

Chaves, Carolina Soledad

Evaluación de la presencia de diferentes microtoxinas en productos seleccionados a base de cereales

Facultad/Área: Facultad de Tecnologías e Innovación para el Desarrollo. Lic. en Industria Alimentaria

Año: 2022

Licencia:  <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> (CC BY NC SA 4.0)

Cita recomendada: Chaves, C.S. *Evaluación de la presencia de diferentes microtoxinas en productos seleccionados a base de cereales*. Rafaela: Universidad Nacional de Rafaela, Facultad de Tecnologías e Innovación para el Desarrollo. RID UNRaf Repositorio Institucional Digital UNRaf



Universidad Nacional de Rafaela

Tesis presentada como requisito para obtener el grado de
Licenciada en Industrias Alimentarias

“Evaluación de la presencia de diferentes
micotoxinas en productos seleccionados a
base de cereales”

Tesista: Téc. Carolina Soledad Chaves

Directora de tesis: Dra. Dianela Costamagna

Codirectora de tesis: Lic. María Belén Adorni

Lugar de realización: INTA EEA Rafaela

Año 2022

CERTIFICACIÓN DE ACEPTACIÓN



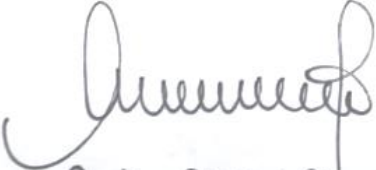
COSTAMAGNA
DIANELA

Dra. Daniela Costamagna
DIRECTORA DE TESINA



MARÍA BELÉN ADORNI

Lic. María Belén Adorni
CODIRECTORA DE TESINA



Carolina Soledad Chaves

Téc. Carolina Soledad Chaves
TESISTA

A mi hijo, Astor.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Dra. Dianela Costamagna y a mi co-directora, Lic. María Belén Adorni por su incondicional apoyo, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y brindarme su cálida dedicación, compromiso, predisposición y paciencia. Fue un privilegio trabajar con ustedes. Su colaboración ha sido indispensable para mi formación profesional.

A INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) Rafaela, por haber posibilitado la realización de esta tesis en sus instalaciones.

A los y las profesionales del Laboratorio de Forrajes de INTA Rafaela, por brindarme los medios necesarios para la ejecución de esta tesis y por su guía y colaboración en el trabajo de laboratorio.

A la Universidad Nacional de Rafaela, universidad pública, lugar de encuentro, conocimiento, aprendizaje y jerarquía, por brindarme la oportunidad de estudiar y formarme como profesional.

A mi directora de carrera Bq. Fabiana Gentinetta, por guiarme y aconsejarme, brindándome su apoyo desde el primer día.

A mi familia, en especial a mis padres, por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia se puede alcanzar lo que uno desea.

A mi compañero de vida Emanuel, por estar siempre a mi lado, tus palabras de aliento y amor en momentos complicados fueron esenciales.

A mi hijo Astor, mi sostén, que desde su primer año de vida me acompañó en este camino con su amor y alegría infinitos.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica.....	3
3.Objetivos.....	6
3.1. Objetivo general.....	6
3.2. Objetivos específicos.....	6
4. Materiales y métodos.....	7
4.1. Selección de muestras.....	7
4.2. Preparación de las muestras.....	7
4.2.1. Molienda.....	7
4.2.2. Extracción de micotoxinas.....	8
4.2.2.1. Deoxinivalenol (DON).....	8
4.2.2.2. Zearalenona (ZEA) y Aflatoxina total (AFT).....	10
4.2.2.3. Ocratoxina A (OTA).....	11
4.3. Análisis de micotoxinas.....	12
4.3.1. DON.....	12
4.3.2. ZEA.....	15
4.3.3. AFT.....	16

4.3.4. OTA.....	18
4.4. Análisis estadístico.....	19
5. Resultados y discusión.....	20
5.1. Prevalencia y concentración de micotoxinas en alimentos a base de cereales.....	20
5.2. Efecto del tipo de presentación de los alimentos sobre la presencia de micotoxinas....	24
5.3. Co-ocurrencia de micotoxinas en productos a base de cereales.....	24
5.4. Comparación de niveles detectados de micotoxinas con los límites establecidos internacionales para la comercialización de productos alimenticios a base de cereales.....	25
6. Conclusiones.....	28
7. Bibliografía.....	29
8. Anexos.....	38

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Valor medio, desvío estándar y rango de micotoxinas en productos alimenticios a base de cereales.....	20
Tabla 2: Número de muestras positivas, valores medios y prevalencia total de diferentes micotoxinas analizadas en alimentos a base de maíz, trigo y arroz.....	21
Tabla 3: Co-ocurrencia de micotoxinas en muestras de alimentos a base de cereales.....	25
Tabla 4: Porcentaje de muestras que superaron los niveles máximos de micotoxinas en productos para alimentación humana a base de cereales establecidos por la Unión Europea (UE).....	27
Anexo Tabla 1: Productos alimenticios y lugar de compra.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Molino Thomas Model 4 Wiley® Mill.....	8
Figura 2: Limpieza de molino.....	8
Figura 3: Pesaje de muestras.....	9
Figura 4: Adición de disolvente.....	9
Figura 5: Agitación.....	10
Figura 6: Filtrado.....	10
Figura 7: Extractos.....	11
Figura 8: Preparación de las muestras.....	13
Figura 9: Marco portapocillos.....	13
Figura 10: Agregado del conjugado a los pocillos.....	14
Figura 11: Lector automático de microplacas Multiskan EX Thermo Electrón.....	15

Declaro que el material incluido en esta TFLIA es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros) y que este material no lo he presentado en forma parcial en esta u otra institución.



Carolina Soledad Chaves

Téc. Carolina Soledad Chaves

TESISTA

ABREVIATURAS

A Absorbancia

AFB₁ Aflatoxina B₁

AFT Aflatoxina total

DE Desvío Estándar

DON Deoxinivalenol

ECO Extractor concentrado de ocratoxina (Extractor Concentrate Ochratoxin)

ELISA Ensayo por InmunoAbsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

EEA Estación Experimental Agropecuaria

FB Fumonisina

HPLC Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)

IARC Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

LC Límite de Cuantificación

LC-MS Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)

LD Límite de Detección

M Media

OTA Ocratoxina A

PSB Solución Salina Tampón con Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

TFLIA Trabajo Final Licenciatura en Industrias Alimentarias

TLC Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)

UE Unión Europea

ZEA Zearalenona

Evaluación de la presencia de diferentes micotoxinas en productos seleccionados a base de cereales

Resumen

Los cereales y alimentos a base de cereales se consideran cruciales en la alimentación humana. A pesar de esto, pueden estar contaminados con micotoxinas que son metabolitos secundarios secretados por hongos que colonizan la planta durante su crecimiento o infectan los granos después de la cosecha. Las de mayor importancia en los cereales son deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), aflatoxinas totales (AFT) y ocratoxina A (OTA). Debido a que son resistentes a diferentes tratamientos aplicados durante el procesamiento (molienda, cocción y fermentación) de los granos de cereales y productos a base de ellos, los consumidores podrían estar expuestos a estas micotoxinas a través del consumo de los mismos. Esta situación representa un grave riesgo para la salud humana y considerables pérdidas económicas para el sector agroalimentario. El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de DON, ZEA, AFT y OTA en productos alimenticios a base de cereales (trigo, maíz y arroz) disponibles comercialmente en Rafaela, Santa Fe. Para ello, se seleccionaron 43 muestras de alimentos de venta masiva que se expenden en supermercados y dietéticas. La presencia de micotoxinas se determinó a través de metodología rápida (ELISA) utilizando kit de prueba RIDASCREEN®FAST (R-Biopharm, Alemania). El orden de prevalencia general en las muestras examinadas fue DON>AFT>OTA>ZEA. El orden de concentración de micotoxinas en productos a base de cereales fue DON>ZEA>AFT>OTA. Los productos a base de trigo fueron los que mayor cantidad de micotoxinas presentaron, siendo DON la de mayor prevalencia (82,4%) al igual que en los productos a base de arroz (41,8%). En productos a base de maíz, AFT tuvo mayor prevalencia (21,4%). La mayor co-ocurrencia de micotoxinas se halló en los productos que se expenden a granel. Por lo tanto, se deberían aplicar buenas prácticas para

garantizar las condiciones adecuadas durante el almacenamiento y la manipulación de los productos finales.

Palabras clave: *Micotoxinas, salud pública, trigo, maíz, arroz.*

Evaluation of the presence of different mycotoxins in cereal-based products

Abstract

Cereals and cereal-based foods are considered crucial in the human diet. Despite this, they can be contaminated with mycotoxins, which are secondary metabolites secreted by fungi that colonize the plant during its growth or infect the grains after harvest. The most important in cereals are deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), total aflatoxins (AFT) and ochratoxin A (OTA). Because they are resistant to different treatments applied during the processing (milling, cooking and fermentation) of cereal grains and products based on them, consumers could be exposed to these mycotoxins through their consumption. This situation represents a serious risk to human health and considerable economic losses for the agricultural sector. The objective of this study was to evaluate the presence of DON, ZEA, AFT and OTA in food products based on cereals (wheat, corn and rice) commercially available in Rafaela, Santa Fe. For this purpose, 43 food samples for sale were selected. mass that are sold in supermarkets and dietary. The presence of mycotoxins was determined through a rapid methodology (ELISA) using the RIDASCREEN®FAST test kit (R-Biopharm, Germany). The overall prevalence order in the samples examined was DON>AFT>OTA>ZEA. The order of concentration of mycotoxins in cereal-based products was DON>ZEA>AFT>OTA. Wheat-based products were the ones that presented the highest number of mycotoxins, with DON being the most prevalent (82.4%) as well as rice-based products (41.8%). In corn-based products, AFT had a higher prevalence (21.4%). The highest co-occurrence of mycotoxins was found in products sold in bulk. Therefore, good practices should be applied to ensure proper conditions during storage and handling of final products.

Key words: Mycotoxins, public health, wheat, corn, rice

1. Introducción

Debido a los aspectos culturales, religiosos, mitológicos, históricos y económicos, los cereales y los productos a base de cereales se consideraron como alimentos cruciales dentro de la alimentación humana (Duarte *et al.*, 2010). Los cultivos de cereales fueron las primeras especies de plantas cultivadas por los humanos y durante más de diez mil años han sido el alimento básico para muchas sociedades humanas. Actualmente, muchas especies y variedades de cereales se cultivan en todo el mundo, particularmente el trigo, el arroz y el maíz, que son de primordial importancia (Pereira *et al.*, 2014). Los cereales proporcionan cantidades significativas de la mayoría de los nutrientes, como los carbohidratos y las proteínas, los ácidos grasos esenciales, todas las vitaminas del complejo B, vitamina E, hierro y otras importantes trazas de minerales, fitoquímicos y fibra, que juegan un papel importante tanto en nutrición humana como animal (Pereira *et al.*, 2014). A pesar de esto, los mismos pueden estar contaminados por diferentes peligros, entre ellos las micotoxinas (Pereira *et al.*, 2014). Su presencia en los alimentos a base de cereales es un problema importante que causa pérdidas en la agroindustria y afecta a la salud pública (Pinotti *et al.*, 2016).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios secretados principalmente por algunas especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* que se pueden encontrar en cereales y productos a base de cereales debido a que los mohos colonizan la planta durante su crecimiento o infectan los cultivos después de la cosecha (Campagnollo *et al.*, 2016; De Boevre *et al.*, 2012; Magan y Aldred, 2007; Majeed *et al.*, 2018; Paster y Bullerman, 1988; Pereira *et al.*, 2014; Sauer, 1988). Según Pereira *et al.* (2014) las micotoxinas más importantes en los cereales son ocratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), aflatoxinas totales (AFT) y zearalenona (ZEA) que podrían presentar algunos efectos adversos para la salud como mutagenicidad, dermatotoxicidad, neurotoxicidad,

hepatotoxicidad, teratogenicidad, estrogenicidad, carcinogenicidad y efectos inmunosupresores (Amirahmadi *et al.*, 2017; Mousavi Khaneghah *et al.*, 2017; Oteiza *et al.*, 2017). Como las micotoxinas son resistentes a diferentes tratamientos aplicados durante el procesamiento (molienda, cocción y fermentación) de los granos de cereales y productos a base de ellos, los consumidores pueden estar expuestos a estas micotoxinas a través del consumo de los mismos (Bullerman y Bianchini, 2007; Khaneghah, Martins *et al.*, 2018). Aún bajo este contexto, existe información limitada sobre la presencia de estas toxinas en los productos a base de cereales que son de primordial importancia en la nutrición humana. Por lo tanto, la investigación sobre la contaminación de los alimentos a base de cereales por las micotoxinas atrae una atención considerable debido a la importante amenaza que representan para la salud humana; más aún porque los procedimientos para identificarlos son algo especializados y costosos, y los protocolos de muestreo necesarios antes de que se pueda llevar a cabo el análisis todavía no se han dominado por completo (De Koe y Juodeikiene, 2012).

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se basa en el reconocimiento anticuerpo-antígeno selectivo y específico. El ELISA competitivo utiliza un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario. Esta tecnología es rápida y simple, tiene alta sensibilidad y especificidad, convirtiendo a este método en una prueba confiable ya que está reconocido internacionalmente y validado con normativas de referencia. Finalmente es relativamente económico comparado con los métodos de referencia lo cual permite la realización de un número más representativo de muestras.

2. Revisión bibliográfica

Actualmente, el riesgo toxicológico asociado con las micotoxinas se ha convertido en un aspecto central del problema de la invasión fúngica de los cultivos o de los granos almacenados (De Vries *et al.*, 2002). Adquieren relevancia en salud pública y animal, debido a que pueden causar efectos adversos en el hombre y en los animales. Los efectos de las micotoxinas incluyen diversos tipos de cáncer, disminución de la respuesta inmune, trastornos hormonales, lesiones hepáticas y renales, entre otros (Rojas y Wilches, 2011).

DON es probablemente el más importante de los tricotecenos, ya que está muy extendido y se considera una micotoxina marcadora de los tricotecenos (Turner *et al.*, 2008). DON constituye una familia numerosa de compuestos estructuralmente relacionados, producidos por diversos géneros de hongos tales como *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys* y *Trichoderma* (Beremand y McCormick, 1992). Los más importantes en los alimentos son los producidos por *Fusarium* y, en general, se encuentran ampliamente distribuidos en granos de cereales (trigo, maíz, avena, cebada, centeno y arroz) (Martínez-Larrañaga y Navarro, 2006; Rojas y Wilches, 2011). El principal síndrome que provoca es el gastroentérico, actuando sobre el sistema nervioso central causando un síndrome emético y rechazo del alimento. Las manifestaciones habituales de la intoxicación por tricotecenos consisten en inmunodepresión y náuseas, a veces acompañadas de vómitos (Rojas y Wilches, 2011). Además, la exposición crónica a DON puede ser el principal factor que contribuye a la nefropatía IgA humana y al cáncer esofágico en el hombre (Hinoshita *et al.*, 1997; Knasmüller *et al.*, 1997).

Otra micotoxina generalizada producida por *Fusarium spp* (principalmente *F. graminearum* y *F. culmorum*) es ZEA. Otras especies productoras de la toxina son *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* y *F. semitectum*, estos hongos requieren alta disponibilidad de

agua en el sustrato y son en su mayoría fitopatógenos, capaces de invadir los cultivos en el campo, pero crecen limitadamente en granos almacenados (Rojas y Wilches, 2011). La ZEA aparece con frecuencia en el maíz, en algunos casos en concentraciones bastante altas (Wentz *et al.*, 1981). También se ha detectado en otros granos (trigo, avena, cebada, sorgo, mijo) heno, ensilados y alimentos balanceados (Jelinek *et al.*, 1989; Díaz, 1996). Los efectos tóxicos más importantes de esta toxina se deben a su acción sobre los receptores estrogénicos, que si son estimulados en exceso dan lugar a hiperestrogenismo, con consecuencias dañinas para el sistema reproductivo (Farnworth y Trenholm, 1981). Esta micotoxina se ha reportado como un posible factor involucrado en cáncer de cerviz y telarquia prematura (Blunden *et al.*, 1991). Al igual que con las otras toxinas de *Fusarium*, no se produce una reducción de ZEA durante o como resultado del proceso de cocción (Numanoglu *et al.*, 2010).

Las AFT son producidas principalmente por algunas cepas del género *Aspergillus spp* (De Koe y Juodeikiene, 2012). Constituyen un grupo muy relacionado de metabolitos heterocíclicos sintetizados principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Palmgren y Hayes, 1987). Los efectos tóxicos de estos metabolitos han sido ampliamente reportados y son el resultado de su capacidad de interactuar con ácidos nucleicos, nucleoproteínas y síntesis de proteínas (IARC, 1993; Williams *et al.*, 2004; Wangikar *et al.*, 2005). La aflatoxina B1 (AFB₁) es considerada el compuesto biológicamente más activo de la familia de las aflatoxinas y se presenta en un número importante en alimentos para animales, así como también en maíz, algodón y maní. Ocasionalmente, *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden colonizar pequeños granos de cereales como cebada, avena y trigo, y producir niveles de aflatoxinas de bajos a moderados (Rojas y Wilches, 2011). La AFB₁ es el más potente hepatocarcinógeno tanto en mamíferos como en humanos, y se ha encontrado una correlación entre la exposición alimentaria a AFB₁ y un mayor riesgo de cáncer

de hígado en humanos con infecciones crónicas de hepatitis B (Who-IARC, 1982; Bean *et al.*, 1989; Creppy, 2002; Viridis, 2009). Entre otros efectos presuntamente relacionados con las aflatoxinas están el Síndrome de Reye y Kwashiorkor (Rojas y Wilches, 2011).

Otra micotoxina que se produce en los cereales es la OTA. Es considerada un metabolito secundario tóxico producido por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, principalmente por *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*, capaces de crecer sobre una amplia gama de sustratos orgánicos. Los cereales, en humanos, y los piensos, en animales, constituyen las principales fuentes de exposición alimentaria. La OTA es nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena, teratogénica y neurotóxica. Respecto a la actividad carcinogénica, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) ha clasificado a esta micotoxina en la categoría 2B, es decir, como posible carcinógeno humano. La exposición a alimentos contaminados con OTA se ha relacionado con evidencias epidemiológicas de cáncer testicular debido a la formación de aductos con el ADN inducidos por la acción de este genotóxico y ha sido implicada como un agente causal de tumores epiteliales del tracto urinario superior y de una nefropatía progresiva conocida como “nefropatía endémica de los Balcanes” (Krogh, 1978; Ravelo Abreul *et al.*, 2011).

La exposición crónica a bajos niveles de micotoxinas sigue siendo una preocupación importante en la cadena alimentaria de los cereales (Hussein y Brasel, 2001). En nuestro país, diversas instituciones han trabajado en investigación sobre la presencia de micotoxinas en cereales: DON y ZEA en trigo (González, 1995; González *et al.*, 1996; Pacin *et al.*, 2010, Quiroga *et al.*, 1995); DON, ZEA y AFT en maíz (Peralta Sanhueza, 1997); DON, ZEA, AFT y FB en maíz (Garrido *et al.*, 2012), DON, ZEA y AFT en arroz (Broggi, 1998). Cabe destacar que las mayores investigaciones llevadas a cabo en nuestro país se realizaron sobre cereales destinados al consumo

animal, y existen escasos estudios que abordan la presencia de micotoxinas en alimentos a base de cereales para consumo humano. Debido a que los cereales de menor calidad se destinan al consumo interno, es necesario cuantificar el riesgo al cual se encuentra expuesta la población argentina derivada del consumo de productos alimenticios elaborados a base de estos cereales, además de la co-ocurrencia de varias micotoxinas que podría llegar a hallarse en estos productos como fue reportado en trabajos anteriores, en particular las producidas por el género *Fusarium* (Costamagna *et al.*, 2018; Gaggiotti *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2012; Nichea *et al.*, 2015;).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la presencia y concentración de las micotoxinas DON, ZEA, AFT y OTA en productos alimenticios a base de cereales (trigo, maíz y arroz) disponibles comercialmente en supermercados y dietéticas de la ciudad de Rafaela.

3.2. Objetivos específicos:

- Analizar el efecto del tipo de presentación del producto (envasado en origen, a granel) y del tipo de cereal (trigo, maíz y arroz) sobre la presencia y concentración de las micotoxinas DON, ZEA, AFT y OTA.
- Evaluar la co-ocurrencia de micotoxinas en las muestras analizadas.
- Comparar los niveles detectados de micotoxinas con los límites establecidos para la comercialización de productos alimenticios por las normativas internacionales.

4. Materiales y métodos

Todos los ensayos descritos a continuación se realizaron en el Laboratorio de Forrajes del INTA EEA Rafaela.

4.1. Selección de muestras

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio estratificado. Se realizó un listado de los comercios que expenden productos alimenticios a base de cereales derivados del trigo, arroz y maíz en la localidad de Rafaela, que cumplieran con los criterios de inclusión y se sortearon dentro de esa lista, 10 establecimientos, quedando seleccionados los supermercados y dietéticas donde se adquirieron finalmente las 43 muestras de alimentos para el ensayo.

Posteriormente, dentro de cada comercio se seleccionaron al azar y de la manera más equitativa posible productos alimenticios a base cereales derivados de trigo, arroz y maíz en dos modalidades de presentación: envasado al origen y a granel.

4.2. Preparación de las muestras

4.2.1. Molienda

El contenido total de cada muestra fue molido mediante un Molino Thomas Model 4 Wiley® Mill (*Figura 1*). Entre muestras, el molino se limpió con una aspiradora (*Figura 2*). Las muestras se conservaron en bolsas plásticas herméticas a temperatura ambiente y las que presentaban un alto contenido de aceite se colocaron en heladera a 2-8°C. El análisis de las muestras se realizó inmediatamente finalizada esta etapa. Cada muestra fue identificada unívocamente de acuerdo al sistema de ingreso del Laboratorio de Forrajes de INTA Rafaela, para asegurar su trazabilidad.



Figura 1- Molino Thomas Model 4 Wiley® Mill



Figura 2- Limpieza de molino

4.2.2. Extracción de micotoxinas

4.2.2.1. DON

Se pesaron 5 g de las muestras molidas en un erlenmeyer utilizando una balanza analítica (*Figura 3*) y se le agregaron 100 ml de agua destilada (*Figura 4*). Luego fueron agitadas vigorosamente durante 3 minutos en un agitador mecánico (*Figura 5*). Se filtraron los extractos a

través de papel de filtro de 12,5 mm de diámetro colocado en un embudo en otro erlenmeyer (Figura 6). Se utilizaron 50 μ l de la dilución por pocillo para su análisis.



Figura 3- Pesaje de muestras



Figura 4- Adición de disolvente



Figura 5- Agitación



Figura 6- Filtrado

4.2.2.2. ZEA y AFT

Se pesaron 5 g de las muestras molidas en un erlenmeyer utilizando una balanza analítica y se le agregaron 25 ml de metanol al 70% (70 ml de metanol al 100% con 30 ml de agua destilada). Luego fueron agitadas vigorosamente durante 3 minutos en un agitador mecánico. Se filtraron los extractos a través de papel de filtro de 12,5 mm de diámetro colocado en un embudo en otro

erlenmeyer (*Figura 7*). Posteriormente se realizó una dilución de 1 ml de cada filtrado con 1 ml de agua destilada. Se utilizaron 50 μ l de la dilución por pocillo para su análisis en el test.



Figura 7- Extractos

4.2.2.3. OTA

Se pesaron 10 g de las muestras molidas en un erlenmeyer utilizando una balanza analítica (*Figura 3*) y se le agregaron 50 ml de la solución de extracción ECO diluida (Extractor Concentrate Ochratoxin). Esta solución se utilizó como tampón de extracción. Para preparar la solución de extracción ECO lista para usar, se diluyó la solución de extracción ECO concentrada 10x (1:10 con agua destilada o desionizada). Luego fueron agitadas brevemente por 10 segundos y a continuación vigorosamente durante 5 minutos en un agitador mecánico (*Figura 5*). Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 3500 rpm a temperatura ambiente (20-25°C). Posteriormente se realizó una dilución de 1 ml de cada sobrenadante con 1 ml de tampón de lavado (PSB Tween: tampón de fosfato 10 mM, pH 7,4 que contiene 0,05% Tween 20). Se utilizaron 50 μ l de la dilución por pocillo para su análisis en el test.

4.3. *Análisis de micotoxinas*

4.3.1. *DON*

Se utilizó el test RIDASCREEN® FAST DON (R-Biopharm, Alemania) que es un inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de DON en cereales, con las siguientes características: límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) <0,2 mg/kg (ppm).

Se colocaron 48 pocillos en el marco portapocillos para los estándares (0 mg/l, 0,222 mg/l, 0,666 mg/l, 2 mg/l y 6 mg/l) y las muestras a analizar, marcando la posición de los estándares y de las muestras (*Figuras 8 y 9*).

Se agregaron 50 µl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes a través de una micropipeta, utilizando un tip nuevo para cada estándar y para cada muestra. Se adicionaron 50 µl del conjugado deoxinivalenol-enzima a los pocillos correspondientes, y luego 50 µl de anticuerpo anti-deoxinivalenol a cada pocillo mezclando el contenido de la microplaca suavemente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C), como se muestra en la figura 10.



Figura 8- Preparación de muestras

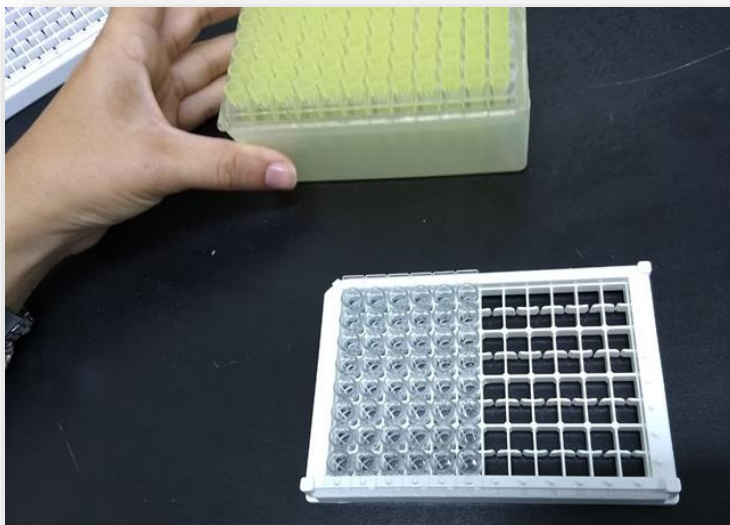


Figura 9- Marco portapocillos



Figura 10- Agregado de conjugado a los pocillos

Se vaciaron los pocillos y luego se golpeó enérgicamente tres veces consecutivas el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Seguidamente se lavaron los pocillos (250 μ l) con tampón de lavado (tampón de fosfato 10 mM, pH 7,4 que contiene 0,05% Tween 20) utilizando una pipeta y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente, repitiendo este paso 2 veces más.

Se agregaron 100 μ l de sustrato cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente, y de forma inmediata se incubó 3 minutos (\pm 0,5) en la oscuridad a temperatura ambiente. Se añadieron luego 100 μ l de la solución stop a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente se midió la absorbancia (A) a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos, con un lector automático de microplacas Multiskan EX Thermo Electrón (*Figura 11*). La intensidad de absorción es inversamente proporcional a la concentración de DON en la muestra. Se utilizó el

software RIDA®SOFT Win.net; R-Biopharm AG para la cuantificación de los resultados de A de los inmuno-ensayos enzimáticos RIDASCREEN®.



Figura 11- Lector automático de microplacas Multiskan EX Thermo Electrón

4.3.2. ZEA

Se utilizó el test RIDASCREEN® FAST ZEARALENON (R-Biopharm, Alemania) que es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de ZEA en cereales, con las siguientes características: LD 17- 41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) y LC 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb). Se colocaron 48 pocillos en la placa portapocillos, recubiertos con anticuerpos de captura, para los estándares (0 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb y 400 ppb) y las muestras a analizar, marcando la posición de los estándares y de las muestras.

Se agregaron 50 μl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes a través de una micropipeta, utilizando un tip nuevo para cada estándar y para cada muestra. Se

adicionaron 50 μ l del conjugado zearalenona-peroxidasa a los pocillos correspondientes, y luego 50 μ l de anticuerpo anti-zearalenona a cada pocillo mezclando el contenido de la microplaca suavemente e incubando durante 10 minutos (± 1) a temperatura ambiente (20-25°C).

Se vaciaron los pocillos y luego se golpeó enérgicamente tres veces consecutivas el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Seguidamente se lavaron los pocillos (250 μ l por pocillo) con agua destilada utilizando una pipeta y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente, repitiendo este paso 2 veces más.

Se agregaron 100 μ l de substrato cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente, y de forma inmediata se incubó 5 minutos ($\pm 0,5$) en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C). Se añadieron luego 100 μ l de la solución stop (solución de ácido sulfúrico 1N) a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente se midió A a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos, con un lector automático de microplacas Multiskan EX Thermo Electrón. La intensidad de absorción es inversamente proporcional a la concentración de ZEA en la muestra. Se utilizó el software RIDA®SOFT Win.net; R-Biopharm AG para la cuantificación de los resultados de A de los inmuno-ensayos enzimáticos RIDASCREEN®.

4.3.3. AFT

Se utilizó el test RIDASCREEN® FAST AFLATOXIN (R-Biopharm, Alemania) que es un inmunoensayo enzimático competitivo para el análisis cuantitativo de AFT en cereales, con las siguientes características: LD y LC < 1,7 μ g/kg (ppb).

Se colocaron 48 pocillos en la placa portapocillos, recubiertos con anticuerpos de captura, para los estándares (0 ppb, 1,7 ppb, 5 ppb, 15 ppb y 45 ppb) y las muestras a analizar, marcando la posición de los estándares y de las muestras.

Se agregaron 50 μ l de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes a través de una micropipeta, utilizando un tip nuevo para cada estándar y para cada muestra. Se adicionaron 50 μ l del conjugado aflatoxina-peroxidasa a los pocillos correspondientes, y luego 50 μ l de anticuerpo anti-aflatoxina a cada pocillo mezclando el contenido de la microplaca suavemente e incubando durante 10 minutos (± 1) a temperatura ambiente (20-25°C), como se muestra en la figura 10.

Se vaciaron los pocillos y luego se golpeó enérgicamente tres veces consecutivas el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Seguidamente se lavaron los pocillos (250 μ l por pocillo) con tampón de lavado (tampón de fosfato 10 mM, pH 7,4 que contiene 0,05% Tween 20) utilizando una pipeta y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente, repitiendo este paso 2 veces más.

Se agregaron 100 μ l de substrato cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente, y de forma inmediata se incubó 5 minutos ($\pm 0,5$) en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C). Se añadieron luego 100 μ l de la solución stop (solución de ácido sulfúrico 1N) a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente se midió A a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 minutos, con un lector automático de microplacas Multiskan EX Thermo Electrón. La intensidad de absorción es inversamente proporcional a la concentración de AFT en la muestra. Se utilizó el software

RIDA®SOFT Win.net; R-Biopharm AG para la cuantificación de los resultados de A de los inmuno-ensayos enzimáticos RIDASCREEN®.

4.3.4. OTA

Se utilizó el test RIDASCREEN® FAST OCHRATOXIN A (R-Biopharm, Alemania) que es un inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de OTA en cereales, con las siguientes características: LD y LC 1,5 µg/kg (ppb) para trigo y 1,3 µg/kg (ppb) para maíz y arroz.

Se colocaron 48 pocillos en el marco portapocillos para los estándares (0 µg/l, 1 µg/l, 3 µg/l, 10 µg/l, 30 µg/l y 100 µg/l) y las muestras a analizar.

Se agregaron 50 µl de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes a través de una micropipeta, utilizando un tip nuevo para cada estándar y para cada muestra. Se adicionaron 50 µl del conjugado a los pocillos correspondientes mezclando el contenido de la microplaca suavemente e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) en la oscuridad, como se muestra en la figura 10.

Se vaciaron los pocillos y luego se golpeó enérgicamente tres veces consecutivas el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Seguidamente se lavaron los pocillos (250 µl por pocillo) con tampón de lavado (tampón de fosfato 10 mM, pH 7,4 contiene 0,05% Tween 20) utilizando una pipeta y se vaciaron nuevamente los pocillos de la forma indicada anteriormente, repitiendo este paso 2 veces más.

Se añadieron 100 µl de substrato cromógeno a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente, y de forma inmediata se incubó 3 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C). Se agregaron luego 100 µl de la solución stop (solución de ácido sulfúrico 1N) a cada pocillo, mezclando el contenido de la microplaca suavemente.

Finalmente se midió A a 450 nm en el transcurso de los siguientes 15 minutos, con un lector automático de microplacas Multiskan EX Thermo Electrón. La intensidad de absorción es inversamente proporcional a la concentración de OTA en la muestra. Se utilizó el software RIDA®SOFT Win.net; R-Biopharm AG para la cuantificación de los resultados de A de los inmuno-ensayos enzimáticos RIDASCREEN®.

4.4. *Análisis estadístico*

Las concentraciones de cada micotoxina en los productos alimenticios se analizaron mediante estadística descriptiva (frecuencia, media \pm desviación estándar o mediana). El efecto del tipo de presentación de los alimentos (a granel o envasado en origen) y el tipo de cereal (maíz, trigo y arroz) sobre la concentración de micotoxinas, se evaluó mediante la prueba Anova. Previamente se comprobaron los supuestos de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (Test de Levene). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2012).

5. Resultados y discusión

5.1. Prevalencia y concentración de micotoxinas en alimentos a base de cereales

El número de muestras positivas, valores medios y prevalencia total de las micotoxinas DON, ZEA, AFT y OTA analizadas en alimentos a base de maíz, trigo y arroz se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1- Número de muestras positivas, valores medios y prevalencia total de diferentes micotoxinas analizadas en alimentos a base de maíz, trigo y arroz.

Micotoxinas	Deriv. Maíz (n=14)		Deriv. Trigo (n=17)		Deriv. Arroz (n=12)		TOTAL (n=43)
	Muestras positivas ^a (n) %	M ± DE ^b (µg/kg)	Muestras positivas ^a (n) %	M ± DE ^b (µg/kg)	Muestras positivas ^a (n) %	M ± DE ^b (µg/kg)	Prevalencia total (n) %
AFT	(3) 21,4	2,8±4,2	(4) 23,5	2,3±3,9	(1) 8,3	1,1±0,9	(8) 18,6
ZEA	(2) 14,3	19,9±7,9	(4) 23,5	23,3±12,6	(0) 0	17±0	(6) 13,9
DON	(1) 7,1	162±137	(14) 82,4	496±356	(5) 41,8	331±333	(20) 46,5
OTA	(2) 14,5	1,0±0,7	(2) 11,8	1,4±1,2	(2) 16,7	1,3±0,4	(6) 14,3

Referencias: ^aMuestras > límite de detección; ^bMedia (M) ± Desvío estándar (DE); Derivados (Deriv.).

La prevalencia de DON en las muestras examinadas fue superior a las demás micotoxinas. El orden de clasificación general de la prevalencia de micotoxinas en los alimentos a base de cereales fue DON > AFT > OTA > ZEA. El valor medio (µg/kg) de las diferentes micotoxinas analizadas en las muestras de alimentos a base de maíz, trigo y arroz se observa en la Tabla 2.

Tabla 2- Valor medio, desvío estándar y rango de micotoxinas en productos alimenticios a base de cereales.

Micotoxinas	M± DE (µg/kg) ^a	Rango (µg/kg)
AFT	2,15 ± 3,47	0,03-17,3
ZEA	20,42 ± 9,31	17-51
DON	341,05 ± 323	20-1230
OTA	1,27 ± 0,87	0,10-4,30

Referencias: ^aMedia (M) ± Desvío Estándar (DE)

El orden de clasificación total de concentración de micotoxinas en productos a base de cereales fue DON>ZEA>AFT>OTA. Estos resultados son coincidentes con una revisión sistemática y metaanálisis realizado por Khaneghah, Fakhri *et al.* (2018) en matrices alimentarias similares donde DON y ZEA fueron halladas en mayor concentración. Esto puede deberse a diversos factores que proporcionan las condiciones necesarias para el crecimiento de hongos y posterior contaminación por micotoxinas, como las condiciones climáticas, los procesos de secado inadecuados, así como la manipulación, el transporte y el almacenamiento deficientes en la etapa de recolección (Khaneghah, Fakhri *et al.*, 2018).

La prevalencia total de DON en las muestras analizadas de alimentos a base de cereales fue del 46,5%. El orden de clasificación de los alimentos a base de cereales en función de la prevalencia y concentración de DON fue trigo>arroz>maíz.

La prevalencia total de ZEA en las muestras analizadas de alimentos a base de cereales fue del 13,9%. La mayor prevalencia se presentó en las muestras de alimentos a base trigo y maíz, no presentándose muestras por encima del límite de detección para el caso de los alimentos derivados del arroz. La mayor concentración fue hallada en los alimentos a base de trigo, seguido por los alimentos a base de maíz y por último los alimentos a base de arroz.

La prevalencia total de AFT en las muestras analizadas de alimentos a base de cereales fue del 18,6%. El orden de clasificación de los alimentos a base de cereales en función de la prevalencia

de AFT fue trigo>maíz>arroz, aunque las concentraciones más altas se presentaron en maíz, seguida por el trigo y finalmente el arroz.

La prevalencia total de OTA en las muestras analizadas de alimentos a base de cereales fue de 14,3%. El orden de clasificación de los alimentos a base de cereales en función de la prevalencia de OTA fue arroz>maíz>trigo. Las mayores concentraciones de OTA se hallaron en las muestras de trigo seguidas por los alimentos a base de arroz y finalmente los alimentos a base de maíz.

Los productos a base de trigo fueron los que mayor cantidad de micotoxinas presentaron, siendo DON la micotoxina de mayor prevalencia (82,4%) al igual que en productos a base de arroz (41,8%). En productos a base de maíz, AFT tuvo mayor prevalencia (21,4%), seguida por OTA (14,5%) (Gráfico 1). Este hallazgo es consistente con los resultados recopilados por Palumbo *et al.* (2020), donde el trigo fue el cereal más informado con respecto a las micotoxinas individuales y, además este cereal presentó las concentraciones más altas de DON reportadas en los alimentos a base de cereales. El tiempo de almacenamiento y las condiciones sanitarias del lugar de almacenamiento han sido identificados como los principales factores que contribuyen a la proliferación de estas micotoxinas en productos alimentarios a base de cereales (Khaneghah, Martins *et al.*, 2018).

Se han realizado varios estudios en todo el mundo para determinar la ocurrencia y los niveles de micotoxinas en productos a base de cereales usando diferentes técnicas. En Sudáfrica, se analizaron muestras de productos a base de trigo comercialmente disponibles en supermercados y, a partir de técnicas cromatográficas (HPLC, TLC, LC-MS), concluyeron que la micotoxina predominante fue DON (Mashinini y Dutton, 2006). En un estudio realizado en Serbia, Škrbić *et al.*, (2012) analizaron muestras de harina de trigo adquirida en supermercados, mediante LC-MS donde se reportó que DON fue la micotoxina predominante en todas las muestras analizadas. Los

autores asocian estos resultados a que DON es parcialmente resistente a la descomposición durante los procedimientos de cocción.

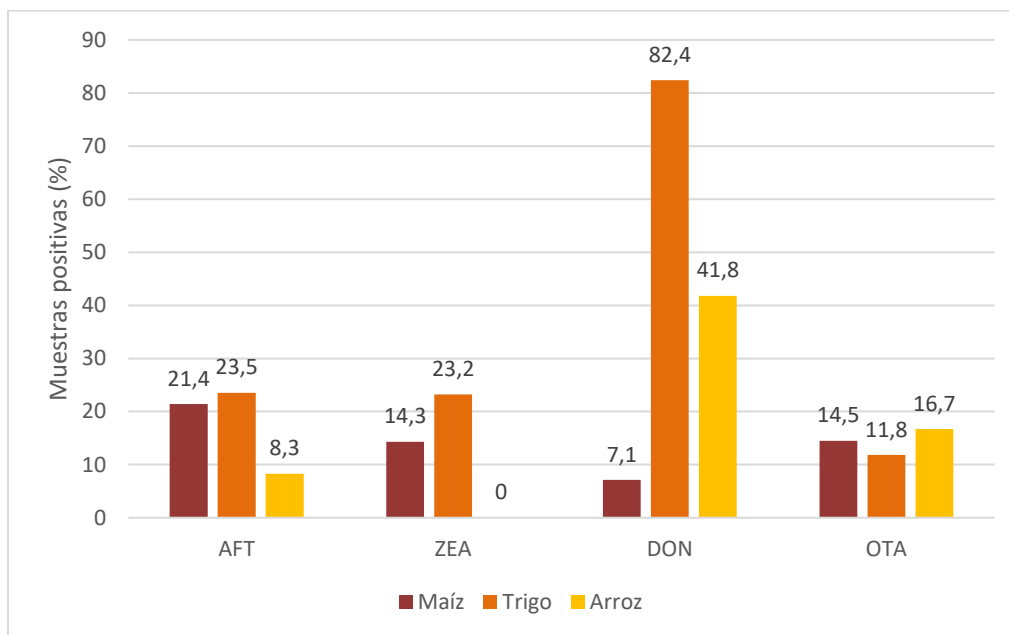


Gráfico 1- Porcentaje de prevalencia de micotoxinas en cada matriz analizada.

Las diferencias en la concentración y prevalencia de micotoxinas en los alimentos a base de cereales pueden deberse a diferentes razones, incluidas las propiedades físicas y químicas de los alimentos (pH, enzimas endógenas, composición y actividad del agua) el manejo de la producción (labranza, cosecha, almacenamiento y procesamiento) y condiciones climáticas (humedad, temperatura y precipitación) (Reyneri, 2006). Sin embargo, se atribuye que una de las principales razones de la diferencia en la concentración y la prevalencia de algunas de las micotoxinas como la AFT en los productos alimenticios es el tiempo de almacenamiento y las condiciones sanitarias y ambientales en el lugar de almacenamiento que pueden promover la proliferación de esas micotoxinas en productos alimenticios a base de cereales (Kamika y Takoy, 2011; Kamika y Tekere, 2016; Magan y Aldred, 2007). Kamika y Tekere (2016) demostraron que la concentración

de aflatoxinas en las muestras de maíz en la tienda de la ciudad era 500 veces mayor que en las muestras previas a la cosecha. Por lo tanto, el aumento de aflatoxinas en los almacenes también podría estar correlacionado con la falta de condiciones ambientales en las instalaciones donde se almacenan los productos (Magan y Aldred, 2007).

5.2. Efecto del tipo de presentación de los alimentos sobre la presencia de micotoxinas

El tipo de presentación del producto no estuvo asociado a la presencia de ZEA ($P= 0,619$), DON ($P= 0,376$) y OTA ($P= 0,919$), pero sí a la presencia de AFT en los tres cereales ($P < 0,001$). Aquellos alimentos comprados a granel tuvieron el doble de concentración de AFT ($3,8 \pm 1,2$ ug/kg) que aquellos comprados en su envase original ($1,6 \pm 0,3$ ug/kg). Estos resultados nos demuestran que las condiciones de almacenamiento de los productos a granel podrían estar influyendo en la concentración de AFT promoviendo el desarrollo y proliferación del hongo durante ese período.

5.3. Co-ocurrencia de micotoxinas en productos a base de cereales

La Tabla 3 muestra la co-ocurrencia de micotoxinas en las muestras de productos a base de cereales analizadas en este estudio, representando todas las muestras con concentraciones por encima del LD.

Teniendo en cuenta la co-ocurrencia de las micotoxinas detectadas, en el 46,7% de las muestras analizadas de cereales no se manifestó ninguna micotoxina, mientras que el 23,3% presentó solo 1, siendo en su totalidad DON. En el 23,3% de las muestras se manifestaron 2 micotoxinas; siendo la combinación de mayor frecuencia de aparición la de DON-ZEA. En 2 muestras, correspondientes a tutuca de trigo y arroz yamaní inflado de venta a granel se manifestaron 3 micotoxinas: AFT, DON y OTA (4,7%). En la muestra de tutuca de trigo de venta a granel, se encontraron las 4 micotoxinas (2,3%).

Tabla 3- *Co-ocurrencia de micotoxinas en muestras de alimentos a base de cereales*

Número de micotoxinas	Tipo de co-ocurrencia	Número de muestras positivas (n=43)
2	AFT – ZEA	1
2	AFT – DON	2
2	AFT – OTA	2
2	DON – ZEA	4
2	DON – OTA	1
3	AFT – DON - OTA	2
4	AFT – DON – OTA - ZEA	1
Total (%)		13 (30)

La mayor co-ocurrencia de micotoxinas se halló en los productos que se expenden a granel. El problema que plantea la co-ocurrencia de micotoxinas en los alimentos es que la combinación múltiple de estos compuestos puede dar lugar a interacciones tóxicas aditivas o sinérgicas adicionales en comparación con la exposición a una sola micotoxina (Alassane-Kpembé *et al.*, 2017; Franco *et al.*, 2019).

La micotoxina que se presentó en la totalidad de las muestras positivas y en todas las matrices estudiadas fue DON. Este resultado coincide con el estudio realizado por Cerveró *et al.* (2006), en productos a base de maíz, donde DON se halló en todas las muestras positivas. Además, en dicho trabajo se expuso que en las muestras que contenían 2 micotoxinas, la combinación más frecuente fue DON-ZEA, similar al resultado obtenido en nuestro estudio. En concordancia con esto, los datos obtenidos en la extensa revisión bibliográfica realizada por Palumbo *et al.* (2020), indicaron que la coexistencia de DON-ZEA fue la más frecuente en productos a base de trigo.

5.4. *Comparación de niveles detectados de micotoxinas con los límites establecidos internacionalmente para la comercialización de productos alimenticios a base de cereales*

Cheli *et al.*, (2014) establecen que es importante el conocimiento, control del nivel y distribución de contaminantes en cereales debido al alto impacto económico y sanitario en la seguridad de alimentos y piensos tanto en la salud humana como animal; por lo que las concentraciones máximas de las micotoxinas deben establecerse en un nivel estricto que sea razonablemente alcanzable, priorizando el riesgo relacionado con el consumo de alimentos a base de cereales.

Las reglamentaciones de la Unión Europea (UE) establecen los niveles máximos permitidos de micotoxinas en los productos a base de cereales para consumo humano (De Koe y Juodeikiene, 2012; EC, 2006). Teniendo en cuenta las mismas, el 4,6% de las muestras examinadas excedió el valor establecido por la UE tanto para AFT como para ZEA y OTA, y el 16,3% superó el valor determinado para DON (Tabla 4). DON fue la micotoxina que superó en mayor porcentaje la tolerancia de la regulación de la UE. Los productos a base de maíz que superaron el nivel máximo permitido de micotoxinas para consumo humano, según UE, fueron tutuca de maíz de venta a granel (AFT) y maíz pisingallo (DON); de los productos a base de trigo que superaron reglamentación de la UE fueron tutuca de trigo de venta a granel (AFT, ZEA, DON y OTA), harina integral de trigo de venta a granel (ZEA), fideos secos al huevo (DON), pasta seca de sémola (DON), galletitas de salvado (DON), galletitas saladas (DON) y tutuca de trigo (OTA). Los productos a base de arroz que superaron los niveles máximos permitidos de AFT según la regulación de la UE fueron arroz inflado y harina de arroz de venta a granel.

Tabla 4- *Porcentaje de muestras que superaron los niveles máximos de micotoxinas en productos para alimentación humana a base de cereales establecidos por la Unión Europea (UE)*

Micotoxinas	Muestras que superan límites establecidos por UE (n) %			Límites establecidos por UE	
	Maíz (n=14)	Trigo (n=17)	Arroz (n=12)	Máximo nivel en:	µg/kg
AFT	(1) 7	(1) 6	(0) 0	Todos los cereales y productos derivados de cereales, incluyendo productos de cereales procesados.	4
	<i>% muestras que superan: 4,6</i>			Maíz sometido a tratamiento físico antes del consumo humano o utilizado como ingrediente en alimentos.	10
ZEA	(0) 0	(2) 12	(0) 0	Maíz destinado al consumo humano directo, harina de maíz, sémola de maíz, germen de maíz y aceite de maíz refinado.	200
	<i>% muestras que superan: 4,6</i>			Pan, pasteles, galletas, refrigerios de cereales y cereales para el desayuno, excepto aperitivos de maíz y cereales para el desayuno a base de maíz.	50
DON	(0) 0	(5) 29	(2) 17	Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales (harina de maíz y sémola de maíz), salvado como producto final comercializado directamente para consumo humano y germen.	750
	<i>% muestras que superan: 16,3</i>			Pasta seca Pan, pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales de desayuno.	500
OTA	(0) 0	(2) 12	(0) 0	Todos los productos derivados de cereales sin procesar, incluidos los cereales procesados, productos y cereales destinados al consumo humano directo.	3
	<i>% muestras que superan: 4,6</i>				

Las micotoxinas pueden transferirse a productos derivados de cereales durante el procesamiento (Khaneghah, Fakhri *et al.*, 2018). El trigo y la harina de trigo son los ingredientes principales para la fabricación de diversos productos a base de harina como pan, pasta y galletas. Dado que la baja actividad de agua de la harina podría ser un factor intrínseco para la conservación contra la contaminación microbiana, los productos a base de cereales podrían verse amenazados por la contaminación por hongos y la producción de micotoxinas debido al ligero aumento (1-2%) en el contenido de humedad durante su almacenamiento (Cabañas *et al.*, 2018; Reyneri, 2006).

5. Conclusiones

Este trabajo constituye el primer estudio en nuestro país sobre la presencia natural de estas micotoxinas en alimentos derivados de trigo, arroz y maíz disponibles comercialmente. Los resultados del presente estudio indican altos niveles de ocurrencia de DON, principalmente en los productos derivados del trigo. Además, DON fue la micotoxina que se presentó en mayor concentración en productos a base de cereales. El 30% de las muestras estuvieron contaminadas al menos por 2 tipos de micotoxinas, lo cual supone un riesgo para la salud de los consumidores e indica la necesidad de controlar estos productos antes de ser consumidos. DON fue la micotoxina que superó en mayor porcentaje la tolerancia de la regulación de la UE.

El tipo de presentación del producto (envase original o a granel) estuvo asociado a la presencia de AFT en los tres cereales analizados. Aquellos alimentos comprados a granel tuvieron el doble de concentración de AFT que aquellos comprados en su envase original. Es necesario aplicar buenas prácticas para garantizar las condiciones adecuadas durante el almacenamiento y la manipulación de los productos finales. Además, se deberían investigar y desarrollar diversas estrategias para prevenir, controlar y reducir la contaminación y proliferación de micotoxinas en los cultivos alimentarios, estudiando los puntos clave de control a lo largo de toda la cadena alimentaria y llevando a cabo un plan de vigilancia continua de micotoxinas en productos a base de cereales.

Por último, debido a la importancia y al impacto en la salud pública es importante trabajar con los entes regulares para que en la Argentina se establezcan los límites permitidos para las micotoxinas en productos a base de cereales, siendo que la UE los considera y en nuestro país no se controlan.

6. Bibliografía

- Alassane-Kpembé, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O. y Oswald, I. (2017). Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3489–3507.
- Amirahmadi, M., Shoeibi, S., Rastegar, H., Elmi, M. y Mousavi Khaneghah, A. (2017). Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure. *Toxin reviews*, 37(3), 187-195. doi:10.1080/15569543.2017.1354306
- Bean, W.J., Threlkeld, S.C. y Webster, R.G. (1989) Biological potential of amantadine-resistant influenza A virus in an avian model. *Journal of Infectious Diseases* 159: 1050-56.
- Beremand, M.N. y McCormick, S.P. (1992). Biosynthesis and regulation of trichothecene production by *Fusarium* species. pp. 359 – 384. En: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 5. BHATNAGAR D. *et al.*, eds. Marcel Dekker. New York.
- Blunden, G., Roch, O.G., Rosers, D.J., Coker, R.D., Bradburn, N. y John, A.E. (1991). Mycotoxins in Food. *Medical Laboratory Sciences*, 48: 271 – 282.
- Broggi, L. E. (1998). Estudio de la distribución de la micoflora contaminante de arroz recién cosechado: Riesgo potencial de aparición de micotoxinas en la Región Arrocería Argentina (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Bullerman, L.B. y Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International journal of food microbiology*, 119 (1-2), 140–146. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035

- Cabañas, R., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G. y Cabañas, F.J. (2008). Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food Microbiol*, 25, 642-647.
- Campagnollo, F.B., Ganev, K.C., Khaneghah, A.M., Portela, J.B., Cruz, A.G., Granato, D., ... y Sant'Ana, A.S. (2016). The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: a review. *Food Control*, 68, 310–329. doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.007
- Cerveró M. C., Castillo M. A, Montes R. y Hernández E. (2006). Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.
- Cheli, F., Battaglia, D., Gallo, R., y Dell'Orto, V. (2014). EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 37, 315-325.
- Costamagna, D.A., Gaggiotti, Ma. del C., Michlig, N., Chiericatti, C. y Signorini, M. (2018). Presencia de multitoxinas fúngicas en alimentos para ganado bovino de la cuenca lechera central de Argentina. *Comunicación.1. 2018. Revista argentina de producción animal VOL 38 SUPL. 1: 313-384.*
- Creppy, E.E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Tox Lett* 127:19–28.
- De Boevre, M., Di Mavungu, J.D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., ... y De Saeger, S. (2012). Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. *World Mycotoxin Journal*, 5 (3), 207–219. doi:10.3920/WMJ2012.1410

- De Koe, W. J. y Juodeikiene, G. (2012). Mycotoxin contamination of wheat, flour and bread. In *Breadmaking* (pp. 614-658). Woodhead Publishing. doi:10.1533/9780857095695.3.614
- De Vries, J.W., Trucksess, M.W. y Jackson, L.S. (2002). *Mycotoxins and Food Safety (Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol.504)*. Kluwer Academic-Plenum Publishers. New York.
- Díaz, GJ. (1996). Micotoxinas y micotoxicosis en salud humana y animal. *Veterinaria al Día*, Primera parte 2 (1): 28 - 34.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2012). *InfoStat version 2012*. InfoStat group, FCA, Cordoba National University, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Duarte, S. C., Pena, A. y Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27 (2), 187–198. doi:10.1016/j.fm.2009.11.016
- EC, 2006. European committee standard mycotoxin in food. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R0401-20140701>.
- Farnworth, E.R. y Trenholm H.L. (1981). The effect of acute administration of the mycotoxin zearalenone to female pigs. *J Environ Sci Health B.*; 16: 239-52.
- Franco, L.T., Petta, T., Rottinghaus, G.E., Bordin, K., Gomes, G.A. y Oliveira, C.A.F. (2019). Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from smallscale farms in Brazil: A pilot study. *Mycotoxin Research*, 35, 65–73.

- Gaggiotti, M. del. C., Chiericatti, C. Basílico, J.C. y Romero, L. (2014). Relevamiento de micotoxinas en alimentos para bovinos. 37° Congreso Argentino de Producción Animal, 2nd Joint Meeting ASAS-AAPA, XXXIX Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Buenos Aires, Argentina, 20 al 22 de octubre del 2014. Revista Argentina de Producción Animal. Volumen 34/2014/supl. 1 ISSN 2362-342X versión informática, Secciones-NA-NA76.
- Garrido, C. E., Pezzani, C. H., y Pacin, A. (2012). Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control*, 25(2), 660-665.
- Gonzalez, H. H. L. (1995). Estudio de la distribución de la microflora contaminante de maíz recién cosechador: riesgo potencial de aparición de micotoxinas en la Región Maicera Argentina (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- González, H. H. L., Pacin, A., Resnik, S. L., y Martínez, E. J. (1996). Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia*, 135(2), 129-134.
- Hinoshita, F., Suzuki, Y., Yokoyama, K., Hara, S., Yamada, A., Ogura, Y., ... y Ueno, Y. (1997). Experimental IgA nephropathy induced by a low-dose environmental mycotoxin, nivalenol. *Nephron*, 75(4), 469-478.
- Hussein, H.S. y Brasel, J.M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol* 167:101–34.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993). Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, IARC, Lyon, pp. 445–66.

- Jelinek, C.F., Pohland, A.E. y Wood, G.E. (1989). Review of Mycotoxin Contamination Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feed – An Update. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72 (2): 223 – 230.
- Kamika, I. y Takoy, L.L. (2011). Natural occurrence of aflatoxin B1 in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Food Control*, 22, 1760–1764.
- Kamika, I. y Tekere, M. (2016). Occurrence of aflatoxin contamination in maize throughout the supply chain in the Democratic Republic of Congo. *Food Control*, 69, 292-296.
- Khaneghah, A. M., Fakhri, Y., Raeisi, S., Armoon, B., y Sant'Ana, A. S. (2018). Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. *Food and chemical toxicology*, 118, 830-848.
- Khaneghah, A. M., Martins, L. M., von Hertwig, A. M., Bertoldo, R., y Sant'Ana, A. S. (2018). Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 13-24.
- Knasmüller, S., Bresgen, N., Kassie, F., Mersch-Sundermann, V., Gelderblom, W., Zöhrer, E., y Eckl, P. M. (1997). Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B1, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 391(1-2), 39-48.
- Krogh, P. (1978). Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Path. et Microb. Scandinavica, Sec. A*, (Suppl. 269).
- Magan, N. y Aldred, D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 131–139.

- Majeed, M., Khaneghah, A.M., Kadmi, Y., Khan, M.U. y Shariati, M.A. (2018). Assessment of Ochratoxin A in commercial corn and wheat products. *Current Nutrition & Food Science*, 14 (2), 116–120. doi:10.2174/1573401313666170330155823
- Martínez-Larrañaga, M. R., y Navarro, A. A. (2006). Micotoxinas. In *Toxicología alimentaria* (pp. 289-308). Díaz de Santos.
- Mashinini, K., y Dutton, M. F. (2006). The incidence of fungi and mycotoxins in South Africa wheat and wheat-based products. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41(3), 285-296.
- Mousavi Khaneghah, A., D Chaves, R. y Akbarirad, H. (2017). Detoxification of aflatoxin M1 (AFM1) in dairy base beverages (acidophilus milk) by using different types of lactic acid bacteria-mini review. *Current Nutrition & Food Science*, 13 (2), 78–81.
- Nichea, M. J., Palacios, S. A., Chiacchiera, S. M., Sulyok, M., Krska, R., Chulze, S. N., ... y Ramirez, M. L. (2015). Presence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in native grasses from a wetland ecosystem in Argentina intended for grazing cattle. *Toxins*, 7(8), 3309-3329.
- Numanoglu, E., Uygun, U., Koxsel, H. y Solfrizzo, M. (2010). Stability of Fusarium toxins during traditional Turkish maize bread production. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* 2(2):84–92.
- Oteiza, J.M., Khaneghah, A.M., Campagnollo, F.B., Granato, D., Mahmoudi, M.R., Sant'Ana, A.S. y Gianuzzi, L. (2017). Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *LWT Food Science Technology*, 80, 200–207. doi:10.1016/j.lwt.2017.02.025

- Pacin, A., Bovier, E. C., Cano, G., Taglieri, D. y Pezzani, C. H. (2010). Effect of the bread making process on wheat flour contaminated by deoxynivalenol and exposure estimate. *Food Control*, 21(4), 492-495.
- Palmgren, M.S. y Hayes, A.W. (1987). Aflatoxins in Food. *Mycotoxins in Food*. Cap 4: 65 – 94.
- Palumbo, R., Crisci, A., Venâncio, A., Cortiñas Abrahantes, J., Dorne, J. L., Battilani, P., y Toscano, P. (2020). Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in cereal-based feed and food. *Microorganisms*, 8(1), 74.
- Paster, N. y Bullerman, L.B. (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food Microbiology*, 7 (3), 257– 265. doi:10.1016/0168-1605(88)90044-X
- Peralta Sanhueza, C. E. (1997). Estrategias de control de la contaminación del Maíz por micotoxinas de *Fusarium*. Situación actual en la Argentina (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Pereira, V., Fernandes, J. y Cunha, S. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: a review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96–136. doi:10.1016/j.tifs.2014.01.005
- Pinotti, L., Ottoboni, M., Giromini, C., Dell'Orto, V. y Cheli, F. (2016). Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal byproducts. *Toxins*, 8 (2), 45. doi:10.3390/toxins8020045
- Quiroga, N., Resnik, S., Pacin, A., Martínez, E., Pagano, A., Riccobene, I., y Neira, S. (1995). Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Argentine wheat. *Food control*, 6(4), 201-204.

- Ravelo Abreu¹ A., Rubio Armendáriz C., Gutiérrez Fernández A.J. and Hardisson de la Torre A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión, *Nutr Hosp.* 26:1215-1226.
- Reyneri, A. (2006). The role of climatic condition on micotoxin production in cereal. *Veterinary research communications*, 30, 87.
- Rojas, L., y Wilches, A. M. (2011). Coexistencia de aflatoxinas, zearalenona y deoxinivalenol en alimentos de consumo infantil. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1)
- Sauer, D.B. (1988). Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity, germination. *International Journal of Food Microbiology*, 7 (3), 267–275. doi:10.1016/0168-1605(88)90045-1
- Škrbić, B., Živančev, J., Đurišić-Mladenović, N., y Godula, M. (2012). Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. *Food Control*, 25(1), 389-396.
- Turner, P.C., Rothwell, J.A., White, K.L., Gong, Y., Cade, J.E. y Wild, C.P. (2008) Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom, *Environ Health Perspect* 116:21–5.
- Viridis, S., Scarano, C., Corgiolu, G., Cossu, F., Spanu, V. y De Santis, E.P.L. (2009). Aflatoxin M1 in bulk-tank raw milk produced in a low risk area. *Internet Journal of Toxicology* 6 (1) (Internet Scientific Publications).
- Wangikar P.B., Dwivedi P., Sinha N., Sharma A.K. y Telang A.G. (2005) Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food Chem Toxicol* 3(4):607–15.

Wentz, I, Silveira, PRS, Sobestiansky, J, Dos Santos, CRM. and Rees, U. (1981). Fusariotoxicose e Estrogenismo em Suínos. EMBRAPA. Comunicado Técnico (24): 1 – 3.

Williams J.H., Phillips D.T., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M. y Aggarwal D. (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and intervention. *Am J Clin Nutr* 80(5):1106–22.

Who-IARC (1982) Environmental carcinogens: Selected methods of analysis. Vol. 5: Some mycotoxins. Herausgegeben Von H., Egan, L., Stoloff M., Castegnaro P., Scott I.K.O. Neill *et al.* Who-IARC Scientific Publications No. 44. 455 pp. International Agency of Research on Cancer, Lyon.

8. Anexos

Anexo Tabla 1- *Productos alimenticios y lugar de compra*

Identificación de laboratorio	Producto	Marca	Presentación	Alimento a base de	Lugar donde se adquirió
LF/2020/14	Copos de maíz para desayuno	x	AG	MAÍZ	Dietética
LF/2020/15	Copos de maíz para desayuno	x	AG	MAÍZ	Dietética
LF/2020/16	Copos de maíz para desayuno	x	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/17	Copos de maíz para desayuno	Granix	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/18	Tutuca de maíz	x	AG	MAÍZ	Dietética
LF/2020/19	Tutuca de maíz	x	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/20	Maíz pisingallo	x	AG	MAÍZ	Dietética
LF/2020/21	Maíz pisingallo	Ecosan	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/22	Maíz Pisado Blanco	Ecosan	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/23	Harina de maíz	x	AG	MAÍZ	Dietética
LF/2020/24	Harina de maíz	Arcor	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/25	Harina de maíz	Morixe	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/26	Palitos de maíz	Guadalupe	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/28	Palitos de maíz	Krachitos	EO	MAÍZ	Supermercado
LF/2020/29	Tutuca de trigo	x	AG	TRIGO	Dietética
LF/2020/30	Tutuca de trigo	x	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/31	Harina Integral de trigo	x	AG	TRIGO	Dietética
LF/2020/32	Harina Integral de trigo	x	AG	TRIGO	Dietética
LF/2020/33	Harina de trigo 0000	Cúspide	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/34	Fideos secos al huevo	Sana Pasta	EO	TRIGO	Dietética
LF/2020/35	Fideos secos al huevo	Dietética Integral	EO	TRIGO	Dietética
LF/2020/36	Pasta seca de sémola	Mulini	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/37	Bizcochos	x	EO	TRIGO	Dietética
LF/2020/38	Bizcochos	Tía Maruca	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/39	Galletitas de salvado	Hogareñas (Arcor)	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/40	Galletas saladas	Paseo	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/41	Galletitas de salvado	Serranas	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/42	Galletitas	Granix	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/43	Grisines	Ceral	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/44	Grisines	Veneziana	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/45	Tostadas	Caricias	EO	TRIGO	Supermercado
LF/2020/46	Discos de Arroz Integral con sal	Fisbix	EO	ARROZ	Dietética
LF/2020/49	Tostadas de arroz	Molinos Ala	EO	ARROZ	Supermercado
LF/2020/51	Barritas de arroz	Crowie	EO	ARROZ	Supermercado
LF/2020/52	Arroz yamaní inflado	x	AG	ARROZ	Dietética
LF/2020/53	Arroz inflado	x	EO	ARROZ	Supermercado
LF/2020/54	Arroz Integral	x	AG	ARROZ	Dietética
LF/2020/55	Arroz largo fino	Molinos Ala	EO	ARROZ	Supermercado
LF/2020/56	Arroz largo fino	Lucchetti	EO	ARROZ	Supermercado
LF/2020/57	Harina de arroz	x	AG	ARROZ	Dietética
LF/2020/58	Fideos de arroz (con gorgojos)	Fu Sheng	EO	ARROZ	Dietética
LF/2020/59	Fideos de arroz	Soyarroz	EO	ARROZ	Dietética
LF/2020/61	Pastas de harina de arroz	Coditos	EO	ARROZ	Supermercado

