal o de una semilla oleaginosa no debe ser efectuado con el mismo valor de humedad, para preservar el desarrollo fúngico y una posible producción de Mico toxinas (Gimeno, 2001).

Zonas del silo donde se producen micro floras que favorecen el desarrollo de hongos y Micotoxinas.

En los silos pueden existir pequeñas zonas de alimento con alto contenido en humedad susceptible de desencadenar un desarrollo fúngico, lo cual provocaría un aumento general de humedad en el sustrato y consecuentemente una mayor contaminación fúngica y predisposición acrecentada para la producción de Mico toxinas (Gimeno, 2001).

En las diferentes estaciones del año, verano e invierno, se pueden crear estas zonas de micro flora en el interior de los silos.

En VERANO el aire que rodea al grano almacenado en un silo tiene una temperatura más elevada en la zona periférica que en la zona central. El aire frío de la zona central desciende y el aire caliente de la zona periférica absorbe humedad y asciende, creándose de esta forma corrientes de convección (Gimeno, 2001).

El aire frío en su desplazamiento, provoca una depresión que obliga a que el aire caliente y cargado de humedad, una vez alcanzada la parte superior del silo, descienda hacia la zona central. Así se condensa la humedad en aquella zona de contacto del aire caliente con las zonas centrales más frías (Gimeno, 2001).

En INVIERNO ocurre lo contrario, el aire de la zona central tiene una temperatura más elevada que el de la periferia. El aire de la zona central tiene, al estar más caliente, una mayor capacidad de saturación y por lo tanto absorbe humedad. Este aire más caliente, asciende por ser más ligero y el de la periferia desciende por ser frío y más denso, creándose de esta forma corrientes de convección (Gimeno, 2001).

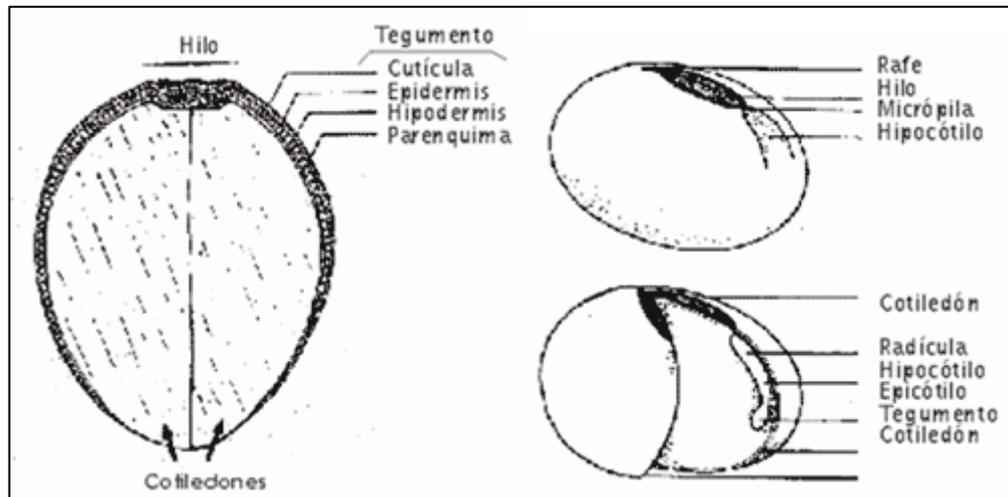
El aire que está caliente y cargado de humedad, cede esta al ponerse en contacto con las zonas superiores más frías, debido a que pierde calor y su capacidad de saturación disminuye. Estas migraciones de humedad que sufren las materias primas y piensos en los silos de almacenamiento tiene una importancia decisiva en el desarrollo fúngico y en la posible producción de Micotoxinas (Gimeno, 2001).

No está de más advertir sobre el cuidado a tener en lo que respecta a las infiltraciones de humedad en los silos durante los días lluviosos (Gimeno, 2001).

Integridad física de los granos.

Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos son más susceptibles de invasión y desarrollo fúngico, que los granos enteros. Esencialmente esto es debido a un aumento de la superficie de cultivo y una mayor predisposición para que el hongo contacte con la parte interna del grano, la cual es más vulnerable que la cutícula o parte externa.

Imagen Nº 8: Morfología del grano de Soja



Fuente: www.Engormix.com

Factores químicos

Rango de PH

Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2,5 - 7,5), de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro del alimento (Gimeno, 2001).

Composición del sustrato

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y se nutren de micro y macro elementos existentes en el sustrato donde se desarrollan. Sin embargo la

composición del sustrato está muy ligada a la producción de la Micotoxina (Gimeno, 2001).

Tradicionalmente muchos estudios de producción de Micotoxinas se han llevado a cabo en condiciones óptimas de laboratorio y con medios, por lo general, suponen sustrato idóneo para la síntesis de estos metabolitos fúngicos (Soriano del Catillo, 2007).

Sin embargo, en la naturaleza esto no ocurre así, y se ha descrito en numerosas ocasiones como, para una determinada cepa fúngica, la capacidad para producir Micotoxinas y la cantidad sintetizada es función del sustrato sobre el cual el moho se desarrolla. (Soriano del Catillo, 2007)

Están descritos estudios en cereales y semillas de oleaginosas previamente esterilizadas en autoclave e inoculadas con estirpes toxico génicas de *Aspergillus parasiticus*.

Los resultados obtenidos indican que la soja es un sustrato pobre para la producción de Aflatoxina, aunque esté en las mejores condiciones de producción (Gimeno, 2001).

Tabla N° III: Producción de Aflatoxina (ppm) por el *Aspergillus parasiticus* en diversas semillas.

Semilla	NRRL 3000	NRRL 2999	NRRL 3145
Cacahuete	107	104,0	8,50
Soja	19	2,8	0,06
Maíz	53	47,0	5,50
Trigo	72	19,0	7,10
Arroz	107	185,0	10,60
Sorgo	72	88,0	57,60

Fuente: Gimeno, 2001

En este estudio el crecimiento del *Aspergillus parasiticus* en la soja fue excelente y la baja producción de Aflatoxina fue solo debida a la composición del sustrato (Gimeno, 2001).

Nutrientes minerales.

Están relacionados con la composición del sustrato y a pesar de que hierro y zinc son los elementos más importantes para un desarrollo fúngico, tanto estos como otros elementos pueden ser necesarios para la producción de Micotoxinas (Gimeno, 2001).

Potencial de oxi - reducción (O_2/CO_2)

La mayor parte de los hongos son aerobios y por lo tanto necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. La carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de

éstos. El anhídrido carbónico puede inhibir la formación de algunas Micotoxinas, como las Aflatoxinas (Gimeno, 2001).

Factores biológicos

Presencia de invertebrados

La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la micro flora y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad del sustrato y además la rotura del pericarpio permite la infección del interior del grano (Gimeno, 2001).

Estirpes específicas

En una misma especie fúngica, no todas las estirpes se comportan de la misma forma. Las estirpe NRRL 1957 de *Aspergillus flavus* no produce Aflatoxina, sin embargo ella es producida por otras estirpes como: NRRL 3251, NRRL 3357, NRRL 3517 y NRRL 3353 (Gimeno, 2001).

Contaminación de los alimentos de acuerdo con las diferentes variaciones estacionales.

La contaminación de los alimentos por mohos y levaduras varía según la época climática y puede indicar un prototipo de contaminación en los alimentos de acuerdo con las diferentes variaciones estacionales, los datos vienen expresados en porcentaje.

Tabla N° IV: Variaciones estacionales.

MOHOS Y LEVADURAS	INVIERNO	VERANO	OTOÑO	PRIMAVERA
Levaduras	33,50	59,40	40,00	29,80
Penicillium	18,00	13,26	11,00	14,20
Aspergillus	1,56	5,54	1,00	6,50
Fusarium	25,10	7,01	14,00	27,10
Alternaria	0,09	0,16	0,96	1,10
Cladosporium	1,00	5,10	0,60	0,95
Mucorales	14,30	4,53	31,89	16,40

Fuente: Gimeno, 2001

Estas variaciones estacionales están relacionadas con la patología alimentaria de las aves y ganado (Gimeno, 2001).

Daños que provocan los mohos en las materias primas y alimentos compuestos.

- a. Modificación de las características organolépticas del alimento: mal olor, mal sabor, mal aspecto con decoloración, apelmazamiento y disminución de la fluidez. Es evidente que todo esto conduce a una significativa disminución de la calidad del pienso.
- b. Deterioro y reducción de las características nutritivas del alimento en las fases de proliferación y crecimiento fúngico, hay un consumo de nutrientes básicos por parte de los mohos y levaduras produciéndose una degradación de proteínas, grasas e hidratos de carbono así como también alteraciones en los

- valores vitamínicos. Todo esto conduce a una disminución del valor proteico, energético y del contenido en almidones (amiláceo).
- c. Una segregación masiva de enzimas que provoca reacciones de lisis fuertemente exotérmicas. Es evidente que este calor perdido disminuye el valor energético original del alimento afectado. Por otro lado, se pueden ocasionar explosiones e incendios por la acumulación de metano y otros gases inflamables en los silos, que se desprenden en los procesos metabólicos de los hongos durante el ataque a las materias primas y piensos compuestos.
 - d. Reducción de peso en el producto almacenado (mermas) en los silos.
 - e. Agravamiento en el deterioro de las materias primas y piensos por verse favorecido el crecimiento y proliferación de microorganismos más exigentes en temperatura y humedad, como consecuencia de un aumento de estos parámetros físicos producido por el metabolismo de los hongos más xerófilos que suelen desarrollarse a humedades más bajas.
 - f. Contaminación de las materias primas y piensos compuestos por metabolitos secundarios tóxicos llamados Micotoxinas y producidos por algunas especies y estirpes fúngicas con capacidad genética para producirlas dentro de determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas (Gimeno, 2001).

Problemas que generan las Micotoxinas

Elevados niveles de Micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre y gran variedad de especies animales. Los efectos adversos pueden afectar a distintos órganos, aparatos y sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunitario.

Las Micotoxinas abarcan un amplio espectro de efectos fisiopatológicos, entre los que hay que destacar los producidos sobre el sistema inmunitario, ya que disminuye las defensas en animales y en el hombre y aumenta la susceptibilidad a las infecciones (Soriano del Castillo, 2007).

1. Aflatoxinas

Las Aflatoxinas son las Micotoxinas más conocidas, incluso el descubrimiento de las Micotoxinas ocurrió por un evento en 1960 donde en Inglaterra murieron 100.000 pavipollos por aflatoxicosis aguda, el alimento responsable fue maní originario de Brasil (Soriano del Castillo, 2007).

Las Aflatoxinas son producidas por dos especies: *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Los principales productos contaminados con Aflatoxinas son maíz, maní y semilla de algodón. Pero se debe tener en cuenta que se encuentra Aflatoxinas en una gran variedad de alimentos: pimienta, almendras, cacao, etc., incluso se encuentran metabolitos de estas toxinas en leche y productos cárnicos (Soriano del Castillo, 2007).

Las Aflatoxinas generalmente se asocian al maíz que se genera en climas cálidos, pero una de las principales razones de su producción es el stress hídrico, es decir que con las sequías puede haber producción de Aflatoxinas en climas templados e incluso fríos (Soriano del Castillo, 2007).

Esta toxina puede ocurrir a campo (generalmente asociado al stress hídrico, sobre todo en el momento de la espigazón) o en almacenamiento, y aquí las condiciones de humedad son las que favorecen la producción de la toxina (Soriano del Castillo, 2007).

Pueden verse picos estacionales en el contenido de Aflatoxinas en años en los cuales las plantas han sido expuestas a la sequía o cosechas dañadas por insectos; donde las semillas se vuelven más susceptibles a la invasión de hongos (Manal, 2012).

El hongo debe tener acceso a partes sensibles de la planta (por ejemplo, el núcleo de maíz, semilla de algodón, etc.) antes de que crezca y elabore las Aflatoxinas (Manal, 2012).

La Aflatoxina B1 se presenta mayormente en una serie de alimentos importantes para el ganado. El crecimiento de las cepas toxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en el maíz, semilla de algodón y maní a menudo resulta con niveles perjudiciales de Aflatoxina B1, que es el miembro biológicamente más activo de la familia de Aflatoxinas. Estos tres alimentos son las fuentes más importantes de Aflatoxinas, ocasionalmente pueden colonizar los granos de cereales pequeños (cebada, avena, y trigo) y producir bajos a moderados niveles de Aflatoxinas. La soja no es compatible con niveles apreciables de producción de Aflatoxina B1 (Manal, 2012).

Las Aflatoxinas son principalmente hepatotóxicas, en este órgano produce muchas alteraciones. El aspecto del hígado que presenta toxicidad por Aflatoxinas se denomina “nuez moscada” dado que se produce una alteración grasa con hemorragias centrolobulillares. La afección hepática se evidencia también por ictericia. Además se ve alterada la síntesis proteica, por lo que se producen alteraciones en la hemostasia y se produce hemorragias. Las Aflatoxinas son carcinogénicas (Soriano del Castillo, 2007).

2. Deoxinivalenol

El Deoxinivalenol (DON o Vomitoxina) es un Tricoteceno de grupo B, producido por hongos del género *Fusarium*. Los principales productores son el *Fusarium graminearum* y *Fusarium culmorum* (Soriano del Castillo, 2007).

El *Fusarium graminearum* es un fitopatógeno productor de la fusariosis de la espiga o Fusarium Head Blight (FHB), o head scab, que infecta al cultivo durante el desarrollo (Soriano del Castillo, 2007).

El Deoxinivalenol es una Micotoxina muy importante desde el punto de vista industrial, ya que se asocia con defectos en algunos procesos, como ser el levado en la masa del pan, y la producción de “gushing” en las cervezas; el gushing es un defecto que se produce en las cervezas en el cual la espuma sale a borbotones y de forma espontánea (Soriano del Castillo, 2007).

El Deoxinivalenol es una toxina que afecta mucho la producción de carne, tiene efectos sobre el tracto gastro-intestinal que alteran los parámetros productivos por la producción de diarreas, a su vez altera el centro emético lo que produce vómitos, y anorexia (Soriano del Castillo, 2007).

En humanos aparentemente actúa de modo similar que en otros mono gástricos. Y se pudieron registrar brotes agudos en la India, Japón y otros países asiáticos. En el caso de rumiantes, el Deoxinivalenol se detoxifica en el Rumen (Soriano del Castillo, 2007).

3. Toxina T-2

Los Tricótesenos de grupo A, son producidos principalmente por *Fusarium poae* y *sporotrichioides*. Dentro de este grupo se encuentran: toxina T2, HT2, Neosolaniol y DAS (diacetoxicissirpenol). Se producen principalmente sobre trigo, avena y maíz, aunque hay algunos reportes sobre soja. La ocurrencia suele asociarse a temporadas prolongadas de lluvia al momento de la cosecha. En otros casos se produce en cereales que han permanecido en el campo durante el invierno, bajo la capa de nieve (Soriano del Castillo, 2007).

Los Tricótesenos de grupo A, actúan principalmente sobre los tejidos con rápida proliferación, es decir sobre células epiteliales y sanguíneas. El efecto tóxico sobre estas células puede evidenciarse en las aves, donde los daños en la cavidad oral son característicos. Además producen dermatitis en muchos animales como ser cerdos, perros, gatos, etc. Estas toxinas, tienen una fuerte capacidad inmunodepresora, lo que se traduce también en alteraciones en parámetros productivos (Soriano del Castillo, 2007).

En humanos se asocia a la Toxina T-2 con una intoxicación masiva en una aldea de Siberia 1913-14, donde se produjo una enfermedad denominada Aleucia Tóxica Alimentaria, donde se produjo una depresión de las células sanguíneas que conllevaron a la muerte de los afectados (Soriano del Castillo, 2007).

4. Fumonisina

Las Fumonisinas son toxinas producidas principalmente en maíz por *Fusarium verticilloides* (moniliforme) y *proliferatum*. Estas Mico toxinas suelen ocurrir cuando el clima seco es seguido por lluvias y humedad (Soriano del Castillo, 2007).

Seis tipos de Fumonisinas diferentes (FA1, FA2, FB1, FB2, FB3 y FB4) han sido reportados, la serie A son amidas y la serie B tienen una amina libre (Gelderblom et al., 1991).

Las Fumonisinas son estables durante el procesamiento de alimentos: por ejemplo no son degradadas durante la fermentación del maíz (Scott y Lawrence, 1995); son estables al calor (Marasas, 1997) y resistente a los procesos de enlatado y horneado (Castelo et al., 1998), aunque en el maíz el proceso de nixtamalización reduce los niveles Bullerman y Bianchini, 2007; Hendrich et al, 1993; Voss et al, 1996).

Las Fumonisinas tienen un gran variedad de órganos blanco, actúa principalmente en el metabolismo graso. Los équidos son muy sensibles, al punto que se indica cero tolerancias de Fumonisinas para las raciones para estos animales. En caballos producen una enfermedad que se denomina Leucoencefalomalacia equina, en la que se deteriora la sustancia blanca del cerebro y termina con la muerte de los animales. En cerdos produce una alteración que se denomina Edema Pulmonar Porcino, a diferencia de la enfermedad producida en equinos, los niveles de toxinas necesarios para producir esta enfermedad son mucho más altos. Las Fumonisinas también afectan al hígado y riñones. Además de otros parámetros productivos (Soriano del Castillo, 2007).

En humanos, las Fumonisinias son clasificadas por el IARC como carcinógeno de Grupo 2B (posible) y se asocia principalmente a cáncer de esófago (Soriano del Castillo, 2007).

5. Zearalenona

La Zearalenona es una toxina producida por *Fusarium graminearum* y, los cultivos afectados son principalmente maíz, trigo y sorgo, pero se ha encontrado una ocurrencia interesante en soja. Recordemos que el *F. graminearum* produce la fusariosis del trigo y el maíz (Soriano del Castillo, 2007).

La Zearalenona es muy frecuente que aparezca en cultivos de otoño e invierno, y sobre todo en climas frescos y húmedos (Soriano del Castillo, 2007).

La Zearalenona es un estrógeno mimético, por lo cual sus principales problemas son los relacionados a la reproducción. Los cerdos son los animales más sensibles, y dentro de los efectos se puede observar vulvovaginitis camadas pequeñas, abortos, edema en el sistema reproductivo, infertilidad, etc. (Soriano del Castillo, 2007).

En humanos hay registros de pubertad precoz en niños que han consumido alimentos contaminados con Zearalenona (Soriano del Castillo, 2007).

6. Ocratoxinas

Las Ocratoxinas son metabolitos producidos por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Wood, 1992).

La Ocratoxina A fue descubierta en 1965 por científicos sudafricanos como un metabolito secundario tóxico del *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965).

Se ha demostrado que otras especies de grupo *A. ochraceus* y varias especies de *Penicillium*, incluyendo *Penicillium viridicatum*, también la pueden formar.

La Ocratoxina A es el principal metabolito de importancia toxicológica y se trata principalmente de un contaminante de los granos de cereales (maíz, cebada, trigo y avena). También ha sido encontrado en frijoles de soja, café, cacao, maní y carne en algunos países (Krogh, 1987).

En regiones templadas y frías, la Ocratoxina es producida principalmente por *Penicillium verrucosum* o *P. nordicum*. En regiones subtropicales y tropicales, el principal moho productor de Ocratoxina es *Aspergillus ochraceus*, pero también se ha asociado la producción de esta toxina en regiones cálidas a otras dos especies de *Aspergillus* sección *Nigri*: *A. niger* var *niger* y *A. carbonarius* (Soriano del Castillo, 2007).

Es la más tóxica. Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se elimina lentamente. Presenta alta afinidad por las proteínas plasmáticas. Se excreta en heces y orina (Soriano del Castillo, 2007).

Tabla N° V: Efectos nocivos para la salud

Micotoxina	Efectos fisiopatológicos
Aflatoxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Daño Hepático Agudo • Inducción de tumores • Disminución de la eficacia del sistema inmunitario • Teratogénesis • Excreción por leche • Acumulación en tejidos
Ocratoxinas	<ul style="list-style-type: none"> • Nefropatía endémica de los Balcanes • Acumulación en riñón, Hígado y Musculo • Vómitos • Teratogénesis • Mutagenesis • Embriotóxicas
Fumonisinias	<ul style="list-style-type: none"> • Neurotóxicos • Nefróticos • Edemas pulmonar y cerebral • Hepatotóxicas • Lesiones cardiacas • Afecta cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón • Excreción en leche
Tricótesenos (Deoxinivalenol y T2)	<ul style="list-style-type: none"> • Vómitos • Taquicardia • Diarrea • Perdida de atención • Hemorragias • Edemas • Necrosis de los tejidos cutáneas • Destrucción de tejidos hematopoyéticos • Disminución de glóbulos blancos y plaquetas circulantes • Meninges hemorrágicas • Alteración del sistema nervioso • Rechazo del alimento • Lesiones necróticas en la boca • Degeneración patológica de las células de medula ósea • Nódulos linfáticos e intestino
Zearalenona	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome estrogénico • Problemas reproductivos • Excreción por leche

Fuente: Soriano del Castillo, 2007

La agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer clasifica varias Micotoxinas como carcinógenas o potencialmente carcinógenas para el hombre (Soriano del castillo, 2007).

Según la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) las clasifica de la siguiente manera:

Tabla N° VI: Clasificación carcinogénica de las Micotoxinas.

Micotoxina	IARC
Aflatoxinas	1
Ocratoxinas	2B
Fumonisinias	2B
Tricótesenos (Deoxinivalenol y T2)	3
Zearalenona	3

Fuente: Soriano del Castillo, 2007

Donde el:

- ✓ GRUPO 1 es carcinógeno en humanos.
- ✓ GRUPO 2B: es agente posiblemente carcinógeno, la evidencia en humanos es limitada y tampoco hay suficiente evidencia con animales de experimentación.
- ✓ GRUPO 3, el agente n es clasificables como carcinógeno para humanos y no puede incluirse en otro grupo.

Control de las Micotoxinas

Debido a la comprobada naturaleza tóxica de las Micotoxinas, existe la necesidad de prevenir la contaminación de los alimentos por parte de los hongos toxigénicos y controlar el crecimiento fúngico mediante la manipulación del micro ambiente que se encuentra en el alimento. Otros métodos de control son utilizados para que la reducción de la concentración de Micotoxinas pueda estar en niveles seguros, como la utilización de productos de degradación de los tóxicos, sin que estos procesos promuevan la disminución del valor nutritivo de los alimentos descontaminados (Mallman, 2007).

Los métodos para control de las Micotoxinas pueden ser clasificados dentro de dos categorías principales: la prevención de la contaminación y del crecimiento fúngico; y la detoxificación de los compuestos tóxicos producidos por los hongos (Mallman, 2007).

Prevención de la contaminación y el crecimiento fúngico

La prevención de la contaminación por hongos toxigénicos y su crecimiento, puede ser manejada por algunos de los siguientes métodos:

Mejora de las prácticas agrícolas.

El ataque fúngico a los alimentos puede comenzar en el campo, mediante la contaminación de las cosechas por los hongos productores de Micotoxinas. Muchas Micotoxinas, en particular las Aflatoxinas, Zearalenonas, Tricótesenos y Alcaloides de Ergotaminas, pueden formarse durante el período de crecimiento de las plantas en el campo. Para prevenir esta contaminación, es necesario que se mejoren las prácticas agrícolas, entre otras, usando semillas de calidad y libres de

hongos, impidiendo el ataque de los insectos y las enfermedades de las plantas (Mallman, 2007).

Durante el proceso de cosecha es importante que se evite al máximo lesionar físicamente el cereal, pues el daño mecánico está invariablemente asociado con una rápida invasión de hongos. Otro factor importante en el proceso de cosecha es la limpieza de los cereales, pues los residuos que quedan adheridos, pueden ser portadores de especies fúngicas micotoxigénicas. También, para prevenir la contaminación fúngica es importante implantar buenas prácticas de almacenamiento y buenas condiciones ambientales que impidan el ataque de los hongos (Mallman, 2007).

Agentes Anti fúngicos.

Existe una evidencia limitada del efecto de los fungicidas sobre la producción de Micotoxinas. Fungicidas tales como carboxin, clortalonil, mancozeb, dicloran, iprodiona, metil-tolclofos y vinclozolina se han mostrado eficaces in vitro para la inhibición del crecimiento y producción de Aflatoxinas por *A. Paraciticus* y de OTA por *A. Ochraceus* y *Penicilium Funiculosum*. Existen, sin embargo, pocos estudios de campo (Soriano del Casillo, 2007)

La fusariosis en cereales es, en la actualidad, una de las más importantes plagas en el mundo. Tanto en estudios de laboratorio, como en campo, los resultados sobre la efectividad de los tratamientos fungicidas tanto para la prevención de la fusariosis como de la producción de las Micotoxinas asociadas (Deoxinivalenol y derivados mayoritariamente) son contradictorios (Soriano del Castillo, 2007).

En general, los estudios con fungicidas muestran disminución de la infección y acumulación de Deoxinivalenol, pero en ningún caso erradicación, siendo los

derivados azólicos los más efectivos. Incluso, niveles bajos de tiabendazol, tebuconazol y fluquinconazol parecen estimular el crecimiento de *F. Graminearum* in vitro. La variabilidad en los resultados sobre efectividad de fungicidas se achaca a la variabilidad de resistencia de los cultivares, la eficacia de los fungicidas, el espectro de acción, el plan de aplicación y la agresividad de los patógenos (Soriano del Castillo, 2007).

En conclusión, los fungicidas aisladamente no parecen ofrecer una protección eficaz en campo contra la acumulación de Micotoxinas (Soriano del Castillo, 2007).

Ingeniería genética.

El genoma de las plantas tiene influencia notable sobre las contaminaciones fúngicas y en la subsecuente biosíntesis de Micotoxinas, por eso la importancia de desarrollar nuevas variedades, mediante la ingeniería genética, capaces de resistir el ataque de los hongos o inhibir la producción de toxinas. Diversos investigadores han encontrado variedades de semillas que presentan diferencias significativas con relación a la contaminación por *Aspergillus flavus* y su consecuente producción de Aflatoxinas. Estas diferencias pueden ser por diversos factores y el genoma de la planta puede influir en la expresión de la biosíntesis de la Micotoxina. Esto puede ser debido a la síntesis de metabolitos específicos por parte de la planta, de igual forma se ha demostrado que algunos productos naturales pueden reducir la biosíntesis de las Micotoxinas en mayor proporción que la de inhibir el crecimiento fúngico (Mallman, 2007)

Control de las condiciones de almacenamiento

El almacenamiento de las cosechas tiene un papel importante en la calidad fisicoquímica y microbiológica de las mismas. Las especies fúngicas que se desarrollan en un ambiente dado dependen de la humedad, la temperatura, la presencia de microorganismos competidores y de la naturaleza y el estado fisiológico del producto. Estos y otros factores influyen decisivamente en el metabolismo fúngico y en la capacidad para que los hongos utilicen los alimentos para el crecimiento y producción de sus metabolitos (Mallman, 2007).

Detoxificación de los alimentos contaminados con Micotoxinas

El mejor método para controlar la contaminación de los alimentos por Micotoxinas es la prevención, pero cuando el producto ya está contaminado y va a ser usado como alimento, es necesario eliminar o disminuir esta contaminación (Mallman, 2007).

Un programa para evitar la producción de Micotoxinas incluye la prevención de biosíntesis y metabolismo de toxinas en el campo y en el almacenamiento; la descontaminación después de la producción de Micotoxinas se refiere al tratamiento pos cosecha para remover, destruir o reducir el efecto tóxico. Es difícil impedir la formación de Mico toxinas en el campo o en las bodegas, mientras que el monitoreo puede impedir que las Micotoxinas se vuelvan una fuente significativa de riesgos para la salud, pues el conocimiento de la contaminación permite la adopción de medidas estratégicas para minimizar el riesgo (Mallman, 2007).

Las estrategias adoptadas en el pre o pos cosecha serán apropiadas y dependerán principalmente de las condiciones climáticas de cada año en particular. El comprender los factores ambientales que promueven la infección, crecimiento y

producción tóxica es un paso importante para un plan efectivo que busque minimizar la ocurrencia de Micotoxinas en alimentos y en raciones.

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) estableció una serie de criterios para determinar si el proceso de descontaminación es apropiado o no; dentro de estos se deben tener en cuenta:

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

Métodos de descontaminación

Métodos físicos

Han presentado éxito para el control de Deoxinivalenol la separación por densidad que en algunos casos reduce los niveles de Tricótesenos y Zearalenona; el carbón activado es parcialmente efectivo en la reducción de la acción de la toxina T-2, se ha comprobado por la disminución de lesiones orales en animales de laboratorio, no se ha observado un efecto similar en la mortalidad (Mallman, 2007).

El proceso ha demostrado ser capaz de reducir los niveles tanto de hongos como de Mico toxinas, siendo esta reducción dependiente de la especie fúngica y del tipo de toxina (Mallman, 2007).

Los métodos físicos y electrónicos de separación y control de especies contaminantes a menudo han sido extremadamente usados por industrias que benefician estos productos para reducir los niveles de Aflatoxinas, ya que estos granos están destinados al consumo humano. Sin embargo, esta no ha sido la forma más eficiente de detoxificación, pues los productos que no tienen evidencia visible del perjuicio ocasionado por el hongo, pueden contener Micotoxinas en niveles significativos (Mallman, 2007).

Métodos químicos

La detoxificación de productos contaminados por inactivación a través de reacciones químicas, alta presión o extracción, usando un solvente orgánico o una combinación de estos, ha sido utilizada para el control de las Aflatoxinas desde 1960. La degradación de esta toxina puede ocurrir durante el procesamiento de alimentos y también por el uso de aditivos, los cuales son compuestos relativamente seguros cuando se utilizan a ciertos niveles. Esta clase de Micotoxinas ha sido las más estudiadas por los diferentes métodos de detoxificación (Mallman, 2007).

La utilización de amoníaco para la descontaminación de productos agrícolas contaminados por Aflatoxinas, ha demostrado ser muy eficiente (Mallman, 2007).

Es importante evidenciar que las Micotoxinas existen conjuntamente con otros compuestos que pueden interactuar entre sí en alimentos y raciones, influyendo en su toxicidad; el efecto negativo se ve favorecido por la combinación de diferentes compuestos tóxicos (Mallman, 2007).

Métodos microbiológicos

Otra forma de descontaminación es el proceso fermentativo; durante este proceso utilizado en la producción de pan a partir de granos de trigo contaminados con Deoxinivalenol, fue observada una reducción de los niveles de toxinas atribuida a la fermentación y al proceso térmico al cual el producto fue sometido. Esta descontaminación ocurre debido a que la levadura puede adsorber las toxinas presentes, reduciendo la contaminación (Mallman, 2007).

Experimentos de fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* con mosto contaminado con Deoxinivalenol y Zearalenona mostraron resultados donde después de 7 a 9 días de fermentación el Desoxinivalenol fue estable al proceso, del contenido inicial de Zearalenona, 69% fue convertido a b-zearalenol (b-ZEL), y 8,1% a a-zearalenol, la mayor parte de la metabolización de la Zearalenona ocurrió en el 1º y 2º días de fermentación, mostrando la inestabilidad de la toxina frente a este proceso. Otras investigaciones demostraron buenos resultados de inhibición en la producción de Aflatoxinas utilizando microorganismos como: *Bacillus spp* (98%), *A. flavus* y *A. parasiticus* (90%) y *Trichoderma spp* (75%) (Mallman, 2007).

Impacto económico del desarrollo de Micotoxinas

Las Micotoxinas siguen presentando una amenaza a la seguridad de la alimentación. La creciente globalización del comercio también añade una nueva dimensión a la importancia de las Micotoxinas no sólo como toxinas, sino también como impedimentos al libre comercio entre los países (Cast, 2003).

Debido a esto las Micotoxinas tienen un gran impacto económico debido a sus efectos tóxicos sobre los animales. Estos efectos son variables dependiendo de su

diferente estructura química, así como de su concentración, duración de exposición, y de la especie, sexo, edad y vulnerabilidad del animal afectado. La ingestión elevada de Micotoxinas puede provocar un elevado deterioro de la salud y producción de los animales (Muzaffer, 2006).

Si consideramos los efectos sobre la productividad de los animales, las pérdidas de las cosechas y los costes asociados a los programas de control y prevención de las Micotoxinas; el impacto económico de las Micotoxinas en la cadena alimentaria y en la producción animal es considerable (Muzaffer, 2006).

Legislación

El establecimiento de niveles de tolerancia aceptables internacionalmente es importante, y facilita el comercio y la adopción de medidas comunes entre países. Los primeros límites establecidos fueron fijados en los años 60 para las Aflatoxinas. A finales del 2003, aproximadamente 100 países habían establecido límites específicos de Micotoxinas en los alimentos e ingredientes para la alimentación animal. Los parámetros que son considerados en la adopción de estos niveles son las fuentes y propiedades toxicológicas de las Micotoxinas, los efectos sobre la salud humana, y la salud y productividad animal, o el riesgo de provocar residuos en los productos de origen animal. Otros factores a tomar en cuenta son la información recogida sobre datos toxicológicos, consumo de alimentos, incidencia y concentración de Micotoxinas en los ingredientes, y las metodologías analíticas más utilizadas; así como las implicaciones económicas más importantes para un comercio internacional seguro de cereales y otros alimentos (Muzaffer, 2006).

La mayoría de los países se rigen por los valores máximos propuestos en el “Reglamento a nivel mundial para las Micotoxinas en los alimentos y en las raciones

en el año 2003”. Este es un estudio realizado por la FAO para recabar información acerca de la reglamentación en diferentes lugares del mundo. La información recibida fue clasificada por país y por comunidad económica (Australia/Nueva Zelanda, UE, MERCOSUR). Y existen reglamentos armonizados en dichas comunidades para algunas Micotoxinas y en determinadas matrices.

La unión europea posee el REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 donde se establecen los límites permitidos. Esta tuvo una revisión agosto de 2015 donde se actualizaron los límites máximos.

Legislación de la Unión Europea sobre contenidos máximos de Micotoxinas en productos alimenticios.

En la siguiente tabla se detallan los límites máximos que establece la Unión Europea para los granos de Soja.

Tabla N° VII: Contenidos máximos de Micotoxinas en productos alimenticios.

Mico toxinas	PRODUCTO	CONTENIDO MAXIMO (µ/ kg o ppb)		
		B1	B1 + B2+ G1 + G2	M1
Aflatoxinas	Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos derivados de la transformación de cereales, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 12, 15, y 17.	2	4	
Ocratoxinas	Cereales no Elaborados	5		
Deoxinivalenol	Cereales no elaborados que no sean de trigo duro, avena y maíz.	1250		
Zearalenona	Cereales no elaborados distintos al maíz.(*)	100		
Fumonisina	Maíz no elaborado (*), excepto el destinado a molienda por vía húmeda	4000		
Toxina T-2	Trigo, Centeno y Otros cereales	100		

REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN

(*) El contenido máximo se aplica a los cereales no elaborados comercializados para una primera fase de transformación. Por «primera fase de transformación» se entenderá cualquier tratamiento físico o térmico, distinto al secado, a que sea sometido el grano o su superficie. Los procedimientos de limpieza, clasificación y secado no se consideran incluidos en la «primera fase de transformación» en tanto en cuanto no se ejerza ninguna acción física sobre el grano en sí y el grano entero permanezca intacto tras la limpieza y la clasificación. En los sistemas integrados de producción y transformación, el contenido máximo se aplica a los cereales no elaborados en caso de que estén destinados a una primera fase de transformación.

Métodos analíticos para Micotoxinas

Para la cuantificación existen diferentes métodos de análisis que pueden ser utilizados pero la selección siempre se debe basar en que el método a utilizar sea confiable, aplicable y práctico (Horwitz, 1982).

El método de cromatografía de líquidos (HPLC) es un método exacto y preciso que ha sido aceptado como método oficial (AOAC International 994.08) y como método de referencia para algunas Mico toxinas (Arellano, 2003).

Otros métodos de referencia son la Cromatografía de Gases (GC), que se utiliza para el análisis de Tricótesenos y la Cromatografía de Capa Fina (TLC). Sin embargo estos métodos no son, ampliamente utilizados, pues requieren de instrumentación de elevado costo y de una alta capacitación del usuario. Por consiguiente en los últimos años se han desarrollado métodos inmunoquímicos (Elisa) para facilitar el análisis. La ventaja de estos métodos es que son rápidos, simples y de bajos requerimientos instrumentales. Por consiguiente, en el caso de un gran número de análisis a realizar, los métodos inmunoquímicos representan una

buena alternativa. Sin embargo, su mayor desventaja es que se presentan interferencias que ocasionan falsos positivos. Por lo tanto, los valores positivos obtenidos con estos métodos conviene que sean confirmados mediante un método de referencia (Arellano, 2003).

Los métodos inmunoquímicos comerciales se pueden dividir básicamente en métodos que utilizan columna de inmunoafinidad y métodos ELISA. Aunque el método de columna de inmunoafinidad fue originalmente desarrollado para la cuantificación mediante Fluorometría, en la actualidad las columnas han sido utilizadas para la purificación y concentración de las Mico toxinas para su detección posterior mediante HPLC, GC y TLC. Los métodos ELISA son generalmente utilizados como monitoreo rápido. Otro aspecto importante es que el método analítico utilizado por el laboratorio haya sido desarrollado y validado para el tipo de insumo analizado (Arellano, 2003).

Es importante que el método seleccionado por un laboratorio sea validado en sus instalaciones y para esto se pueden comparar los resultados contra los de un método de referencia. Así la confiabilidad del método analítico se asegura. La validación del método debe incluir entre otros parámetros la exactitud y la precisión (Arellano, 2003).

Dichos métodos son:

- a. Cromatografía en Capa Fina.
- b. Cromatografía líquida.
- c. Cromatografía de inmunoafinidad y determinación por cromatografía de Líquidos de alta resolución.
- d. Cromatografía de Gases.
- e. Inmunoensayo ELISA.

Cromatografía en capa fina (TLC)

- a. Los métodos de análisis por cromatografía en capa fina (TLC) es utilizada para métodos oficiales de análisis.
- b. Son económicos, rápidos y prácticos, en esencial cuando hay que analizar muchas muestras.
- c. Con ellos se pueden analizar simultáneamente varias Mico toxinas al mismo tiempo en más de una muestra.
- d. En la multidetección se presenta el problema de la purificación, ya que es muy difícil que para varias Micotoxinas tengamos una buena purificación. Si se acelera o se sofisticada demasiado podemos tener problemas de recuperación. Un ejemplo de esto sería al emplear una excelente purificación, a base de una diálisis del extracto en condiciones adecuadas, la eliminación de interferencias fue del orden de un 95%, pero las recuperaciones fueron bajas.
- e. El intentar aplicar la multidetección para una gran variedad de productos, también conduce a problemas de purificación, de forma, que el sistema de limpieza que se aplique será muy bueno para un tipo de productos y no será tan bueno para otro tipo. Sin embargo, estos sistemas son muy útiles para hacer un chequeo inicial de la muestra.
- f. Todo esto se puede mejorar si aplicamos el estudio de la limpieza del extracto, a productos concretos y a Micotoxinas concretas (análisis individual), ya que se puede desarrollar una purificación específica para ese producto y un análisis específico para esa Micotoxina, lo que reporta

más tiempo, más material y es más engorroso para una fábrica de piensos que tiene una gran heterogeneidad de productos.

- g. El otro problema es que para algunas Micotoxinas, las concentraciones mínimas detectables de esta (microgramos/Kg. o mg/Kg) en el alimento (análisis por TLC) son más altas que las que se pueden conseguir por los métodos que utilizan la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Sin embargo, en la mayoría de los casos son suficientes. Si consultamos recopilaciones de datos para diferentes Mico toxinas en lo que respecta a los niveles mínimos de Micotoxina (según las pruebas de campo) que pueden provocar intoxicaciones crónicas, veremos que en algunos casos se detectan concentraciones menores que los niveles tóxicos.
- h. La tendencia es cada vez mayor para encontrar métodos de análisis que sean capaces de detectar (con fiabilidad) concentraciones de Micotoxina cada vez más bajas en el análisis de alimentos para los humanos. Baja precisión.
- i. Es imprescindible obtener una concentración de Micotoxina mínima que pueda ser detectable (Gimeno, 2001).

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

- a. Los métodos de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), son cada vez más utilizados y son aplicados en muchos métodos oficiales.
- b. No son rápidos y son caros, en especial cuando se analizan varias muestras, porque estas técnicas no permiten la multidetección.

- c. Las purificaciones que se consiguen son muy buenas.
- d. Las concentraciones mínimas detectables de Micotoxinas son a veces muy bajas y en general más bajas que las obtenidas por cromatografía en capa fina (para una misma Micotoxina analizada por los dos métodos).
- e. El sistema de cuantificación, proporciona resultados más exactos y con menos variabilidad que los obtenidos por los métodos de cuantificación utilizados en la cromatografía en capa fina (comparando concentraciones conocidas de patrón, método de cuantificación por el límite inferior de comprobación, fluorodensitometría) (Gimeno, 2001).

Cromatografía de inmunoafinidad y determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución

- a. Se están utilizando más los métodos de análisis de Micotoxinas que usan las columnas de inmunoafinidad y después cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- b. Son relativamente rápidos y fácil de realizar. Son caros, en especial cuando se analizan varias muestras, porque estas técnicas no permiten la multidetección.
- c. Las purificaciones que se obtienen, son muy buenas y son determinaciones muy específicas para cada Micotoxina en particular.
- d. El uso posterior de la cromatografía de líquidos de alta resolución y detector de fluorescencia es buen complemento de este método (Gimeno, 2001).

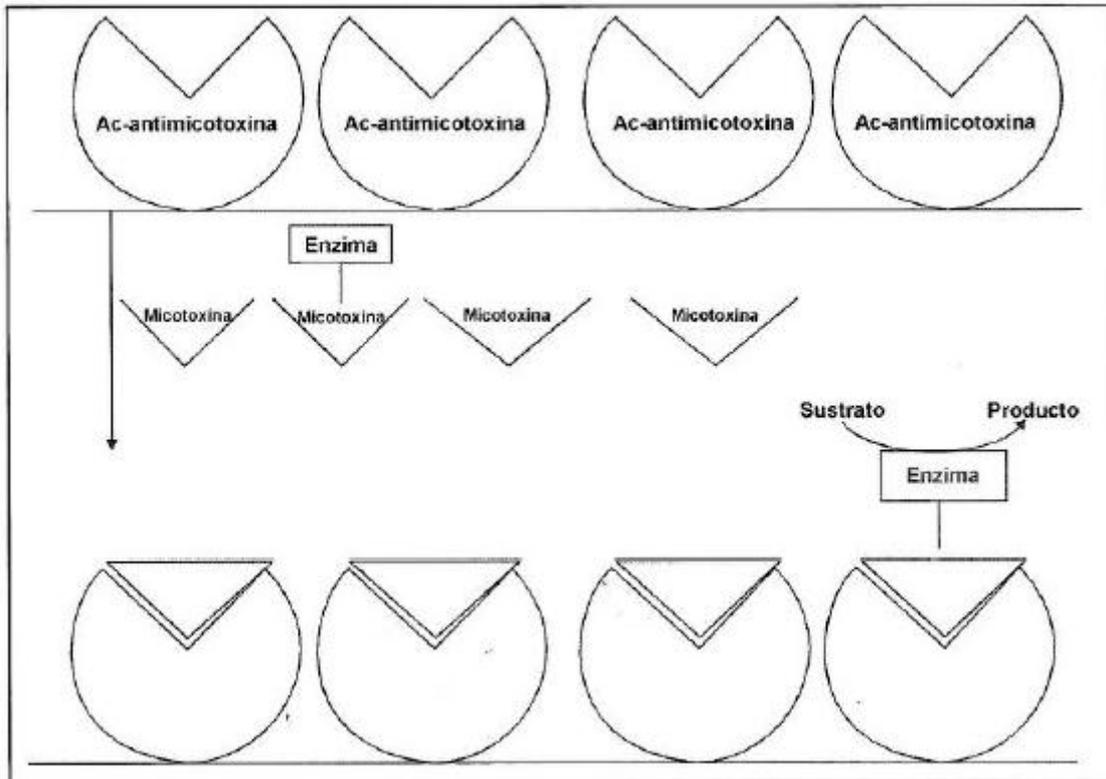
Cromatografía de gases

- a. Los métodos de análisis de Micotoxinas que utilizan la cromatografía de gases son ideales para el análisis de Micotoxinas Tricote cenas (toxina T-2, Diacetoxyscirpenol, Vomitoxina o Deoxinivalenol, Nivalenol y otras como 15-monoacetoxyscirpenol, HT-2 Nivalenol, T-2 Tetraol).
- b. No son rápidos y son caros, pero permiten la determinación simultánea de un buen grupo de Micotoxinas Tricoté cenas.
- c. Las purificaciones que se obtienen son muy buenas.
- d. Las concentraciones mínimas de Micotoxina detectables son bastantes bajas e inferiores que las que se obtienen por cromatografía en capa fina (Gimeno, 2001).

Inmunoensayos

Este método se basa en la reacción específica antígeno- anticuerpo (Ag-Ac) y puede ser del tipo competitivo directo o indirecto. Es directo cuando se añade al medio un extracto de la muestra y una disolución de la Micotoxina unida covalentemente a una enzima (peroxidasa de rábano). Cuantas más moléculas de Micotoxinas existan en la muestra a estudiar, menos moléculas de Micotoxinas conjugada a peroxidasa se unirán al anticuerpo y el color desarrollado por la acción de la peroxidasa sobre el sustrato que posteriormente se añade será inferior (Soriano del Castillo, 2007).

Imagen Nº 9: Método Elisa competitivo directo



Fuente: Soriano del Castillo, 2007

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo sobre granos de soja en un Laboratorio de Control de Calidad Industria Agroalimentaria en la ciudad de Puerto San Martín durante el año 2015.

Tipo de investigación y diseño metodológico

El diseño metodológico de esta tesis es un estudio de investigación descriptiva, con corte transversal.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos de recolección de datos constan de planillas Excel en diferentes versiones, adaptadas a las tareas de laboratorio donde se registrarán los resultados. Por otro lado, se usará el programa estadístico Minitab.

Variables de estudio e indicadores

Para la realización de los análisis se utilizaron granos de soja provenientes de diferentes acopios de diferentes localidades de la República Argentina que abastecen a las plantas de producción. Para ello se tomó un conjunto de 104 muestras de las cosechas 2012 y 2013 divididas de la siguiente forma: soja de primera etapa de cosecha y soja de segunda etapa de cosecha. Cada una de estas dos etapas de cosechas tiene muestras provenientes de 7 provincias y de 26 localidades las cuales fueron analizadas para detectar de forma cuantitativa la incidencia de Aflatoxina, Zearalenona, Deoxivalenol, Fumonisina, Ocratoxina y Toxina T-2.

Para ello se acondicionaran las muestras recibidas de los diferentes destinos para luego ser analizadas. Todas las muestras fueron analizadas por el Método Elisa.

El sistema de análisis con base inmunoenzimática o mejor conocido como ELISA, es uno de los métodos rápidos más utilizados para la detección de Mico toxinas en laboratorios industriales. El formato más frecuente es el de ELISA en pocillos, que es el que se utilizó. Esta técnica se vale de anticuerpos, preferiblemente de origen monoclonal, y antígenos marcados con una enzima, la enzima que más usada es la peróxidasa de rábano o HSP. Se produce una reacción que se visualiza en forma colorimétrica, y se obtiene un valor cuantitativo con una curva de calibración confeccionada con patrones de concentración conocida.

Muestreo

Deben molerse aproximadamente entre 500 y 1000 gr de muestra en las condiciones que fueron extraídas de los silos. De esa molienda se utilizara los gramos necesarios para la extracción para cada Micotoxina.

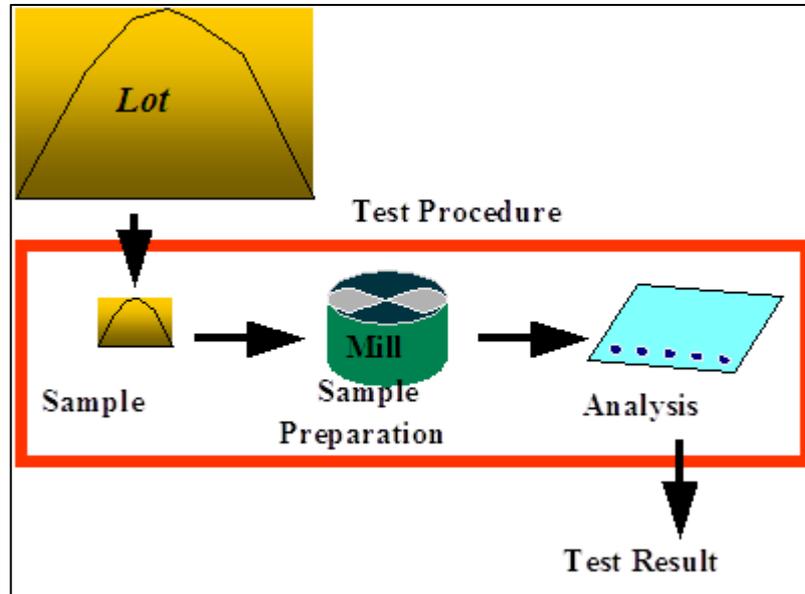
Se toman varias muestras pequeñas de un lote y de arma una mayor "muestra agregada".

Se muele la "muestra agregada", mediante un sub-muestreo representativo, se obtiene "muestra analítica", de donde se realizará la extracción.

La molienda se realiza con molino de cuchillas, el 75% debe pasar una mesh 20. La muestra se debe mezclar cuidadosamente.

Es muy importante que la muestra sea representativa y que se realice de forma correcta ya que las Micotoxinas no se distribuyen uniformemente. La correcta extracción de muestra constituye el 80% del éxito del análisis.

Imagen Nº 10: Procedimiento para Cuarteo de muestra



Fuente: Laboratorio Romer, 2007

Método

El kit contiene los siguientes componentes:

- ✓ 5-6 Standards.
- ✓ Placa con 96 pocillos con el anticuerpo.
- ✓ Dilución.
- ✓ Conjugado.
- ✓ Sustrato.
- ✓ Solución final.

El método de Elisa como ya mencionamos, es un método directo competitivo enzima-enlazado con el inmunoabsorbente. Las Micotoxinas se extraen de la muestra por medio del uso de un solvente específico.

La muestra extraída y conjugado enzima-mico toxina se mezclan y se agregan al pocillo que contiene el anticuerpo cubierto.

La Micotoxina presente en la muestra y los standards compiten con conjugado enzima-mico toxina por el anticuerpo vinculado.

Luego del lavado el sustrato enzima se agrega y se torna color azul. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de la Micotoxina en la muestra o Standard.

Se añade una solución final (fijadora) que hace que cambie de azul a amarillo.

El contenido, que reacciona dentro del pocillo es medido ópticamente con un lector de espectrofotometría, esto se compara con el Standard y se cuantifica la Micotoxina en la muestra.

Procedimiento

a) Preparación de la muestra

- ✓ Tomar una muestra representativa aproximadamente 500 gr y molerla hasta que el 80% pase a través del tamiz 20-mesh. Mezclar muy bien la sub muestra obtenida.
- ✓ Pesar la muestra en vaso de precipitado. Agregar la solución de extracción. Agitar. Dejar decantar y centrifugar el sobrenadante.
- ✓ Filtrar a través de un filtro de papel whatman #1.
- ✓ Realizar la dilución del extracto si es necesario.

Tabla N° VIII: Preparación de las muestras.

Micotoxina	Peso de la muestra	Solución de extracción	Tiempo agitación	Solución de dilución
Zearalenona	20 gr	100 ml metanol 70%	3 min	Metanol 70% Relación 1:5
Fumonisina	5 gr	25 ml metanol 70%	3 min	Metanol 70% relación 1:14
Deoxinivalenol	5 gr	100 ml agua destilada	3 min	No necesita dilución
Aflatoxina	5 gr	25 ml metanol 70%	3 min	Agua Destilada relación 1:1
Toxina T-2	5 gr	25 ml metanol 70%	3 min	Agua Destilada relación 1:1
Ocratoxina	5 gr	12.5 ml metanol 70%	3 min	Agua Destilada relación 1:1

Fuente: Laboratorio Romer, 2007

- ✓ Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C)
- ✓ Colocar el número suficiente de pocillos para las muestras patrón y para las muestras a ser analizadas.
- ✓ Agregar cantidad necesaria de cada estándar y muestra a cada pocillo.
- ✓ Colocar la cantidad especificada de conjugado a cada pocillo.
- ✓ Agregar cantidad necesaria de anticuerpo. Mezclar e incubar.
- ✓ Vaciar los pocillo con pipeta multicanal y golpe luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco del portapocillos sobre papel absorbente limpio para asegura la eliminación completa de restos de líquidos.
- ✓ Lavar los pocillos y vaciar nuevamente los pocillos de la forma antes indicada. Repita este paso dos veces más.
- ✓ Agregar el sustrato/cromógeno a cada pocillo, mezclar suavemente e incubar 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

- ✓ Agregar la solución stop a cada pocillo. Mezclar el contenido de la micro placa suavemente y mida la absorbancia a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.
- ✓ La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de Mico toxina.

Tabla N° IX: Volúmenes y tiempo de incubación para la realización del análisis.

Mico toxina	ul estándar y muestra	ul Conjugado	ul anticuerpo	Tiempo Incubación	Solución Lavado	ul sustrato o cromógeno	Tiempo de Incubación	ul de Stop
Fumonisina	50 ul	50 ul	50 ul	10 min	Agua destilada	100 ul	5 min	100 ul
Deoxinivalenol	50 ul	50 ul	50 ul	10 min	Buffer	100 ul	3 min	100 ul
Aflatoxina	50 ul	50 ul	50 ul	10 min	Agua destilada	100 ul	5 min	100 ul
Toxina T-2	50 ul	50 ul	50 ul	10 min	Agua destilada	100 ul	5 min	100 ul
Ocratoxina	50 ul	50 ul	50 ul	10 min	Agua destilada	100 ul	5 min	100 ul
Zearalenona (*)	100 ul	200 ul	100 ul	10 min	Agua destilada	100 ul	10 min	100 ul

Fuente: Laboratorio Romer, 2007

(*) En el caso de la Zearalenona tiene un paso previo. El conjugado y los patrones o muestras se mezclan en pocillos de borde azul sin anticuerpo y de allí se transfieren 100 ul a los pocillos con anticuerpo.

b) Expresión de los resultados

Se elaborará un archivo donde se volcarán los resultados obtenidos los cuales serán analizados estadísticamente.

Tabla N° X: Rangos de cuantificación y límites de detección para las Micotoxinas.

Micotoxina	Rango de Cuantificación	Límite de detección
Zearalenona	25-1000 ppb	<25 ppb
Deoxinivalenol	222-6000 ppb	<222 ppb
Aflatoxina	1.7-45 ppb	<1.7 ppb
Fumonisina	222-6000 ppb	<222 ppb
Ocratoxina	20-1000 ppb	<5 ppb
Toxina T-2	50 -400 ppb	<50 ppb

Fuente: Laboratorio Romer, 2007

c) Eliminación de desechos

Solución de hipoclorito de sodio al 1%, dejar actuar por 10 minutos y luego agregar solución al 5% de acetona.

Luego enjuagar.

RESULTADOS

Análisis de datos

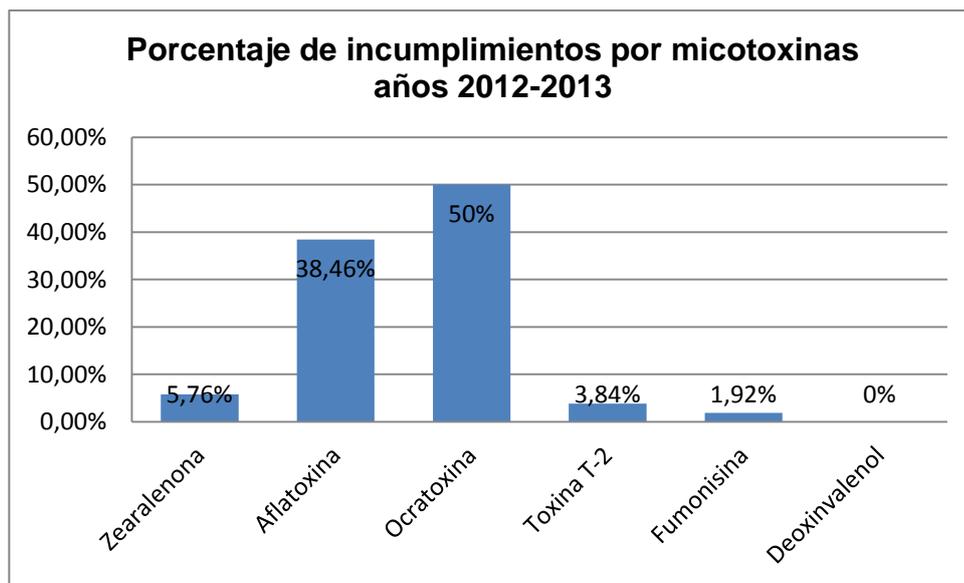
De las 104 muestras de granos de soja de las cosechas de los años 2012 y 2013 estudiadas en el presente trabajo de investigación, en el 50% (52/104) se encontraron valores que excede los límites exigidos en la Unión Europea al menos en una Micotoxina, en donde el 5,76% (3/52) corresponden a Zearalenona, el 38,46% (20/52) a Aflatoxina, el 50% (26/52) a Ocratoxina, el 3,84% (2/52) a Toxina T2 y el 1,92% (1/52) a Fumonisina, no encontrando valores para Deoxinivalenol (Gráfico N° 1).

En el año 2012, de las 52 muestras analizadas, el 51,92% (27/52) presentaron al menos un valor excediendo el límite, de los cuales el 11,11% (3/27) correspondieron a Zearalenona, el 22,22% (6/27) a Aflatoxina, el 51,85% (14/27) a Ocratoxina, el 10% (2/20) a Toxina T2. Fumonisina con el 5% (1/20). No se detectó ningún valor fuera de especificación para Deoxinivalenol (Gráfico N° 2). Durante este año encontramos que el 11,11% (3/27) de las muestras con Zearalenona el 66,66% (2/3) se detectaron en la primera y el 33,33% (1/3) en la segunda. En el caso de Aflatoxina se detectó en el 22,22% (6/27) de las muestras, donde el 66,67% (4/6) se presentaron en la primer cosecha y el 33,33% (2/6) en la segunda. Se encontró Ocratoxina en el 55,55% (15/27) de las muestras correspondiendo el 53,33% (8/15) a la primera cosecha y el 46,67% (7/15) a la segunda. También encontramos el 7,4% (2/27) de Toxina T2 de las cuales el 100% de las no conformidades se dieron en la primera cosecha. Por último se detectó Fumonisina en el 3,7% (1/27) de las cuales el 100% provenían de muestras de la primera cosecha.

En el año 2013 encontramos que el 48,08% (25/52) de las muestras excedieron el límite exigido por la Unión Europea al menos en una Micotoxina, donde en el 56% (14/25) correspondió a Aflatoxina y el 44% (11/25) a Ocratoxina, no detectándose el resto de las Mico toxinas (Gráfico N° 3).

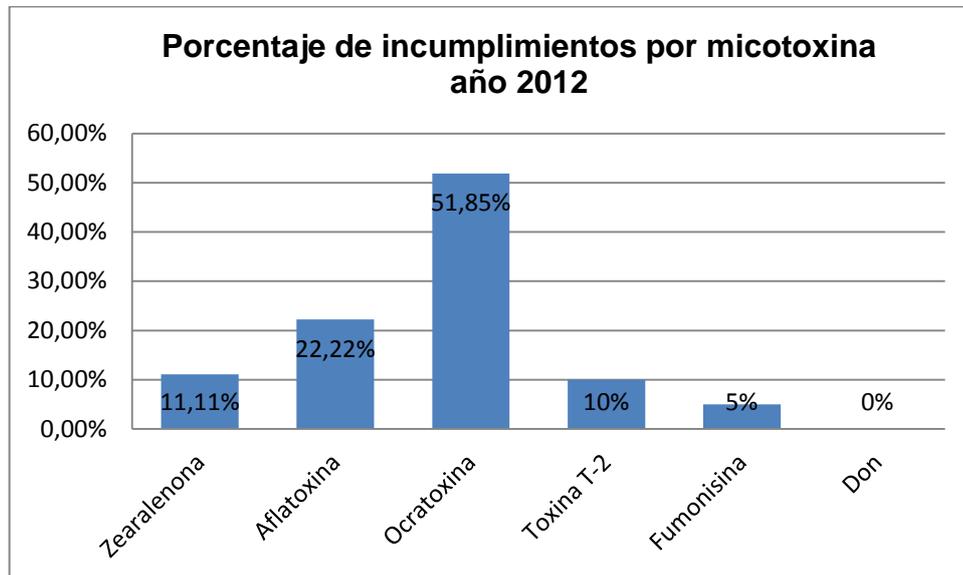
Para Aflatoxina, en la primera cosecha, encontramos el 57,14% (8/14) de muestras afectadas, y en la segunda el 50% (7/14), no detectándose valores fuera de especificación para el resto de las Mico toxinas.

Gráfico N° 1: Porcentaje de incumplimientos por Micotoxinas en los años 2012-2013



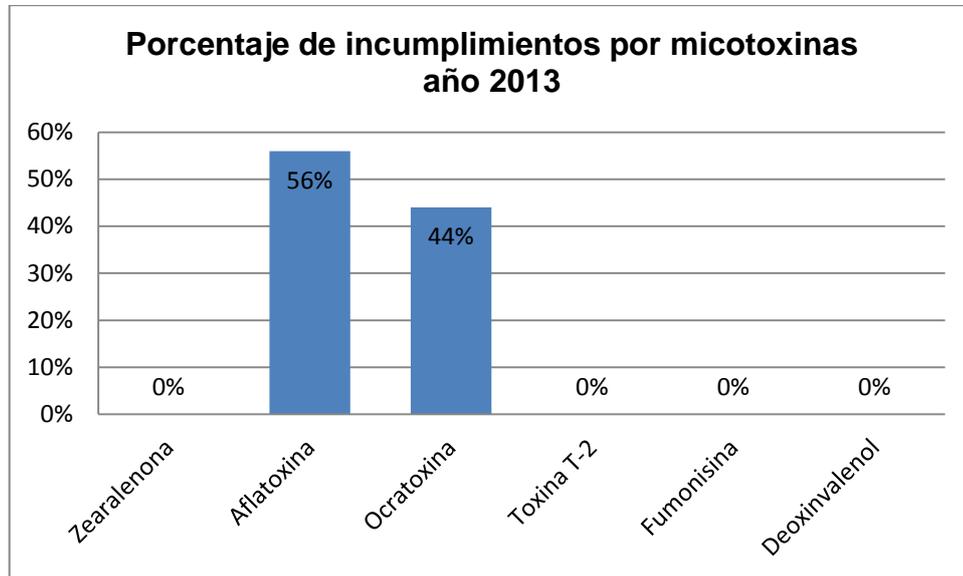
En este gráfico podemos observar que la mayor incidencia en ambas cosechas fue de Aflatoxinas y Ocratoxinas, siendo el Deoxinivalenol de incidencia nula en ambos años.

Gráfico N° 2: Porcentaje de incumplimientos por Micotoxina en el año 2012



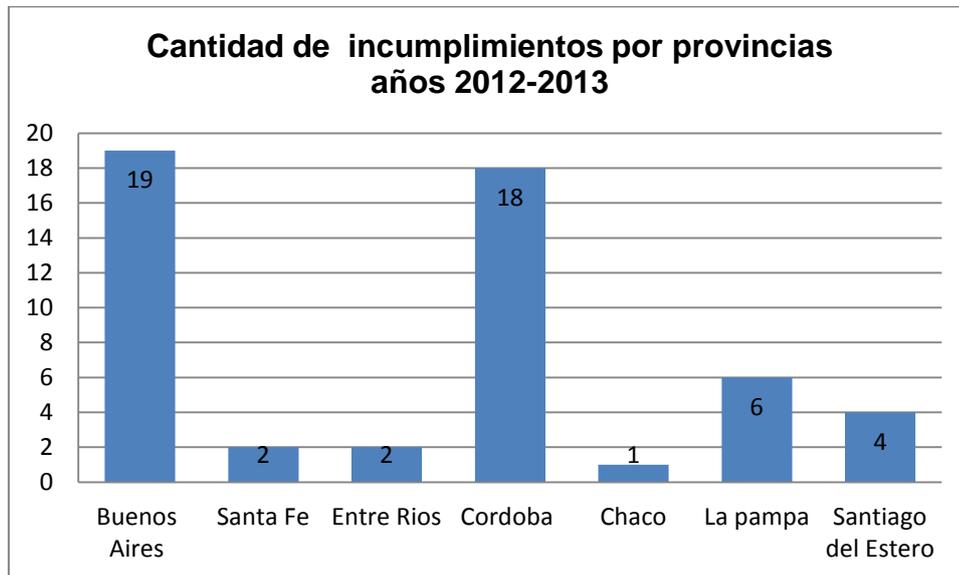
Durante la cosecha del año 2012 se puede observar que la Ocratoxina fue la Micotoxina que mayor contaminación produjo en las muestras analizadas. Del resto se detectaron porcentajes bajos de contaminación, siendo Deoxinivalenol la que no tuvo incidencia en ninguna de las muestras.

Gráfico N° 3: Porcentaje de incumplimientos por Micotoxina en el año 2013



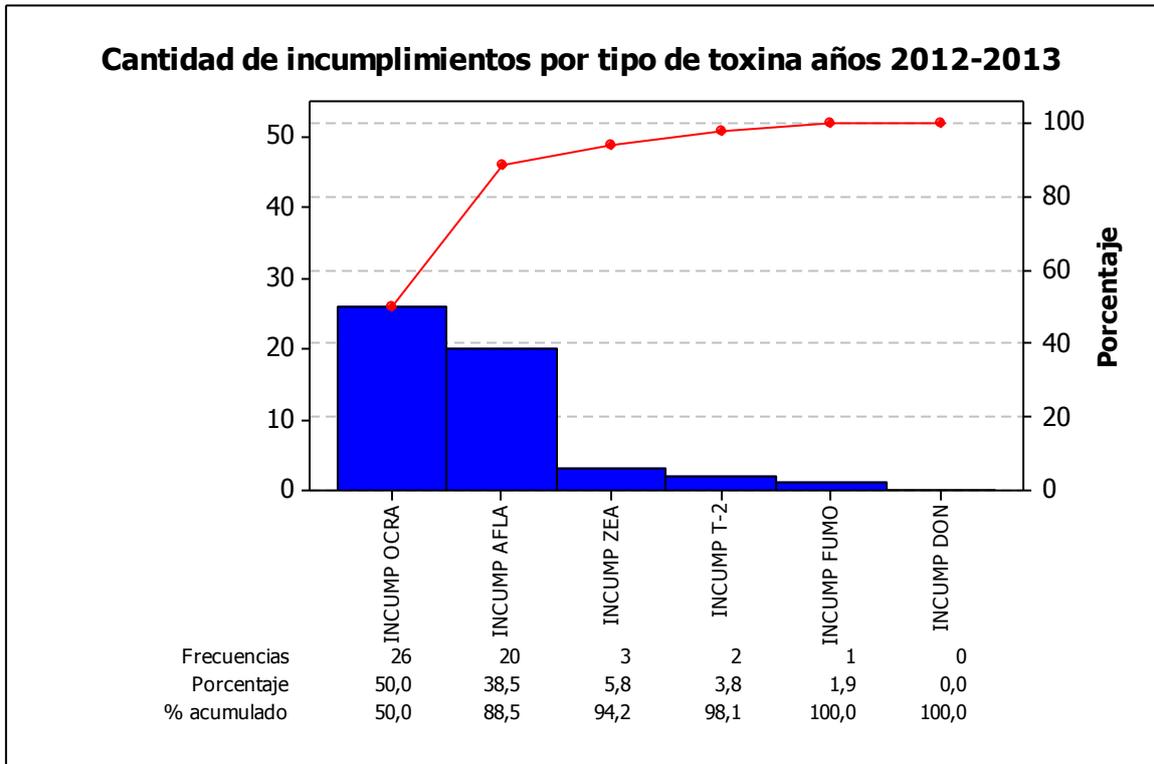
En el gráfico del año 2013 se observa una incidencia mayor en las muestras analizadas por Aflatoxinas y Ocratoxinas con porcentajes cercanos. Del resto de las Micotoxinas analizadas no se detectó ningún caso de contaminación.

Gráfico N° 4: Incumplimientos vs Provincias



El gráfico muestra que la mayor cantidad de incumplimientos se dieron en las provincias de Buenos Aires y Córdoba que son las Provincias de donde provienen la mayor cantidad de muestras.

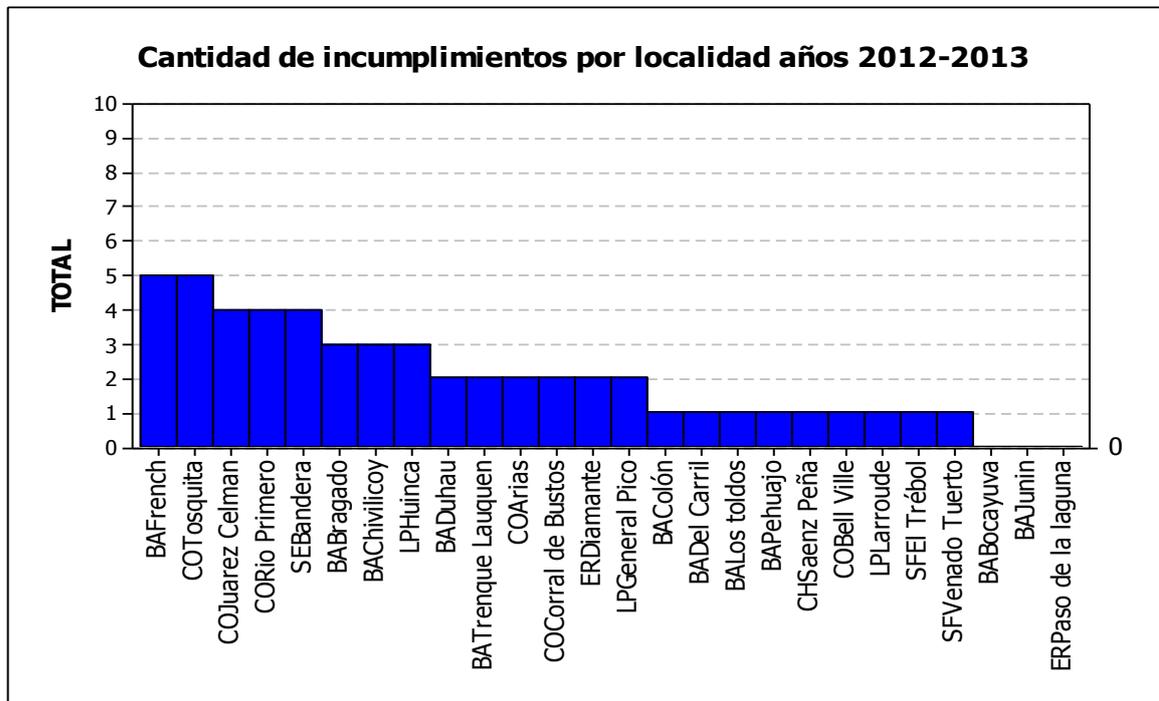
Gráfico Nº 5: Cantidad de Incumplimientos por Toxina en los años 2012-2013



El gráfico muestra la contaminación de las muestras analizadas con respecto a los límites internacionales exigidos.

En los 6 análisis realizados sobre cada una de las 104 muestras se observó 52 incumplimientos en el período 2012-2013 que da un total del 50% de muestras afectadas. Del total de incumplimientos el 88,5% corresponde a Aflatoxina y Ocratoxina.

Gráfico Nº 6: Cantidad de incumplimientos por localidades en años 2012-2013



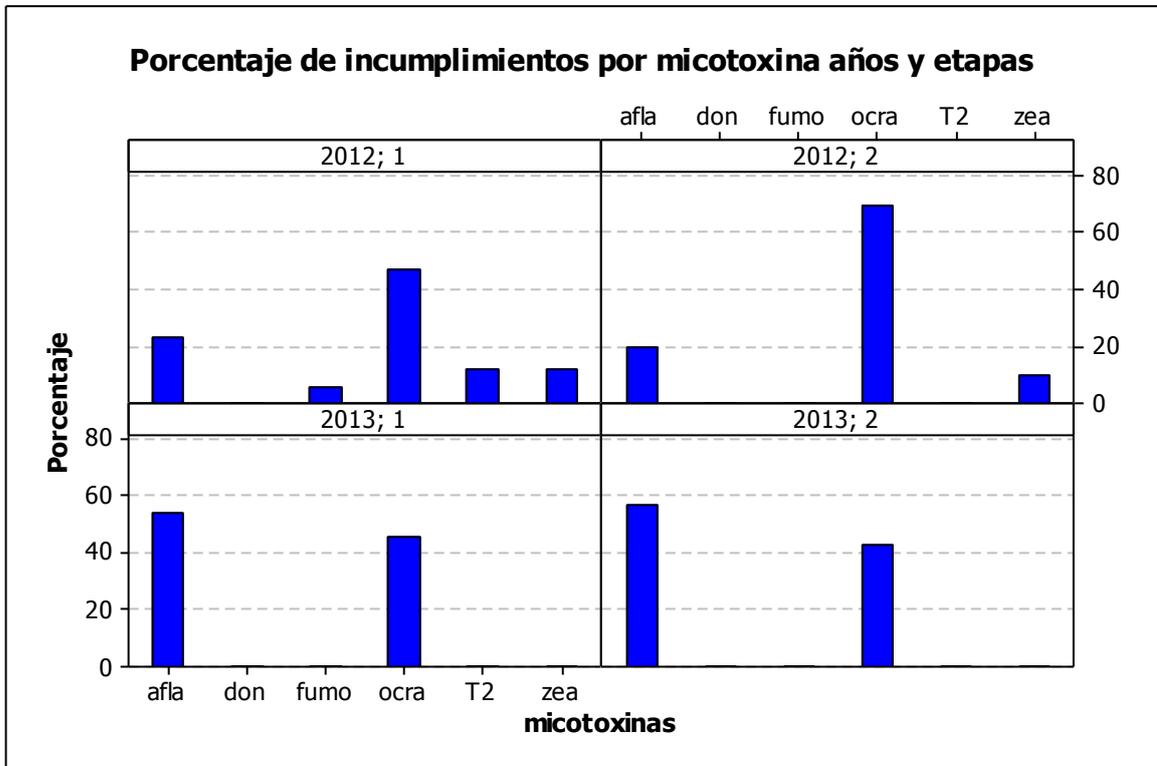
En el análisis de incidencia por localidad, el máximo observado es 5 Micotoxinas en una misma muestra, que se detectó en la Localidades de French (Buenos aires) y de Tosquitas (Córdoba).

Sólo en 3 localidades no se registran incumplimientos, Bocayuba (Buenos Aires), Junín (Buenos Aires) y Paso de la Laguna (Entre Ríos).

Podemos ver que en 14 localidades se detectaron entre 2 y 5 Micotoxinas a la vez.

En las 9 localidades restantes solo se desarrolló una Micotoxina.

Gráfico N° 7: Porcentaje de incumplimientos por etapas

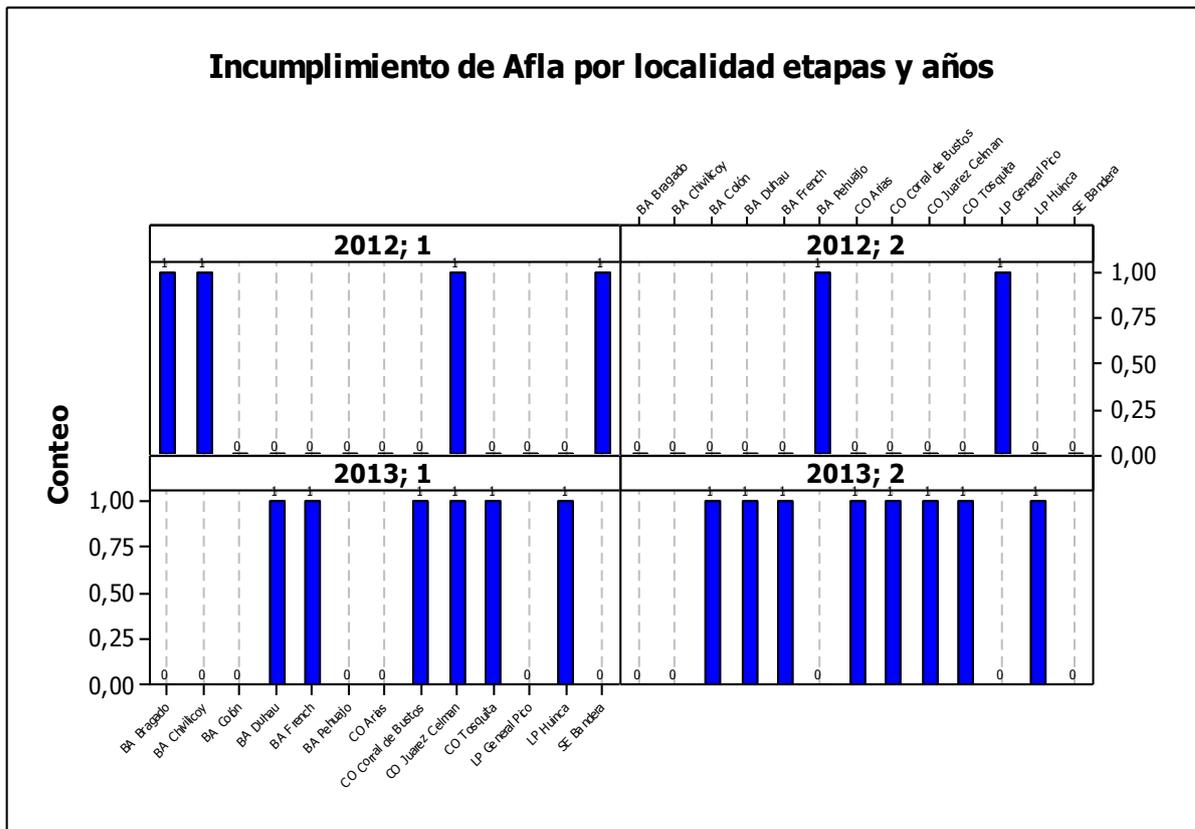


Aquí se refleja que en la primera etapa del año 2012 se detectaron 5 Micotoxinas, siendo la de mayor incidencia la Ocratoxina.

En la segunda etapa de ese mismo año solo fueron detectadas 3 Micotoxinas y se mantiene la Ocratoxina como la de mayor ocurrencia.

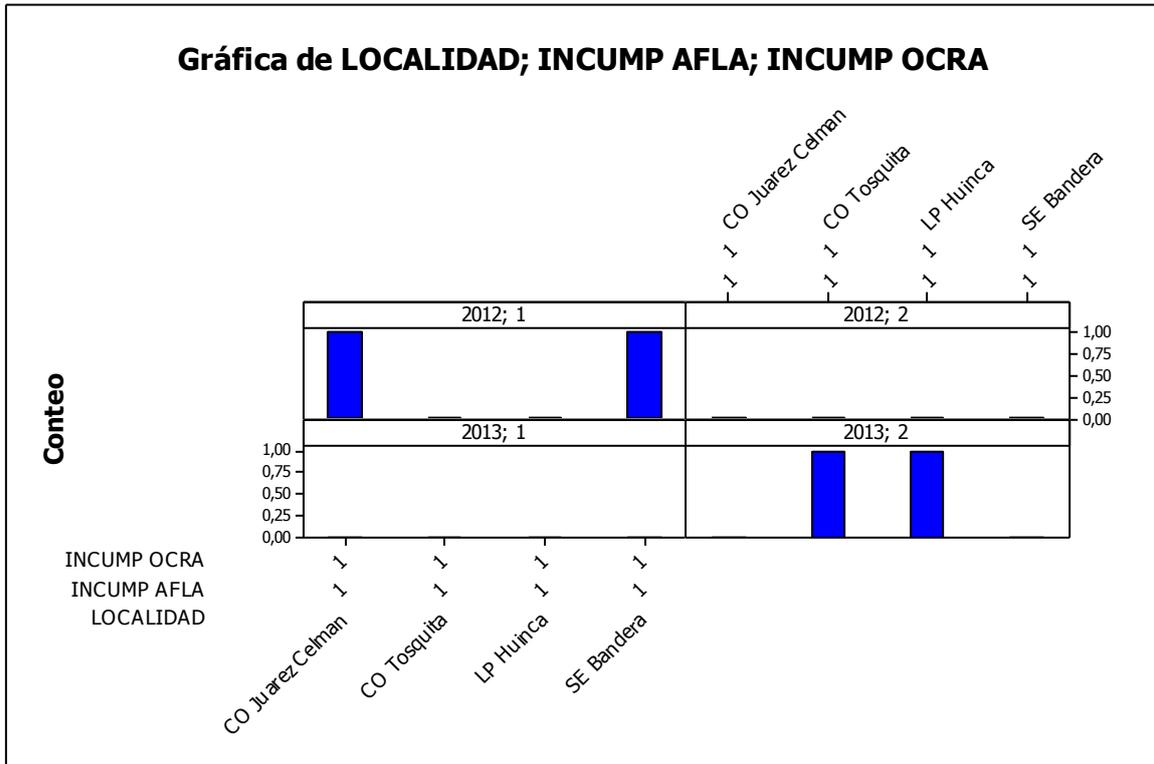
En cambio en el año 2013 ambas etapas fueron afectadas por Aflatoxina y Ocratoxinas mostrando valores similares.

Gráfico N° 8: Incumplimientos de Aflatoxinas por localidad, etapas y años



Comparando las etapas de ambos años donde hubo un mayor índice de contaminación por Aflatoxinas se observa que la segunda etapa del año 2013 es la que presenta mayores casos de contaminación.

Gráfico Nº 10: Incumplimientos por localidades de Aflatoxina y Ocratoxina



En esta gráfica se puede ver que las localidades más afectadas por las Micotoxinas que tuvieron mayores porcentajes de detección; Aflatoxinas y Ocratoxinas; fueron Juárez Celman (Córdoba) y Bandera (Santiago del Estero) durante la primer etapa del año 2012 con dos incumplimientos en cada una de las Micotoxinas.

Lo mismo ocurrió en la segunda etapa del año 2013 pero en las localidades de Tosquitas (Córdoba) y Huinca (La pampa).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo mediante el método ELISA que presentaron valores fuera de especificación fueron enviados a laboratorios certificados para ser analizados con otros métodos, para luego contrastar resultados. Esto nos da información sobre la disparidad o no que puede existir entre los diferentes métodos que se utilizan para la detección de Micotoxinas.

Los resultados obtenidos por los laboratorios certificados en las muestras obtenidas en el año 2012 fueron las siguientes:

Gráfico N° 11: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Zearalenona- 2012

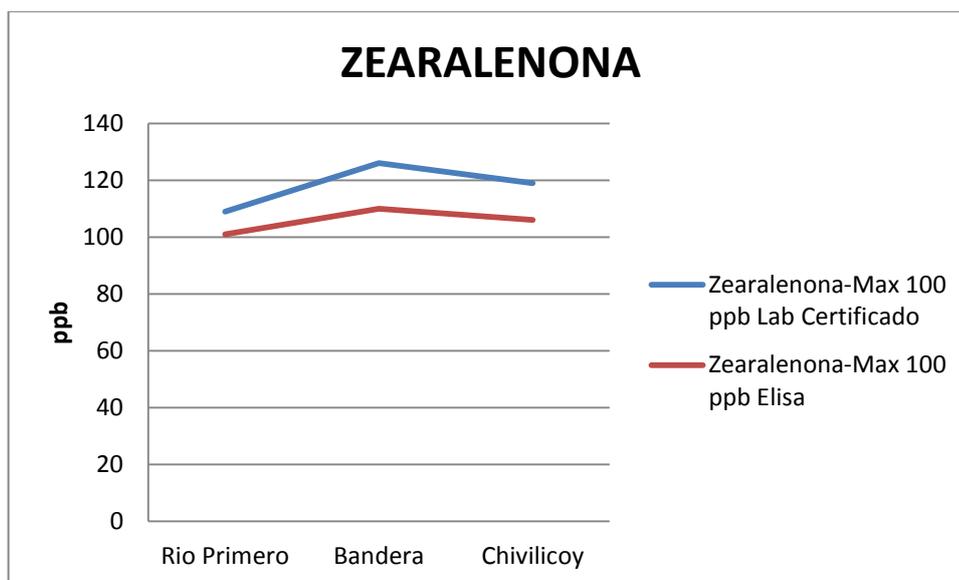


Gráfico N° 12: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA – Aflatoxina - 2012

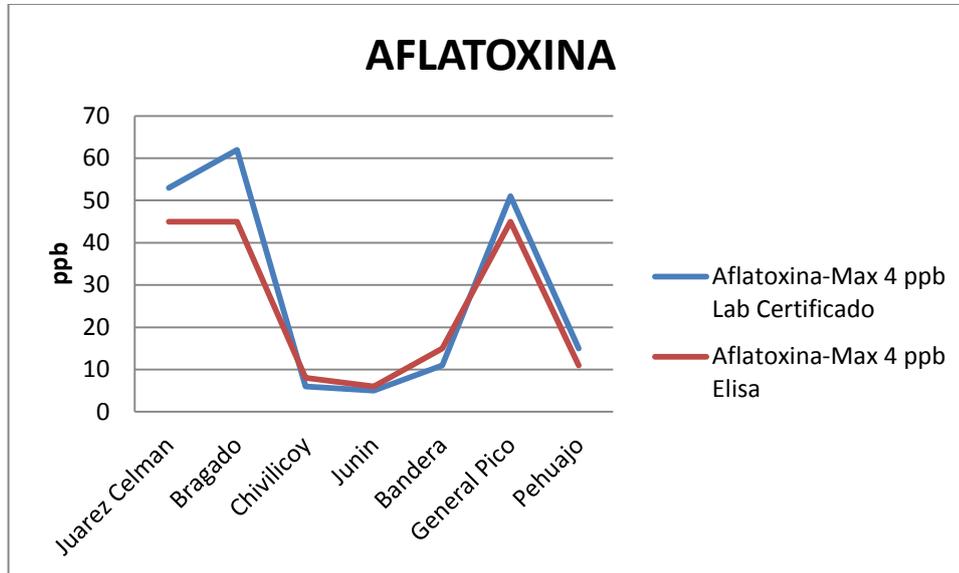


Gráfico N° 13: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Ocratoxina- 2012

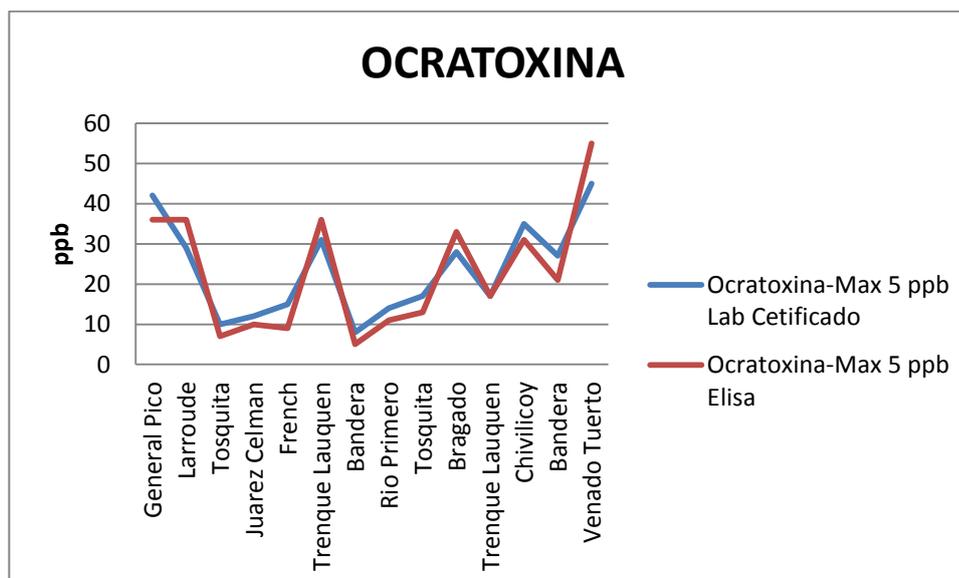


Gráfico N° 14: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Toxina-T2- 2012

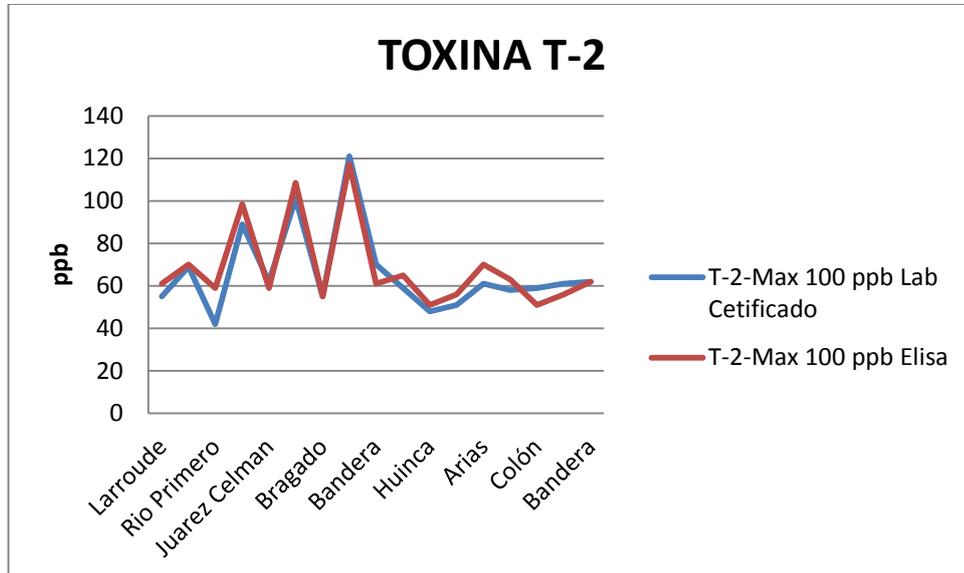
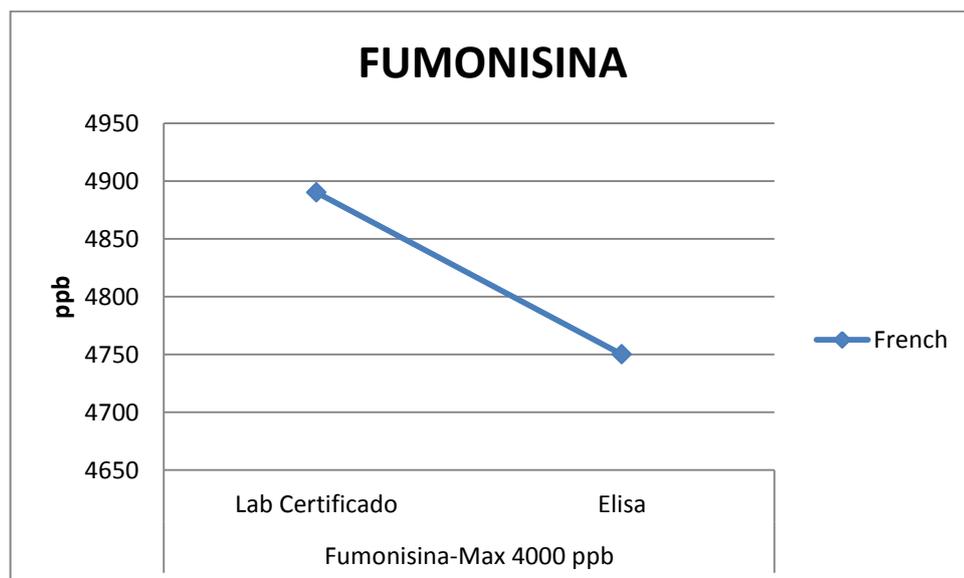


Gráfico N° 15: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Fumonisina - 2012



Las muestras correspondientes al año 2013 dieron los siguientes resultados:

Gráfico Nº 16 : Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA - Aflatoxina - 2013

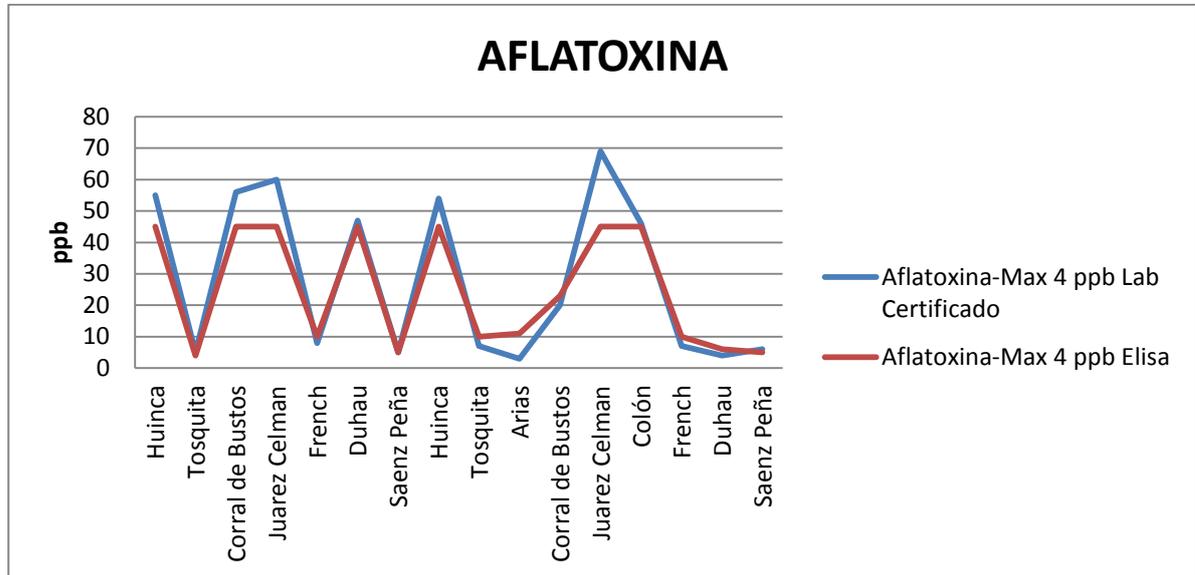


Gráfico Nº 17: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA – Ocratoxina - 2013

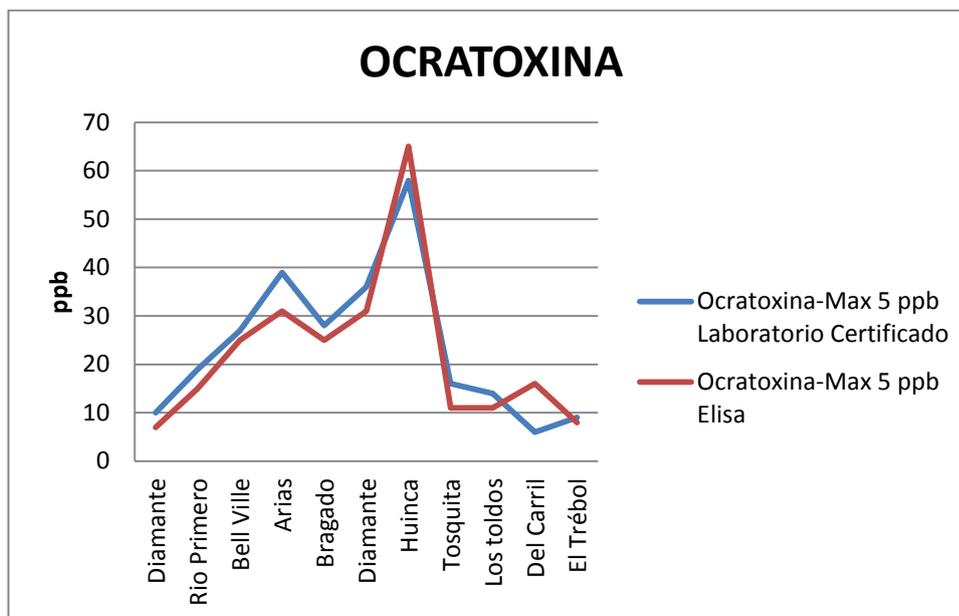
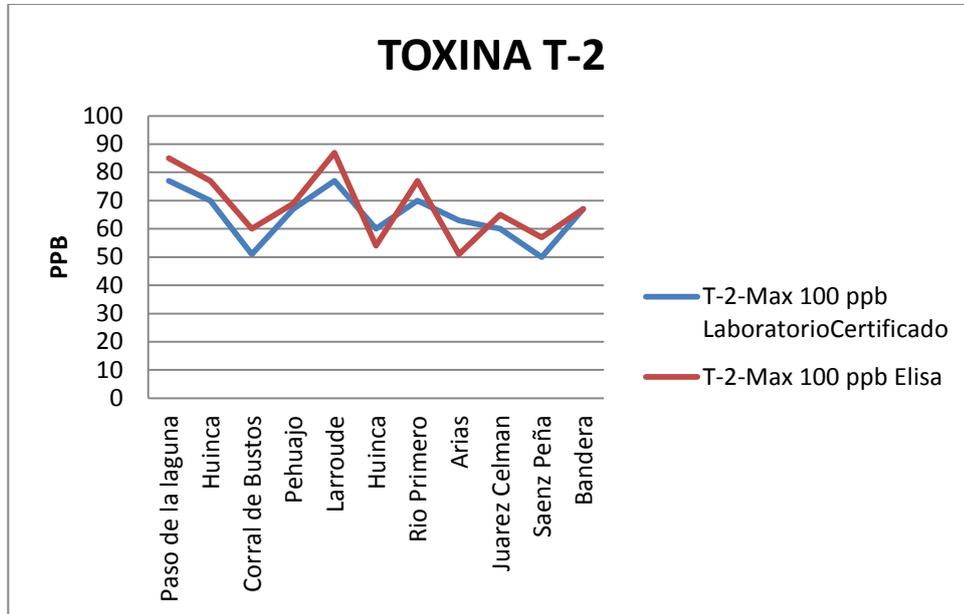


Gráfico N° 18: Comparación de Valores por laboratorios certificados vs. Método ELISA – Toxina - T2- 2013



En todos los gráficos anteriores se observa que los resultados obtenidos por método Elisa no presentan mayores discrepancias a los obtenidos por métodos más precisos (Validación) como lo son HPLC (Cromatografía líquida de Alta Resolución) y GC (Cromatografía Gaseosa).

DISCUSIÓN

Las Micotoxinas son responsables de la contaminación de materias primas como lo son los cereales, leguminosas, etc. lo que genera grandes pérdidas económicas. Además producen gran cantidad de efectos nocivos en los animales y humanos que pueden llegar a consumir diferentes alimentos contaminados con estas toxinas.

El objetivo de este trabajo es comparar los valores detectados en los granos de soja cultivados en algunas localidades de nuestro país en las cosechas 2012-2013, con los valores que exige la Unión Europea para la exportación, ya que estos presentan la legislación más exigentes a nivel de contaminación con Micotoxinas.

En nuestro trabajo, los análisis evidenciaron contaminación en un 50% de las muestras con Aflatoxina, Zearalenona, Ocratoxina, Fumonisina y T2, no así de DON, con valores que superaban los límites exigidos por la Unión Europea. En el estudio realizado por López (2008) se detectó que todas las muestras producidas en los departamentos del Sur de Santa Fe estaban contaminadas con Aflatoxinas, Zearalenona; T2 o DON, aunque la mayoría de las muestras presentaban niveles aceptados por los organismos de control.

López (2008) también plantea que el 80% de las muestras analizadas contenían dos o tres Micotoxinas juntas, lo que aumentaría el riesgo tóxico debido a fenómenos de sinergismo. Los resultados de nuestro trabajo evidencian que de 26 localidades estudiadas, en 14 de ellas se detectó al menos dos Micotoxinas diferentes en la misma muestra, siendo cinco tipos diferentes de Micotoxinas la cantidad máxima detectada en una misma muestra, con lo cual puede decirse que

es altamente probable que se manifieste el sinergismo en las muestras estudiadas.

En el estudio realizado por Gimeno (2001) éste afirma que la soja como sustrato resulta pobre para el desarrollo de Aflatoxinas; sin embargo al observar los datos obtenidos de nuestros análisis podemos decir que esta afirmación no se cumple, ya que dicha Micotoxina tuvo el 38,5% de incidencia en las muestras analizadas durante ambas cosechas.

Díaz (1995) en su trabajo afirma que los niveles de contaminación detectados en soja por Aflatoxinas en general son demasiado bajos (36 ppb) como para constituir una amenaza para la salud y/o producción animal. En nuestro estudio el 38,5% de las muestras superaban los límites requeridos por el reglamento de la Unión Europea, pero se trata de límites muy exigentes, 4ppb para Aflatoxina. Haciendo foco en los resultados se puede decir que los valores encontrados están muy por debajo de las 36 ppb que Díaz señala como poco preocupante.

En el mismo trabajo Díaz (1995) expresa que niveles de Ocratoxina de 500 ppb son potencialmente tóxicos para mayoría de especies susceptibles a esta Micotoxina. También en este caso las muestras analizadas, que superaron el límite de la Unión Europea (5ppb), se encuentran muy lejos de ese valor.

Una señal de alerta que aparece en nuestro estudio es que las Micotoxinas de mayor incidencia fueron Aflatoxinas y Ocratoxinas, ambas clasificadas por IARC como carcinogénicas.

Al igual que Pacin (2006) creemos que cada vez es más importante evaluar cuál es la exposición que tienen los animales y la población a dichas sustancias para poder poner en práctica cada vez más acciones preventivas.

Medina (2015) realizó un estudio comparando los métodos de análisis para Micotoxinas. Para ello comparó el método Elisa con cromatografía Gaseosa y HPLC y concluyó que no se ha llegado a un perfeccionamiento del sistema. Nosotros podemos observar en los gráficos de comparación de resultados por Método Elisa (Rápido) y HPLC Y GC (Validación) que los valores obtenidos no son tan dispares entre sí, por lo que la afirmación de Díaz no se evidencia en nuestra investigación.

Los resultados del último estudio realizado por Kovalsky para Biomin en 2013, indican que Don aún es la Micotoxina más frecuente a nivel mundial, lo que no queda reflejado en nuestro trabajo ya que los resultados obtenidos muestran que ésta fue la única Micotoxina de la cual no se obtuvieron valores que sobrepasaran los límites exigidos por la Unión Europea.

CONCLUSIONES

1. De nuestro trabajo se desprende que el 50% de las muestras analizadas de granos de soja de las cosechas 2012-2013 muestran niveles de contaminación por Micotoxinas mayores a los exigidos en la Unión Europea.
2. Debido a los resultados obtenidos en las muestras analizadas parecería que la soja NO es un sustrato pobre para el desarrollo de Aflatoxinas.
3. La mayor frecuencia de aparición de Micotoxinas se dieron en la cosecha del año 2012.
4. Las muestras de granos de soja analizadas fueron afectadas en un 88,5% por Ocratoxinas y Aflatoxinas en las cosechas 2012-2013.
5. El método Elisa no tiene grandes discrepancias con los resultados obtenidos por HPLC y GC.
6. Las muestras provenientes de localidades de las provincias de Buenos Aires y Córdoba durante ambas cosechas fueron las más afectadas por la contaminación de Micotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Antón, Almudena; Lizas, Jesús. 2001. *Hongos y Micotoxinas*. Fundación Ibérica para la seguridad Alimentaria, Madrid.
2. Arellano Lara, Javier. 2003. *Métodos de determinación, identificación y control de Micotoxinas en ingredientes para la nutrición animal*.
3. Bennett J.W; Klich, M. *Micotoxins*. Sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC164220/>. Consultado última vez 30 de noviembre.
4. Bello Gutiérrez, J.2000. *Ciencia Bromatológica: principios generales de los alimentos*. Pág.: 494. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. España.
5. Bullerman LB, Bianchini A. 2007. *Stability of mycotoxins during food processing*. Int. J. Food Microbiol. 119: 140–146.
6. Castelo MM, Sumner SS, Bullerman LB.1998. *Occurrence of Fumonisin in corn-based food products*. J. Food Protection, 61: 704-707.
7. CAST.Council for Agricultural Science and Technology.2003. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems*. Ames, Iowa, USA. Pag.
8. Díaz, Gonzalo J., DVM, MSc.1995. *Seminario - Taller control de calidad y usos de la soja integral en alimentación animal - Mico toxinas presentes en la soja y subproductos*. Cali. Colombia.
9. Gimeno, Alberto. 2001. *Revisión genérica del problema de los hongos y Micotoxinas en alimentación animal*. ALBEITAR. Nº 45, 46, 47.
10. Gimeno, Alberto; Martins, María Ligia. 2001. *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos*. Publicación de Special Nutrients, Inc.

11. Horwitz, W. 1982. "Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs". *Analytical Chemistry* 54, 67A.
12. International Journal of Molecular Sciences. 2008. ISSN 1422-0067. *Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals*.
13. Krogh P. 1987. Ochratoxins in food. In: Krogh P, editor. *Mycotoxins in food*. London: Academic Press, pp. 97–121.
14. López, Clara Eder; Bulacio, LC; Ramos, LL S.S. Ramadán, R. D'Esposito. *Estudio comparativo de la presencia de Micotoxinas en soja almacenada tradicionalmente y en silos bolsas*. Ceremic (Centro de referencia de Micología). Merco soja 2011. Quinto congreso de la soja del Mercosur. Primer foro de la soja Asia – Mercosur.
15. López, Clara Eder. 2011. Curso de actualización en Micotoxinas "Hongos en alimentos-Mico toxinas". CEREMIC (Centro de Referencia de Micología).
16. López, Clara Eder. 2008. "Micotoxinas y Micotoxicosis". Dirección web <http://www.reflexionespys.org.ar/web/ediciones-anteriores/archivo/mayo-junio-2008/46-ciencia.html>. Consultada: 17 de noviembre de 2015.
17. Mallman, Carlos; Hummes Rauber, Ricardo; Giacomini, Leandro. *Factores de formación de las Micotoxinas y sus formas de control*.- Sitio Web <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/principales-factores-condicionantes-desarrollo-t342/p0.htm>. Consultado 17 de noviembre de 2015.
18. Manal M. Zaki, S. A. El-Midany, H. M. Shaheen, Laura Rizzi. January, 2012 *Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management*. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* Vol. 4(1), pp. 13-28.
19. Marasas, WFO. 1997. *Risk assessment of fumonisins produced by Fusarium moniliforme in corn*. *Cereal Res. Commun.*, 25: 399–406.

20. Medina B, Juan Carlos; Castillo, Eliezer. 2015. *Control de Calidad de insumos y dietas Acuícolas, determinación por medio de ensayos inmunoquímicos*. FAO.
21. Muzaffer Denli; Pérez José Francisco. 2006. *Contaminación por Micotoxinas en los piensos: efectos, tratamientos y prevención*. XXII Curso de especialización FEDNA. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Barcelona. España.
22. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2003. Manual sobre aplicación del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control *Capítulo 1: Introducción a las Micotoxinas. ¿Qué son las Micotoxinas?*
23. Pacin, Ana. 2006 - *¿Existe un diagnóstico sobre Mico toxinas en soja en Argentina?* Fundación de investigaciones científicas teresa benedicta de la cruz - Comisión de investigación científicas de la Provincia de Buenos Aires -Centro de investigación en Micotoxinas Universidad Nacional de Luján.
24. Rey, A; Silvestre, A. 2005. *Comer sin riesgos 2. Las enfermedades transmitidas por alimentos*. Edición editorial hemisferio sur. Buenos Aires. Argentina.
25. Scott PM, Lawrence GA. 1995. *Mycotoxin methodology Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control. Exposure & Risk Assessment*. 12(3): 395-403.
26. Soriano del Castillo, José Miguel. 2007. *Micotoxinas en Alimentos*. Editorial Díaz de Santos
27. Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. 1965. *Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh*. Nat., 205: 1112–1113.
28. Venturino, Jorge; Álvarez, Pablo. 2007. *Micotoxinas y Silos bolsa*. Biofarma SA - Argentina.

29. Wood GE. 1992. *Mycotoxins in foods and feeds in the United States*. J. Anim. Sci., 70: 3941–3949.

ANEXOS

Otras fuentes consultadas

- ❖ Revista "A&G", Aceites & Grasas. Publicación trimestral de Asaga (Asociación Argentina de Grasas y Aceites). Número 65, Año 2006.
- ❖ Flavio A. Lazzari, 1997. *"Humedad, Hongos y Micotoxinas en la calidad de Semillas, Granos y Raciones"*. Curitiba, Brasil, 2da. Edición.
- ❖ Entrevista a la Ingeniera en alimentos Ing. Virginia Gentili.
- ❖ Dr. Francisco Javier Cabañes, *"Micotoxinas emergentes. Introducción"*.
- ❖ Codex Alimentarius. Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales. 2007. Roma. Primera Edición.
- ❖ Código alimentario argentino. Dirección web: http://anmat.gov.ar/normativas_alimentos_caa_asp.
- ❖ Laboratorios romer. Dirección web: [http:// www.romerslabs.com](http://www.romerslabs.com).
- ❖ Capacitación dictada por la Bioquímica Patricia, Knas; representante de los Laboratorios Romer

Cuadro de resultados

Provincia	Localidad	Zea- Max 100 ppb		Aflatoxina- Max 4 ppb		Ocratoxina- Max 5 ppb		T-2- Max 100 ppb		Fumonisinina- max 4000 ppb		Doti- Max 1250 ppb	
		2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Entre Rios	Paso de la laguna	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Diamante 1	<25	<25	<1,70	<1,70	7	<5	<50	<50	<222	<222	289	690
La pampa	General Pico 1	<25	<25	<1,70	<1,70	36	<5	<50	<50	<222	<222	280	<222
	Larroque 1	<25	<25	<1,70	<1,70	36	<5	61	<50	296	<222	<222	<222
Cordoba	Huinca	<25	<25	>45	>45	<5	<5	70	77	<222	<222	<222	<222
	Rio Primero 3	101	<25	<1,70	<1,70	7	15	59	<50	<222	<222	500	<222
	Bell Ville	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	25	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Tosquita 2	<25	87	<1,70	4.31	10	<5	98.4	<50	<222	<222	<222	<222
	Arias 1	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	31	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Corral de Bustos 1	<25	<25	<1,70	>45	<5	<5	<50	60	<222	<222	<222	<222
	Juarez Celman 3	26	<25	>45	>45	9	<5	59	<50	<222	<222	<222	<222
	Colón	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	301	<222
	French 4	<25	<25	<1,70	10.5	36	<5	108.6	<50	4750	<222	<222	<222
	Bocayuva	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	278
Buenos Aires	Los toldos	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Bragado 2	32	<25	>45	<1,70	5	25	55	<50	<222	<222	313	<222
	Trenque Lauquen 1	<25	<25	<1,70	<1,70	11	<5	<50	<50	<222	<222	<222	299
	Duhau 1	<25	<25	<1,70	>45	<5	<5	<50	<50	<222	<222	1569	<222
	Pehuajo	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	69	<222	<222	630	<222
	Chivilcoy 1	46	<25	8	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Del Carril 1	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	5000	<222	<222	231
	Junin	<25	<25	3	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Saenz Peña 1	<25	<25	<1,70	2.6	<5	<5	117.2	<50	418.7	<222	<222	<222
	Chaco	Saenz Peña 1	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222
Santiago del Estero	Bandera 3	110	47	<1,70	<1,70	13	<5	61	<50	<222	<222	292	269
	El Trébol	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
Santa Fe	Venado Tuerto	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Venado Tuerto	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
Entre Rios	Paso de la laguna	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Diamante 1	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	31	<50	<50	271	<222	<222	<222
La pampa	General Pico 1	<25	<25	>45	>45	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Larroque	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	65	87	<222	239	<222	<222
La pampa	Huinca 2	<25	<25	<1,70	>45	<5	65	51	54	256	<222	<222	<222
	Rio Primero 1	58	<25	<1,70	<1,70	33	<5	56	77	<222	<222	<222	<222
Cordoba	Bell Ville	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	266	<222	<222	<222
	Tosquita 3	29	<25	<1,70	10	17	11	<50	<50	<222	<222	478	<222
Cordoba	Arias 1	<25	<25	<1,70	11	<5	<5	70	51	<222	<222	<222	<222
	Corral de Bustos 1	42	<25	<1,70	23	<5	<5	<50	<50	589	<222	<222	<222
Buenos Aires	Juarez Celman 1	<25	<25	<1,70	>45	<5	<5	63	65	236	<222	<222	<222
	Colón 1	<25	<25	<1,70	>45	<5	<5	51	<50	<222	<222	<222	<222
Buenos Aires	French 1	<25	<25	<1,70	10.5	<5	<5	<50	<50	<222	<222	1012	<222
	Bocayuva	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	444	<222
Buenos Aires	Los toldos 1	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	16	<50	<50	<222	<222	<222	231
	Bragado 1	<25	89	<1,70	<1,70	31	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
Buenos Aires	Trenque Lauquen 1	<25	<25	<1,70	<1,70	21	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Duhau 1	<25	<25	<1,70	6	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
Buenos Aires	Pehuajo 1	<25	<25	11	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Chivilcoy 2	106	<25	<1,70	<1,70	35	<5	<50	<50	<222	<222	317	<222
Buenos Aires	Del Carril 1	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	8	<50	<50	<222	<222	<222	<222
	Junin	<25	<25	<1,70	<1,70	<5	<5	<50	<50	<222	<222	<222	309
Chaco	Saenz Peña	<25	<25	<1,70	3.6	<5	<5	56	57	<222	<222	<222	370
	Bandera 1	<25	<25	<1,70	<1,70	45	<5	62	67	397	<222	896	<222
Santiago del Estero	El Trébol 1	36	<25	<1,70	<1,70	<5	7	<50	<50	<222	<222	<222	358
	Venado Tuerto 1	<25	<25	<1,70	<1,70	61	<5	<50	<50	<222	<222	<222	<222