

Tesis de Posgrado

Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de almacenamiento sobre la producción de aflatoxinas en maíz, sorgo y girasol

Montani, Mónica

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Montani, Mónica. (1991). Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de almacenamiento sobre la producción de aflatoxinas en maíz, sorgo y girasol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2462_Montani.pdf

Cita tipo Chicago:

Montani, Mónica. "Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de almacenamiento sobre la producción de aflatoxinas en maíz, sorgo y girasol". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2462_Montani.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**“Influencia de la actividad acuosa y el tiempo
de almacenamiento sobre la producción de aflatoxinas
en maíz, sorgo y girasol”**

MÓNICA MONTANI

Director Tesis:
Dra. Graciela Vaamonde

Tesis
2462
y 2

Tesis presentada para optar al título de: **Doctor en Ciencias Químicas**

A la memoria de mi padre.

Agradecimientos.

A la Dra. Graciela Vaamonde por su valiosa guía, constante presencia y dedicación volcada en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Silvia Resnik por su valioso aporte profesional y por sus consejos y apoyo en los momentos más críticos.

A Merck Química Argentina por la donación de drogas y medios de cultivo.

A la Fundación Cargill por su apoyo económico.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme becas durante las cuales realicé esta tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires) por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A la Lic. Elena Martínez por su importante y cálida colaboración en el análisis estadístico de los datos.

A Leticia Scoccia por sus sugerencias e incondicional dedicación en la edición de la tesis.

A la Sra. Marta Errecarte por su cuidadosa dedicación en la limpieza del material y su amistad.

Al Lic. Guillermo Seniuk por su colaboración en algunas determinaciones.

A mis compañeros y amigos del área de Bromatología del Departamento de Química Orgánica.

A mi familia por su tolerancia y apoyo, en particular a Fernando.

A la Dra. Rosa Feldman.

Mónica Montani.

Índice

I. Introducción	1
I.1. Las micotoxinas como metabolitos secundarios de hongos	1
I.2. Factores que influyen sobre la producción de micotoxinas	8
I.3. Análisis de los factores que condicionan la acumulación de aflatoxinas durante el almacenamiento	13
I.3.a. <i>Microorganismos productores de aflatoxinas</i>	15
I.3.b. <i>Influencia de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de aflatoxinas</i>	16
I.3.c. <i>Influencia de la actividad acuosa y su interacción con otros factores que regulan la biosíntesis de aflatoxinas</i>	19
I.3.d. <i>Influencia del sustrato</i>	25
I.4. Objetivos	29
II. Materiales y Métodos	30
II.1. Sustratos	30
II.2. Acondicionamiento de los granos	30
II.2.a. <i>Selección</i>	30
II.2.b. <i>Desinfección</i>	30
II.2.c. <i>Secado</i>	30
II.3. Determinación de la actividad acuosa	31
II.4. Preparación del inóculo	32
II.5. Inoculación	32
II.6. Incubación	32
II.7. Determinación de la concentración de las soluciones patrones de aflatoxinas	33
II.7.a. <i>Calibración del equipo</i>	33
II.7.b. <i>Cuantificación de las soluciones patrones de aflatoxinas</i>	35
II.8. Método de análisis de aflatoxinas	37
III. Resultados y Discusión	39
III.1. <i>Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en sorgo</i>	39
III.2. <i>Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en maíz</i>	44
III.3. <i>Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en girasol</i>	49
III.4. <i>Definición de los parámetros cinéticos para el estudio de la acumulación de aflatoxinas</i>	55
III.5. <i>Influencia de la actividad acuosa sobre los parámetros cinéticos en sorgo</i>	59
III.6. <i>Influencia de la actividad acuosa sobre los parámetros cinéticos en maíz</i>	59
III.7. <i>Influencia de la actividad acuosa sobre los parámetros cinéticos en girasol</i>	64
III.8. <i>Comparación de los parámetros cinéticos de acumulación de aflatoxinas totales en girasol, maíz y sorgo</i>	64
III.9. <i>Comparación entre girasol, maíz y sorgo de las acumulaciones máximas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂</i>	75

III.10. Relaciones entre las acumulaciones máximas de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂ para los distintos materiales	75
IV. Conclusiones	85
V. Tablas de Datos	87
VI. Bibliografía	94

I. Introducción

I.1. Las micotoxinas como metabolitos secundarios de hongos

Entre los microorganismos que tienen importancia económica para el hombre, los hongos filamentosos se caracterizan por su habilidad para producir una gran diversidad de metabolitos secundarios. A diferencia de los metabolitos primarios, que son esenciales para el funcionamiento de las vías metabólicas, los denominados metabolitos secundarios no tienen aparentemente un rol bioquímico definido, si bien algunos de ellos están indudablemente implicados en la competencia microbiana.

Muchas de estas sustancias producidas por los mohos han ofrecido importantes beneficios económicos al hombre. Cabe citar entre ellas a algunas vitaminas, como la riboflavina y la vitamina B₁₂ y otras sustancias como los alcoholes, cetonas y sus derivados químicos de importancia industrial.

Seguramente, la más estridente explosión de los metabolitos secundarios fúngicos ha sido la producción comercial de antibióticos en el campo médico y veterinario, iniciada a fines de la década del veinte con el trabajo de Sir Alexander Fleming en el "St. Mary's Hospital". A raíz de su observación de que el crecimiento bacteriano se inhibía alrededor de una colonia del hongo que accidentalmente había contaminado las placas de agar (*Penicillium notatum*), se descubrió el primer antibiótico, la penicilina. La continuación de esos estudios años más tarde por Chain, que logró obtenerla en estado puro y su aplicación clínica por Florey, impulsaron las investigaciones tendientes a la búsqueda de nuevos antibióticos (von Zahn y Rheinholz, 1980).

Para poder ser utilizadas con fines terapéuticos estas sustancias deben poseer una alta toxicidad para las bacterias y ser relativamente inocuas para los seres humanos y los animales. Así, muchos metabolitos fúngicos prometedores como antibióticos, demostraron ser extremadamente tóxicos para animales y dejaron de ser considerados como antibióticos, siendo reclasificados como micotoxinas. Tal es el caso del ácido aspergílico, la gliotoxina y la citrinina. Se fue perfilando de esta manera una nueva rama de la ciencia, actualmente conocida como micotoxicología, que cobró notable impulso a partir de 1960.

En esa época, la muerte de miles de pavos en Inglaterra causada por el consumo de alimentos a base de maní proveniente de Brasil, tuvo tal implicancia económica que motivó la iniciación de investigaciones en varios países. Este síndrome se denominó inicialmente "enfermedad X de los pavos". Pronto se supo que el alimento contaminado contenía un potente agente hepatocancerígeno, metabolito secundario producido por *Aspergillus flavus* que fue denominado aflatoxina (Allcroft y Carnaghan, 1963 a, Sargeant y col. 1963). Se

demostró por cromatografía planar que estaba formada por cuatro componentes, aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) y G₂ (AFG₂), relacionadas químicamente según se observa en la figura I.1. La AFB₂ es el derivado hidrogenado de la AFB₁ y la AFG₂ es el correspondiente derivado de la AFG₁.

Allcroft y Carnaghan (1963 b), encontraron otros factores tóxicos en la leche de vacas que habían sido alimentadas con dietas que contenían AFB₁ y AFB₂. Estas dos nuevas aflatoxinas fueron denominadas AFM₁ y AFM₂ (figura I.1). Estos y otros compuestos relacionados fueron aislados de cultivos de *A. flavus* obtenidos en el laboratorio. La carcinogenicidad de varios de estos metabolitos está asociada con la alta reactividad química de la doble unión en el grupo dihidrofurano de la molécula de la aflatoxina. El anillo difurano está presente también en otras micotoxinas descubiertas con posterioridad, por ejemplo las versicolorinas y la esterigmatocistina (figura I.2), también producidas por *A. flavus*, precursores biosintéticos de la AFB₁, y las más recientes descubiertas autocistinas, producidas por *A. ustus*, y derivadas de un compuesto (figura I.2) conocido como esterigmatina (Heathcote, 1984).

Varios grupos importantes de micotoxinas producidos por diferentes tipos de mohos fueron caracterizados luego del descubrimiento de las aflatoxinas.

Las ocratoxinas (figura I.3), que ejercen su efecto en el riñón, son producidas por diversas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.

Los tricotecenos (figura I.4), son otro grupo de compuestos químicamente relacionados, producidos principalmente por especies de *Fusarium*, asociados con intoxicaciones humanas y animales (micotoxicosis) en diferentes regiones del mundo. Constituyen una familia de compuestos con estructura de sesquiterpenos caracterizados por un grupo epoxi entre C₁₂ y C₁₃.

Otras especies de *Fusarium* producen zearalenona (figura I.5), una toxina con efectos estrogénicos en seres humanos y animales.

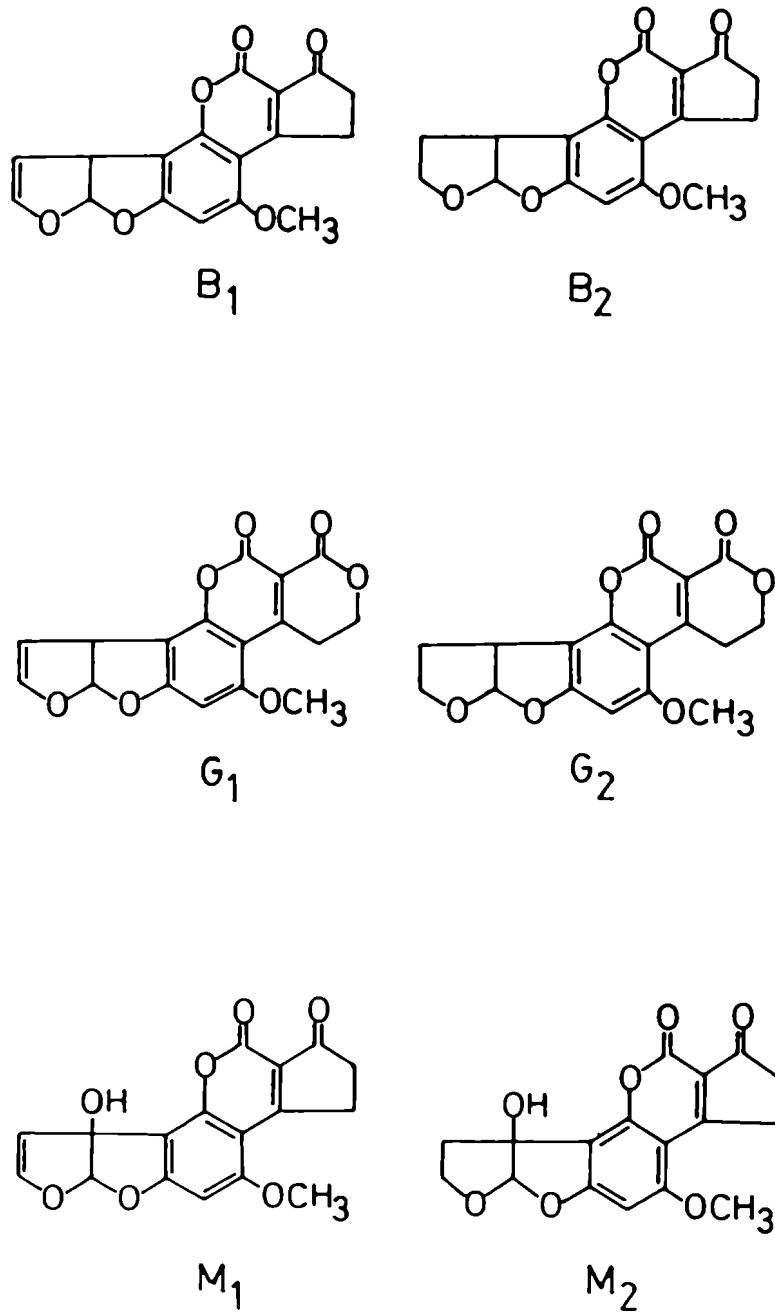
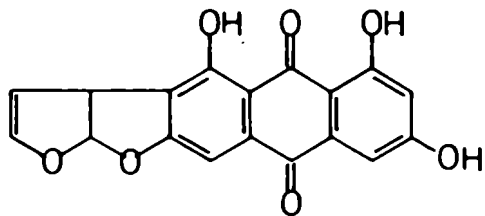
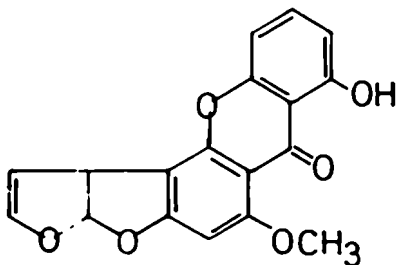


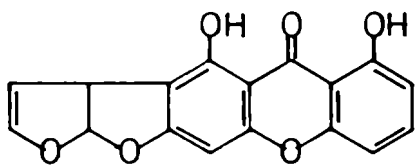
FIGURA I1: Estructura química de las aflatoxinas



Versicolorina A

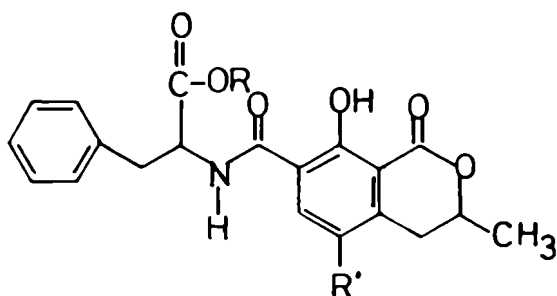


Esterigmatocistina



Esterigmatina

FIGURA I2: Micotoxinas con anillo difurano

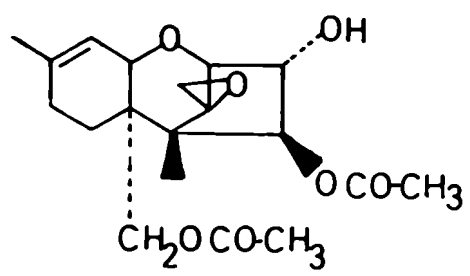


Ocratoxina A: $R=H, R'=Cl$

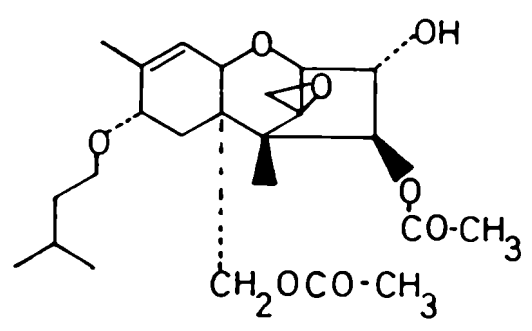
Ocratoxina B: $R=H, R'=H$

Ocratoxina C: $R=C_2H_5, R'=Cl$

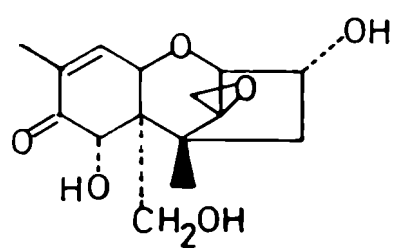
FIGURA I3: Estructura de las ocratoxinas



Diacetoxiscirpenol
(DAS)

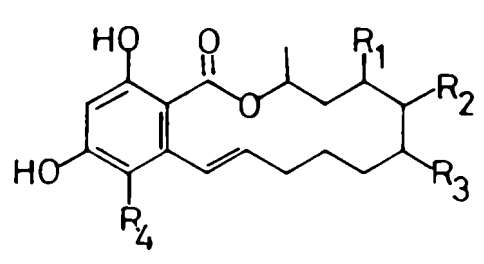


T-2



Deoxinivalenol
(vomitoxina)

FIGURA I4: Estructura de los tricotecenos



	R_1	R_2	R_3	R_4
Zearalenona	H_2	H_2	$=O$	H
Zearalenol	H_2	H_2	OH	H

FIGURA I5: Estructura de la zearalenona

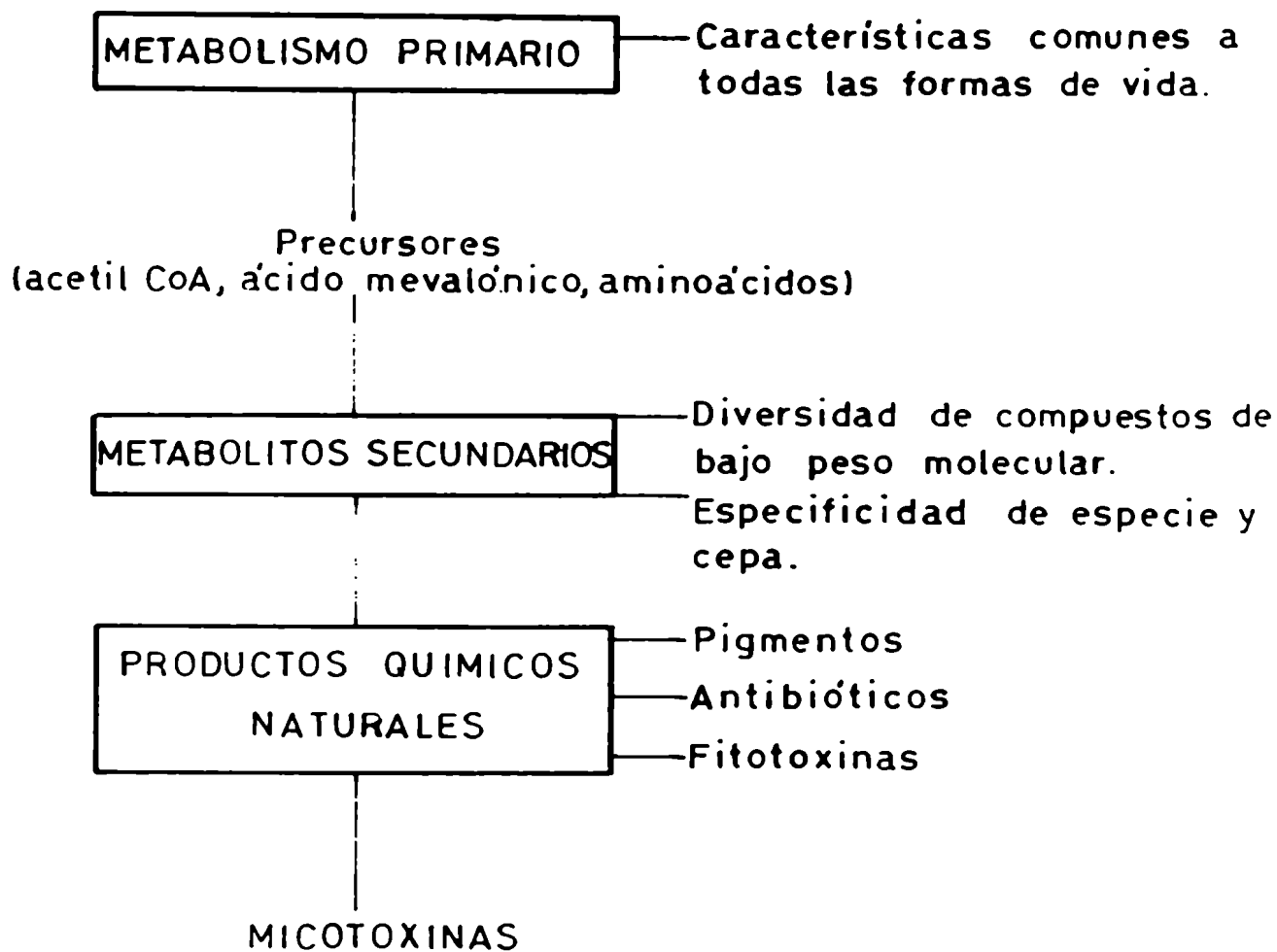


FIGURA I6: Algunas características de los metabolitos secundarios.

Aunque las micotoxinas presentan estructuras químicas muy diversas y una amplia gama de efectos biológicos, todas ellas, por ser metabolitos secundarios de hongos, comparten ciertas características que se esquematizan en la figura I.6.

A pesar de su diversidad química, la biosíntesis de los metabolitos secundarios involucra a un número relativamente pequeño de precursores derivados de los intermediarios del metabolismo primario (Steyn, 1980).

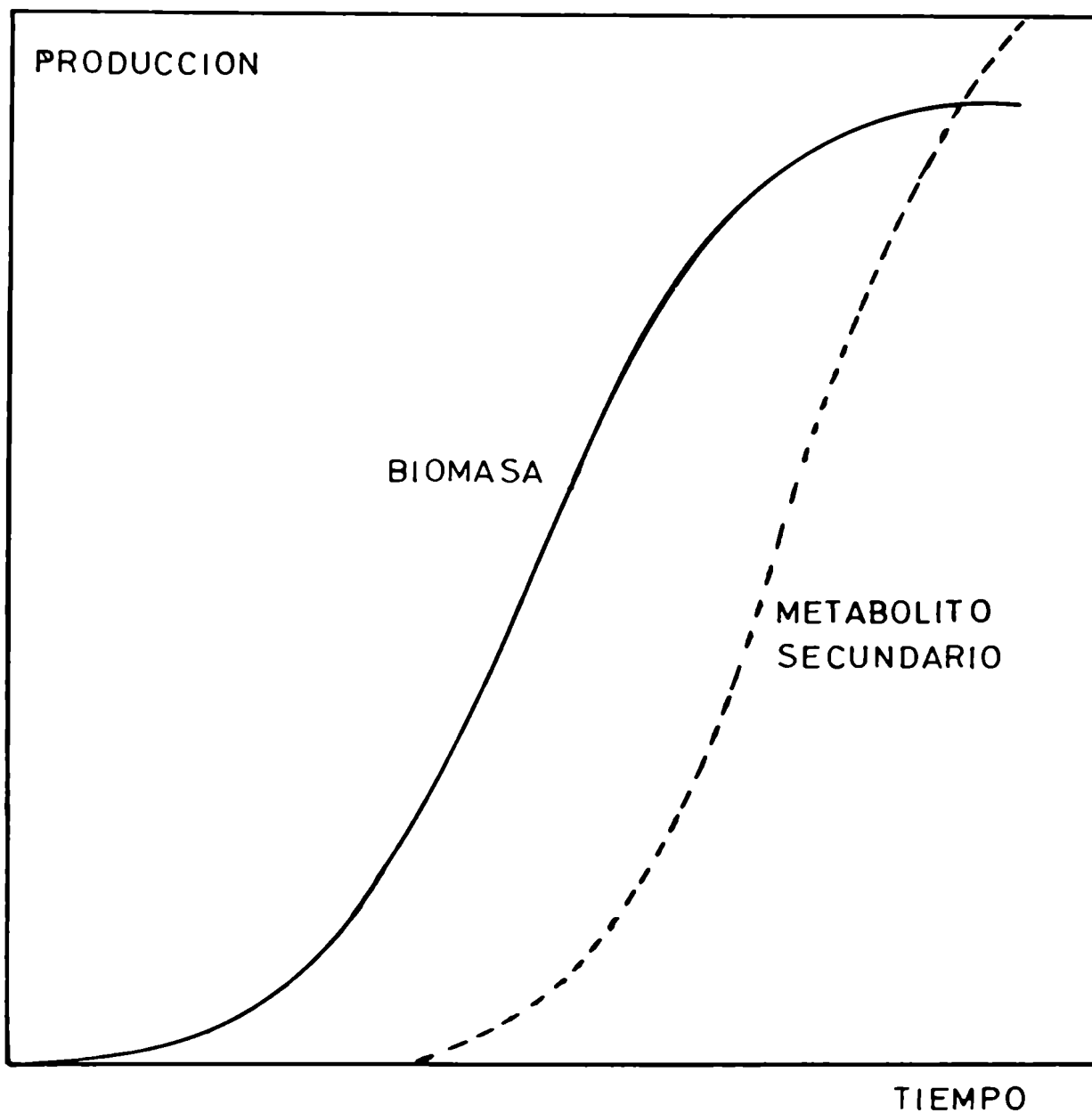


FIGURA I.7: Relación temporal entre la formación de metabolitos secundarios y el crecimiento activo.

En cultivos de laboratorio se puede observar que la biosíntesis de un metabolito secundario ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento, y que prácticamente no es sintetizado durante la fase de crecimiento activo (figura I.7).

Sin embargo, este no es un modelo adecuado para explicar el comportamiento observado en la naturaleza. En estas condiciones, existe una interacción mucho más compleja entre el hongo y el sustrato, ya sea que esté en un cultivo en el campo, en granos almacenados u otro tipo de alimento. La forma filamentosa de los hongos está adaptada a crecer tanto sobre el sustrato como a través del mismo por extensión del extremo de la hifa. El micelio es capaz de degradar las macromoléculas del sustrato y de absorber los productos, utilizándolos para su crecimiento. La hifa es una estructura espacialmente polarizada y, sobre un sustrato sólido, partes del micelio pueden alcanzar el estadio fisiológico de la fase estacionaria, sintetizando y excretando micotoxinas, mientras que otras partes del mismo micelio están creciendo activamente y colonizando nuevas porciones del sustrato. En cultivo líquido, la hifa también está polarizada pero el medio es relativamente homogéneo. En cambio, sobre un sustrato sólido, la región sobre la cual el hongo ha crecido es diferente a aquella que aún no ha sido colonizada (Moss, 1984).

Algunos aspectos del metabolismo secundario permanecen aún poco claros. Parece evidente que para que haya producción de micotoxinas antes debe tener lugar el crecimiento fúngico. Pero también se ha observado que las condiciones ambientales que previenen la producción de toxinas no son necesariamente las mismas que limitan el crecimiento del hongo. Si se desea evitar la presencia de estos metabolitos tóxicos en los alimentos destinados al hombre y a los animales, es preciso conocer los factores y condiciones que determinan la producción de micotoxinas ya sea en el campo o durante la etapa de almacenamiento de los productos susceptibles de contaminación.

I.2. Factores que influyen sobre la producción de micotoxinas

La producción de micotoxinas está condicionada tanto por el genotipo del microorganismo productor, como por el sustrato y el medio ambiente en el cual está creciendo.

Una característica de los metabolitos secundarios es que frecuentemente son específicos no sólo de especies sino también de cepas. Los distintos aislados de una misma especie fúngica pueden diferir en su capacidad toxicogénica así como en el tipo y cantidad de micotoxinas que producen.

Por ejemplo, de tres especies muy relacionadas de *Aspergillus*: *A. oryzae*, *A. flavus* y *A. parasiticus*, el primero de ellos no produce aflatoxinas y es ampliamente usado en la manufactura de ciertos alimentos orientales (koji), algunas cepas de *A. flavus* son toxicogénicas, produciendo generalmente AFB₁ y AFB₂, y *A. parasiticus* es usualmente toxicogénico y produce frecuentemente AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

En el género *Penicillium*, la mayoría de los productores de micotoxinas pertenecen

a la sección *Asymmetrica* (subgénero *Penicillium*, según Pitt, 1979). Frisvad (1981) ha demostrado que dentro de este subgénero se pueden distinguir cuatro grupos en base a características fisiológicas, semejantes a las que se aplican en bacteriología, que presentan buena correlación con la producción de determinadas micotoxinas. Es decir, puede ser utilizado como un criterio quimiotaxonómico adicional para la identificación de especies dentro de este subgénero.

El género *Fusarium* comprende también numerosas especies productoras de micotoxinas, que difieren en su potencial toxicogénico. Así por ejemplo *F. tricinctum* es raramente toxicogénico, *F. poae* lo es en algunos casos y *F. sporotrichioides* es casi siempre fuertemente toxicogénico (Moss, 1984).

Hay algunas micotoxinas que son producidas por una amplia diversidad de especies fúngicas, por ejemplo la patulina que es producida por varias especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Byssochlamys*. Por otra parte, hay ciertas especies de hongos capaces de producir varias micotoxinas, por ejemplo *P. roqueforti* que puede producir PR-toxina, roquefortina e isofumiclavacina A o *P. viridicatum*, capaz de producir simultáneamente ocratoxina y citrinina.

Aún cuando una cepa fúngica tenga el potencial genético para producir una micotoxina, el nivel producido dependerá de los nutrientes disponibles en el sustrato. La incidencia de aflatoxinas en maíz, arroz o semillas de algodón es mayor que en sorgo y soja (Smith y Moss, 1985). Lo mismo ocurre con zearalenona, para la cual uno de los mejores sustratos es el arroz, en tanto que su incidencia es baja en cebada, avena y soja (Eugenio y col., 1970).

La presencia de ciertos nutrientes, por ejemplo Zn es esencial para la biosíntesis de aflatoxinas. Posiblemente estimule la glicólisis durante la fase estacionaria, asegurando la producción de suficiente CoA para que tenga lugar la biosíntesis que se realiza por la vía de los policétidos (Smith y Moss, 1985).

Aún cuando el microorganismo disponga de todos los requerimientos nutricionales, su crecimiento y la biosíntesis de micotoxinas se verán notoriamente afectados por los parámetros ambientales, entre los cuales los más importantes son la temperatura y la actividad de agua (a_w). Estos parámetros interactúan y en general, a valores subóptimos de uno de ellos, se reduce el rango del otro parámetro dentro del cual el hongo puede crecer y producir toxinas.

Cuando varias toxinas son producidas por la misma cepa, la temperatura puede influir sobre las cantidades relativas de las mismas. Una cepa de *Fusarium graminearum* estudiada por Greenhalgh y col. (1983) tenía una temperatura óptima para la producción de zearalenona a 25 ° C, mientras que para deoxinivalenol era por lo menos 28 ° C.

Al estudiar la influencia de la temperatura sobre el crecimiento del *Penicillium citrinum* y la producción de citrinina en agar Czapek suplementado con extracto de maíz (Montani y col., 1988 c) observaron que 30 °C es la temperatura de máxima velocidad de crecimiento así como de acumulación de citrinina.

El efecto combinado de a_w y temperatura muestra que las condiciones para la producción de las micotoxinas son en general más restringidas que aquellas que permiten el crecimiento del hongo. En la figura I.8 se esquematizan las condiciones de a_w y temperatura para el crecimiento y la producción de micotoxinas para varias cepas productoras de patulina, ácido penicílico y ocratoxina A (Northolt y Bullerman, 1982).

Otra observación general es que existe una marcada interacción entre la actividad de agua limitante y la temperatura tal como se ilustra con los siguientes datos obtenidos para la biosíntesis de patulina y el crecimiento de *Byssochlamys nivea* en jugo de manzana (Roland y Beuchat, 1984).

TABLA I.1
Influencia de la temperatura y la a_w sobre el crecimiento y la producción de patulina por *Byssochlamys nivea*.

	Mínima a_w a		
TEMPERATURA	21 °C	30 °C	37 °C
CRECIMIENTO	0.915	0.886	0.871
PRODUCCIÓN	0.978	0.968	0.959

El efecto combinado de la temperatura y la a_w sobre la producción de zearalenona por *Fusarium graminearum* fue observado también en maíz según se ilustra en la siguiente tabla (Montani y col., 1988 a):

TABLA I.2
Influencia de la temperatura y la a_w sobre la producción de zearalenona por *Fusarium graminearum* en maíz.

TEMPERATURA	15 °C	25 °C + 15 °C*	25 °C
MÍNIMA a_w	0.97	0.95	0.90-0.95

* Se refiere a dos semanas a 25 °C seguidas de ocho semanas a 15 °C.

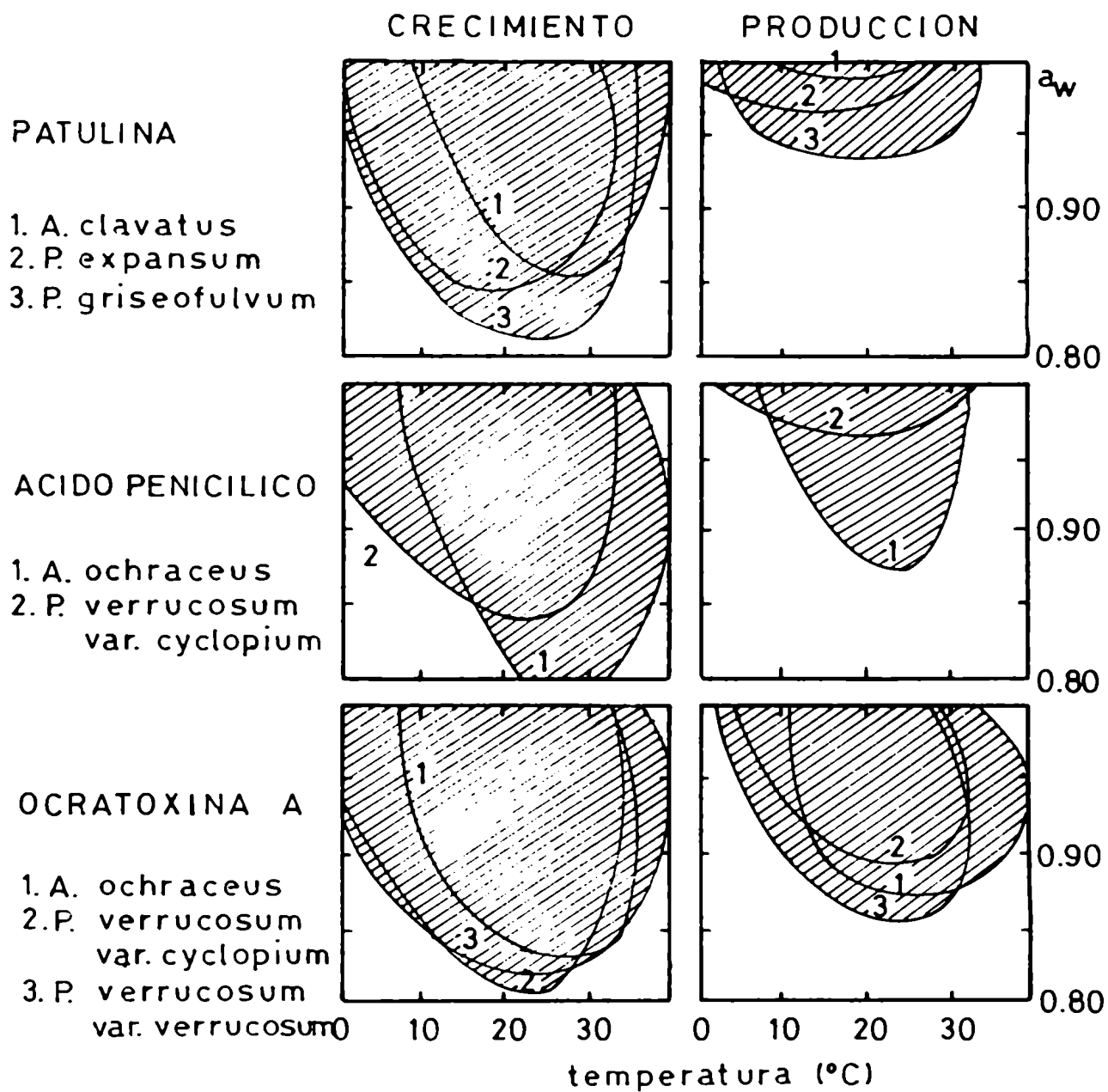


FIGURA 18: Condiciones de a_w y temperatura favorable (área sombreada) para el crecimiento y producción de diferentes especies fúngicas.

Los datos referidos a valores óptimos y limitantes de temperaturas y a_w no han sido aún evaluados para todas las micotoxinas de importancia ni para todos los alimentos.

Es difícil comparar resultados provenientes de diferentes laboratorios, ya que varían las condiciones de cultivo (luz, oxígeno, pH) así como los procedimientos analíticos. En condiciones naturales, existe además la interacción de factores biológicos muy importantes, que pueden influir sobre el crecimiento del hongo y su metabolismo.

Es importante tener en cuenta que:

*** Generalmente se produce el crecimiento competitivo de varias especies de mohos que conducen a la formación de diferentes micotoxinas.**

La presencia de dos o más especies de hongos puede reprimir o aumentar la biosíntesis de una micotoxina. Se ha demostrado que el *Penicillium purpurogenum* que produce rubratoxina puede favorecer la formación de aflatoxina por *A. parasiticus* (Moss y Badii, 1982).

Por otra parte, la presencia simultánea de varias micotoxinas producidas por las diferentes especies de hongos contaminantes puede conducir a una acción sinérgica en su toxicidad, tal como se ha demostrado para ciertos pares de toxinas como ácido penicílico / ocratoxina y aflatoxina / toxina T₂ (Moss, 1984).

*** Las micotoxinas pueden ser producidas tanto en el campo como en productos almacenados, en condiciones ecológicamente diferentes.**

La contaminación de productos tales como maní y maíz antes de la cosecha puede ocurrir en granos aparentemente sanos, como consecuencia de la producción de micelio proveniente de las esporas que infectan las superficies específicamente receptivas de los estigmas en la etapa de floración. Sin embargo, el daño por insectos suele ser la principal ruta de contaminación en esta etapa.

Muchos son los factores que interactúan en la formación de micotoxinas en el campo. La temperatura del suelo es muy importante para la formación de aflatoxinas en maíz; situaciones de stress, por ejemplo la sequía, predisponen a la planta a la infección por hongos toxicogénicos.

El genoma de la planta también puede jugar un rol importante y es posible obtener híbridos o variedades con mayor resistencia a la contaminación (Mixon, 1977; Zuber, 1977).

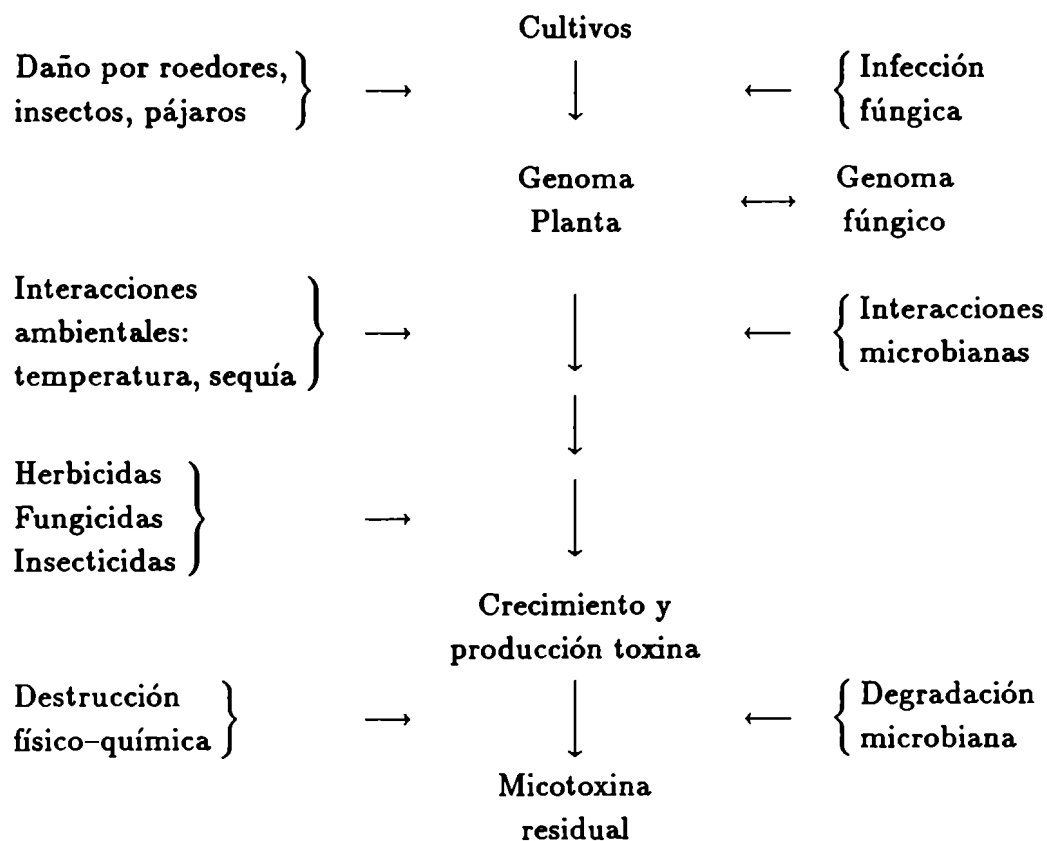
*** La agricultura moderna conduce a la aplicación de un amplio rango de biocidas, incluyendo insecticidas, herbicidas y fungicidas.**

Se ha comprobado que algunos biocidas pueden inhibir la formación de aflatoxinas mientras que otros pueden incrementarla al menos en estudios de laboratorio. Los ácidos

propiónico y fórmico, usados para controlar el crecimiento de hongos en productos almacenados, pueden favorecer la formación de aflatoxinas si se encuentran en concentraciones inadecuadas. El ácido sórbico, usado como agente antifúngico en alimentos, puede también aumentar la biosíntesis de micotoxinas tales como aflatoxinas y toxina T₂ (Gareis y col., 1984).

Semillas de girasol tratadas con fungicidas e insecticidas permitieron el desarrollo de mayor cantidad de AFB₁ que en el control (Etcheverry y col., 1987).

A través de todo lo expuesto hasta aquí, se comprende la necesidad de profundizar en el conocimiento de las complejas interacciones de todos los factores mencionados, conducentes a la contaminación de los alimentos y piensos con una o más micotoxinas, que se pueden resumir esquemáticamente de la siguiente forma:



I.3. Análisis de los factores que condicionan la acumulación de aflatoxinas durante el almacenamiento.

Las aflatoxinas son contaminantes de una gran diversidad de productos agrícolas en todo el mundo. Numerosos países han establecido normas referentes a los niveles aceptables en alimentos destinados al hombre y animales. Su presencia crea serios problemas

a los países que como el nuestro basan su economía en la exportación de su producción agropecuaria (Taller Conjunto FAO/OPS sobre Prevención y Control de Micotoxinas en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica, 23 de febrero de 1991).

Actualmente es ampliamente aceptado que el hongo productor de aflatoxinas, *A. flavus*, desarrolla en los granos tanto en el campo como luego de la cosecha. Por lo tanto, cuando se procura manejar el problema de contaminación con aflatoxinas deben considerarse las interacciones entre los aspectos relacionados con el campo y el almacenamiento. Al parecer, los mismos factores ambientales que afectan a los hongos en condiciones de almacenamiento influyen en diversos grados sobre los procesos de infección / contaminación en el campo (Sauer y Tuite, 1986).

El control de los factores ambientales en el almacenamiento es más factible que en el campo. El medio ambiente en el cual *A. flavus* y el sustrato interactúan es crítico y determina si tendrá lugar la contaminación con aflatoxinas. Las investigaciones efectuadas en el laboratorio identificaron como principales factores que afectan el desarrollo de las especies productoras de toxinas en el almacenamiento a la humedad, la temperatura, el inóculo y el tiempo.

Ya que el hongo parece degradar y sintetizar la toxina simultáneamente, pequeños cambios ambientales podrían variar dramáticamente los niveles finales de toxina. En el microambiente del sustrato almacenado, el establecimiento de una infección fúngica no solamente aumenta los niveles de humedad por formación de agua durante la respiración, sino también aumenta la temperatura, ya que el proceso es exotérmico (Lillehoj, 1983).

Posiblemente el mayor riesgo de crecimiento de hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas ocurrirá durante el almacenamiento inadecuado de productos agrícolas. En algunos casos, además, puede producirse la rehumectación de productos secados y almacenados. Tal situación puede ocurrir fácilmente debido al ingreso de agua por goteras del silo, o más comúnmente por condensación. Los granos de cereales son a menudo mezclados para reducir el nivel de humedad promedio. El almacenamiento de cereales depende no sólo del nivel de humedad promedio sino también del contenido de humedad en las semillas individuales. La inadecuada mezcla de unos pocos granos con contenido de humedad tal que puedan soportar el crecimiento fúngico pueden generar áreas de crecimiento activo en el material a granel (Smith y Moss, 1985).

La duración del almacenamiento es un factor importante cuando se considera la formación de micotoxinas. Cuanto mayor sea la retención en el silo de almacenamiento, mayor será la posibilidad de crear un medio ambiente con condiciones aptas para la proliferación de hongos toxicogénicos. La higiene de los silos rara vez se realiza pudiendo transcurrir meses o años sin limpieza de rutina (Smith y Moss, 1985).

La literatura ofrece interesantes datos en relación a la interacción de factores bióticos y abióticos que pueden contribuir a determinar la probable prevención de la acumulación de micotoxinas en los diferentes sustratos que son analizados en esta tesis para el caso particular de las aflatoxinas.

I.3.a. Microorganismos productores de aflatoxinas.

Posiblemente la micota que se encuentre en y sobre los granos sea el factor biológico más importante en cuanto a la posibilidad o no del crecimiento de *A. flavus* en un sustrato almacenado. La naturaleza y extensión de la contaminación con hongos toxicogénicos determinará la presencia o ausencia de micotoxinas en el producto. Si inicialmente está presente un pequeño inóculo del hongo productor, las posibilidades de desarrollo de las toxinas son reducidas (Sauer y Tuite, 1986).

Como ya se mencionó, las aflatoxinas son producidas por especies de hongos estrechamente relacionados entre sí, pertenecientes al género *Aspergillus*: *A. flavus* y *A. parasiticus*. Estos mohos están ampliamente distribuidos en los suelos de casi todo el mundo y son contaminantes comunes de gran diversidad de productos vegetales. Muchos autores se refieren a *A. flavus* como un grupo que incluye las dos especies. Los porcentajes de cepas toxicogénicas informados por diversos autores son variables, pero indican que la mayoría de los aislados son capaces de sintetizar uno o varios de estos metabolitos (Stoloff, 1977).

Fennel y col. (1973), observaron en sus investigaciones de poblaciones de *A. flavus* obtenidas de productos contaminados con toxinas, que cuando se preparaban cultivos monospóricos algunos carecían de la habilidad de producir toxina. En contraste, las cepas de *A. parasiticus* excepcionalmente fueron no-toxicogénicas. Una vez aislados en cultivos de laboratorio, las cepas de *A. flavus* pueden perder la capacidad de producir aflatoxinas, mientras que *A. parasiticus* es un productor más estable.

Bilgrami y col. (1988), observaron la pérdida del potencial toxicogénico de cuatro cepas de *A. flavus* debido a repetidos repiques (subcultivos). Estas observaciones indican una profunda diferencia en los determinantes genéticos en la producción de toxina entre estas dos especies muy relacionadas. El misterio de esta variación ha sido incrementado marcadamente debido a que los alimentos contaminados con aflatoxinas generalmente contienen AFB₁ y AFB₂ predominantemente.

Schmidt y col. (1983) demostraron la presencia de elementos extracromosomales incluyendo doble hélice de RNA, en una capa no toxicogénica de *A. flavus*. Cuando se trató con cicloheximida o emetina, estas cepas se convirtieron en productores de toxina. Por lo

tanto, los elementos genéticos que previenen la biosíntesis de aflatoxinas pueden estar presentes en la propia cepa de *A. flavus* y quizás no en un sustrato. Los esfuerzos están ahora orientados a transferir estos elementos genéticos a cepas toxicogénicas para determinar si ellos podrán prevenir la formación de aflatoxina por cepas normalmente toxicogénicas de estos hongos. Si estas investigaciones son exitosas, entonces podría transferirse el elemento genético inhibitorio a maíz vía fusión de protoplastos, creándose una resistencia a la invasión fúngica y producción de toxinas por los mejoradores genéticos.

Si bien las dos especies mencionadas han sido citadas como únicas productoras de aflatoxinas, últimamente se han descrito otras especies con capacidad aflatoxicogénica. Por ejemplo el *A. nomius* que es fenotípicamente similar al *A. flavus* y la separación se basa en la presencia de esclerocia indeterminada y de crecimiento a menor temperatura (Kurtzman y col., 1987). Otra cepa de la cual se han presentado evidencias de su capacidad para producir aflatoxinas es *A. ruber* que tiene implicancias en la higiene alimentaria, especialmente en países donde tales hongos son usados en la preparación de alimentos (Leitao y col., 1989).

I.3.b. Influencia de la temperatura y el tiempo de incubación sobre la producción de aflatoxinas.

A partir de la identificación del rol del *A. flavus* en la patogénesis de la “enfermedad X de los pavos”, una considerable cantidad de información ha sido reunida sobre las condiciones necesarias para el crecimiento y la producción de aflatoxinas por las dos especies reconocidas como productoras (*A. flavus* y *A. parasiticus*).

Sorenson y col. (1967) observaron el efecto de la temperatura en la producción de las aflatoxinas sobre arroz por *A. parasiticus* NRRL 2999. El rango óptimo de temperatura para la producción de AFB₁ y AFG₁ en las condiciones empleadas en el trabajo resultó ser 28° C a 32° C. A las temperaturas de 37° C y 11° C sólo se detectaron bajas concentraciones de AFB₁. A las temperaturas más bajas, por ejemplo 15° C, las concentraciones de AFB₁ y AFG₁ se incrementan constantemente en función del tiempo, en tanto que a 28° C y temperaturas superiores se observa que la concentración de AFG₁ decrece a medida que se incrementa el tiempo de incubación. Respecto de AFB₁, a 28° C y a 32° C se llega a un nivel en el que se mantiene constante y a 34° C y 37° C alcanza un máximo a los 5 y 3 días respectivamente. La disminución de las concentraciones se atribuye en el trabajo a la posible degradación de las toxinas por enzimas fúngicas que se activan a las temperaturas superiores. La concentración relativa de las toxinas se vió afectada tanto por la temperatura, como por el tiempo de incubación.

Schindler y col. (1967) estudiaron el efecto de la temperatura y el tiempo en la producción de aflatoxinas por dos cepas de *A. flavus* en agar mosto. La temperatura de máxima producción fue 24 °C y la óptima para el crecimiento correspondió al rango 29 a 35 °C. El crecimiento máximo no implicó máxima producción de aflatoxinas, y a ciertas temperaturas (41 °C) se observó un buen crecimiento sin producción de toxina. Ambas observaciones indicaron una diferencia en la inactivación enzimática para el crecimiento y la producción debida a la temperatura. Los autores también observaron que los cambios en la relación de AFB₁ a AFG₁ a ciertas temperaturas indicaban nuevamente la influencia de la temperatura sobre la biosíntesis de ambas toxinas.

Con respecto a la influencia del tiempo, observaron que a temperaturas menores de 18 °C y mayores de 35 °C no hubo producción en cinco días. Sin embargo cuando se extendían los períodos a doce semanas, la producción de aflatoxinas ocurría a temperaturas que inicialmente habían sido inhibitorias. Para una de las cepas la producción aumentó durante seis semanas, y al final del período la concentración resultante era menor. Estos resultados fueron de interés adicional ya que indicaron que las toxinas se metabolizaron luego de alcanzado el máximo. Supusieron los autores que hubo coincidencia entre el máximo de crecimiento y la iniciación de autólisis.

En relación a las temperaturas límites, van Walbeek y col. (1969) trabajaron con cinco cepas de *A. flavus* en medios de cultivo líquido y sólido, a temperaturas de 7.5 °C y 10 °C, semanalmente durante cuatro semanas. Informaron que dos de las cepas en estudio, tenían capacidad de producir aflatoxinas a ambas temperaturas, alcanzándose mayores concentraciones en medio sólido.

Diener y Davis (1966, 1977) informaron un mínimo de temperatura para la producción en maní de 13 °C después de 21 días, a una humedad relativa (HR) 97-99%, aunque se desarrollaron aflatoxinas en granos dañados a 12 °C. Ellos también determinaron una temperatura máxima para la biosíntesis de 41.5 °C.

Schindler (1977), analizó la capacidad de 25 cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* para producir aflatoxinas a temperaturas extremas (2-7 °C y 41-46 °C) luego de ocho semanas de crecimiento en agar mosto. Concluyó que aunque algunas cepas fúngicas eran capaces de crecer a temperaturas menores de 7.5 °C o mayores de 40 °C, no tenían posibilidad de producir aflatoxina en esas condiciones.

Park y Bullerman (1981), estudiaron el efecto de temperaturas cíclicas (5 °C durante 12 horas y 25 °C las otras 12 horas), comparado con temperaturas constantes de 15 °C y 25 °C, sobre la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* NRLL 2999, en extracto de levadura-glucosa. Las temperaturas cíclicas resultaron ser más favorables que las constantes. Con respecto a las variaciones de ambas toxinas en función del tiempo, cuando se incubó a 25 °C, se produjeron dos picos (a los 12 y 21 días) seguido de una disminución

en la concentración. Las fluctuaciones pueden deberse a la degradación de las aflatoxinas durante ciertas fases del crecimiento. A las tres temperaturas, AFG₁ fue mayor que AFB₁, siendo superiores éstas diferencias a 15 °C y 5–25 °C, mostrando que la temperatura juega un rol muy importante en la relación entre ambas toxinas. Estas también se ven afectadas por el tiempo de incubación, observándose a la temperatura cíclica disminución de la relación de AFG₁ a AFB₁ con un aumento del porcentaje de AFB₁ en función del tiempo. A 15 °C la relación de AFB₁ a AFG₁ aumentó con el tiempo de incubación.

Park y Bullerman (1983 a y b) estudiaron el efecto de temperaturas cíclicas (5–25 °C) y constantes (5, 15, 18 y 25 °C) en la producción de aflatoxinas en arroz y queso por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Nuevamente observaron que la biosíntesis de las toxinas por *A. parasiticus* fue favorecida por temperaturas cíclicas respecto a las constantes. También vieron un efecto de la temperatura en la relación de AFB₁ con AFG₁, resultando mayor AFB₁ a altas temperaturas y AFG₁ a las menores. La producción de los metabolitos por *A. flavus* fue máxima a 15 °C y resultaron menos favorables las temperaturas cíclicas. Se pusieron en evidencia, además, variaciones en la relación AFB₁ respecto de AFG₁ pero con un efecto contrario al de la cepa anterior, pudiendo concluir que la relación depende de la temperatura, del tiempo y de la cepa. Los mismos autores, al estudiar el efecto del sustrato y la temperatura sobre la producción de aflatoxinas observaron que los alimentos con un alto contenido en carbohidratos pudieron soportar mejor la producción de toxinas a bajas temperaturas, mientras que en los alimentos proteicos (queso, soja, yogur) la síntesis se vió inhibida a una temperatura de 15 °C y 21 días de incubación.

Roy y Chourasia (1989) estudiaron el efecto de la temperatura sobre la producción de aflatoxinas en semillas de *Mucuna pruriens* de uso medicinal en India. Los resultados reflejaron que 25 °C es la temperatura más adecuada para la producción de AFB₁ en este sustrato. Además de la temperatura, el período de incubación tuvo una marcada influencia sobre la producción de aflatoxinas. A casi todas las temperaturas, el máximo se encontró a las tres semanas de incubación, luego la producción decreció indicando que parte de las aflatoxinas habían sido degradadas o reabsorbidas por el hongo.

Siendo 25 °C la temperatura señalada por la mayoría de los autores como la óptima para la producción de aflatoxinas en diferentes sustratos, esta es la temperatura seleccionada en el presente trabajo para estudiar la influencia de la actividad acuosa (a_w) sobre la producción de aflatoxinas.

En relación al tiempo, las experiencias se realizan a lo largo de un período de ocho semanas, extensión frecuentemente utilizada para el almacenamiento de granos que se comercializan en grandes volúmenes.

I.3.c. Influencia de la actividad acuosa y su interacción con otros factores que regulan la biosíntesis de aflatoxinas.

Los factores que afectan el crecimiento fúngico y otros aspectos fisiológicos como la producción de micotoxinas, interactúan de tal forma que simples aseveraciones tales como “el rango óptimo de temperatura para la producción de aflatoxinas está entre 20 y 30 ° C” o “la máxima producción de aflatoxinas ocurre a los 12 días” resultan ser inadecuadas (Niles y col., 1985).

Para el análisis de la influencia de la actividad acuosa (a_w) la tendencia de los trabajos es incorporar la interacción de varios factores y analizar el efecto de este parámetro combinado con la temperatura (T), el tiempo, la cepa y el sustrato. Esta información es muy difícil de sintetizar debido a:

- las condiciones experimentales variables de un trabajo a otro;
- utilización de parámetros no comparables para expresar la disponibilidad de agua en el sustrato (por ejemplo: contenido de humedad, humedad relativa (HR) o actividad de agua);
- diferentes períodos de incubación;
- diversas especies y/o cepas utilizadas;
- distintas condiciones del sustrato (entero, molido, roto, maduro, inmaduro y otros);
- diferentes técnicas de ajuste del nivel de a_w del sustrato;
- diversos tratamientos previos de las muestras (esterilización, desinfección superficial);
- preparación del inóculo (medio de cultivo, tiempo de incubación antes de preparar la suspensión de esporas, ajuste o no de la a_w del inóculo, volumen de inóculo y otros).

Por ello se procederá a describir sucintamente aquellos trabajos de interés para el diseño del presente estudio.

Qasen y Christensen (1958), estudiaron la influencia del contenido de humedad, temperatura y tiempo sobre el deterioro fúngico de maíz almacenado. Todos los hongos inoculados pudieron invadir, matar y decolorar el germen del maíz, cuando el contenido de humedad era mayor al 14% y la temperatura superior a 10 ° C. Las bajas temperaturas (5 ° C) tanto como la baja humedad (12%) fueron efectivas en prevenir el daño.

Beuchat y Lechowich (1970), estudiaron la capacidad de tres clases de porotos para soportar el crecimiento de *A. parasiticus* y la síntesis de sus toxinas. Los porotos fueron acondicionados a 20, 25 ó 30% de humedad e incubados a 21, 28 y 35 ° C durante 1, 3 ó 5 semanas. Se observó máxima producción en los porotos con 30% de humedad incubados a 28 ° C. El tiempo al cual se alcanzó la mayor concentración de aflatoxinas fue dependiente del sustrato. La síntesis de toxinas se vió prácticamente inhibida en los sustratos con un

20% de humedad.

Christensen (1970), observó el efecto de la humedad y el tiempo de incubación sobre la invasión fúngica de semillas de sorgo. Cuando el contenido de humedad era del 14.5% (75% de humedad relativa de equilibrio, HRE) o mayor, la invasión fúngica y la disminución de la germinabilidad eran proporcionales al aumento de la humedad y al tiempo de almacenamiento.

Trenk y Hartman (1970) informaron que se requieren temperaturas de 24 °C y una humedad mayor de 17.5% para la producción de aflatoxinas en maíz. Compararon la susceptibilidad de maíz recién cosechado y maíz secado y posteriormente rehumificado en cuanto al crecimiento de los hongos productores de aflatoxinas. Concluyeron que el último sustrato está más expuesto a la invasión por hongos toxicogénicos y a la producción de toxina, implicando un peligro potencial en caso de existir condiciones similares, debido a filtraciones de humedad a través de goteras presentes en la estructura donde se almacena el material. El rango de temperatura de 30 a 35 °C fue en el que se produjeron los mayores niveles de aflatoxinas.

Epstein y col. (1970) estudiaron el efecto de las condiciones ambientales sobre la producción de aflatoxinas en maíz partido. Observaron la influencia del tiempo de incubación, la temperatura y la atmósfera sobre la producción de AFB₁ y AFG₂ por *A. parasiticus* 2999 a una humedad relativa (HR) de 100%. A 28.8 °C, AFG₁ alcanzó un máximo a las 56 horas, y luego disminuyó mientras que AFB₁ se mantuvo constante y en menor concentración respecto de AFG₁ en todo el período. A 16 °C, AFB₁ fue mayor que AFG₁ mostrando la influencia de la temperatura sobre la relación de ambas toxinas.

Boller y Schroeder (1974) estudiaron la influencia de la HR sobre la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* en arroz. El sustrato inoculado se incubó a 30 °C a distintas HR (70, 75, 80, 85, 90 y 100%) y se determinó el nivel de toxinas a 7, 14, 21, 28 y 35 ó 42 días. Observaron que entre el 15 y el 30% de los granos de arroz eran invadidos por *A. parasiticus* cuando la HR estaba en el rango de 70 a 80% (14 al 18% de humedad). En el arroz almacenado a todos los niveles de HR se detectaron aflatoxinas. Si bien solamente se produjeron trazas de AFB₁ después de 42 días en el arroz almacenado a 70 y 75%, cantidades detectables de AFB₁ fueron encontradas luego de 28 días en arroz almacenado a 80, 85 y 88%. Las cuatro toxinas sólo se observaron en arroz almacenado a HR 90%, luego de 28 días y las cantidades máximas se produjeron a los 35 días.

Llewellyn y Eadie (1974), evaluaron el potencial de semillas de girasol enteras y partidas para soportar el crecimiento del *A. flavus* y la producción de aflatoxinas. Determinaron mayores concentraciones en las semillas partidas debido a la mayor disponibilidad de nutrientes, cuando fueron incubadas a temperatura ambiente durante dos semanas. Los autores señalan que las cantidades obtenidas son similares a las informadas en arroz en

otros trabajos. Sin embargo, y tal como se indicó anteriormente, esta comparación no sería correcta ya que no se establecen claramente ni la a_w ni el contenido de humedad de las semillas.

Rambo y col. (1975), observaron la mayor producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* comparado con *A. flavus* en maíz esterilizado, almacenado en cultivos estáticos con 22 y 26% de humedad a 24 y 28 ó 32° C y cultivos con agitación con 26% de humedad a 26, 35 y 40° C durante 7 y 14 días. El máximo de producción por *A. parasiticus* se observó con agitación a una temperatura de 35% y luego de 14 días. También se observó, en el caso de almacenamiento estático, que la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* tuvo un máximo de producción a 26% de humedad y 32° C. No se detectó la toxina a 30% de humedad con ninguna de las dos cepas en el período en el que se realizaron los análisis. Una humedad de 22% y temperatura de 24 a 28° C fue inhibitoria para la producción de aflatoxinas por *A. flavus*, que siempre produjo aflatoxinas en menor cantidad en todas las condiciones.

Denizel y col. (1976), observaron que en pistacho no esterilizado una a_w 0.85 y 29° C fueron las condiciones mínimas a la cual se desarrolló *A. flavus* y produjo toxina luego de 8-10 semanas de incubación. Se determinó la concentración de AFB₁ y AFG₁ en los distintos componentes del producto (vainas, cáscara y grano) a los 6, 9, 14 y 21 días. En la vaina, se detectaron las mayores cantidades de ambas toxinas. En este componente se observaron concentraciones de AFG₁ superiores a las de AFB₁ y la relación de AFG₁ a AFB₁ varió en función del tiempo. La concentración de AFG₁ alcanzó un máximo a los 6 días mientras que AFB₁ fue máxima a los 9 días. En el grano, la formación de AFB₁ fue mayor que la de AFG₁, mientras que pequeñas cantidades de aflatoxinas se detectaron en la cáscara, debido posiblemente a la baja concentración de nutrientes. El crecimiento de hongos xerofílicos competitivos (*A. amstelodami*) para a_w 0.86 e inferiores inhibieron el crecimiento de *A. flavus*.

Northolt y col. (1976, 1977) estudiaron el efecto de la a_w y la temperatura sobre el crecimiento de distintas cepas de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas en agar malta con a_w ajustada mediante el agregado de glicerol (MEG) y sacarosa (MES). La temperatura mínima para la producción de aflatoxinas estaba entre 10 y 13° C y la temperatura óptima era variable según la a_w , el medio y el microorganismo. El valor limitante de a_w varió con la cepa utilizada entre 0.83 a 31° C en MEG y 0.87 a 24° C en MES. Se observó una a_w óptima de 0.97 ó 0.92 a 31° C dependiendo del sustrato y la a_w óptima aumentó al disminuir la temperatura.

Diener y Davis (1977) trabajaron con maní en diferentes condiciones (maduro sano, maduro partido e inmaduro) tratado térmicamente para eliminar la microflora natural e incubado a 30° C durante 21 días. Observaron que la producción de aflatoxinas por

A. flavus alcanzó su valor máximo con una a_w entre 0.92 y 0.99, mientras que la a_w limitante estaría en el rango de 0.82 a 0.84 según las condiciones de la semilla. Cuando se incubó a una a_w 0.99 durante 21 días las temperaturas limitantes para la producción de aflatoxinas fueron 12 y 43 °C y el rango de mayor producción se circunscribió a 20 y 35 °C. Trabajaron también con dos variedades de maní, desinfectado superficialmente con hipoclorito de sodio. Al incubar a temperatura de 30 °C durante 21 días en una variedad, se observó aumento de producción al aumentar la a_w y en otra se vió máxima producción a a_w 0.90. La a_w limitante, en estas condiciones, estaría comprendida entre 0.83–0.85. Luego de 21 días de incubación a a_w 0.98 las temperaturas limitantes obtenidas fueron 12.5 y 42.5 °C y la óptima en el rango de 25 a 30 °C.

Winn y Lane (1978) estudiaron la potencial contaminación con aflatoxinas de sorgo y maíz con alto contenido de humedad. Los sustratos fueron inoculados con *A. flavus* y se incubaron a 25 y a 30 °C y se analizaron a las 48 y 72 horas. En todos los casos, a las 72 horas las muestras contenían más toxina que a las 48 horas. Las máximas concentraciones se observaron en sorgo entero y sorgo partido a las 72 horas y a 25 y 30 °C respectivamente.

Sauer y Burroughs (1980), observaron que con un contenido de humedad menor a 16% en maíz (a_w 0.86) no es probable el crecimiento fúngico. Sin embargo, cuando la humedad supera este valor el crecimiento de *A. flavus* y la producción de toxina aumenta notablemente. En ese rango aún pequeños aumentos de la humedad son muy significativos en términos del aumento del riesgo de contaminación con aflatoxinas.

Chang y Markakis (1981), trabajaron con dos cultivares de cebada, con y sin cáscara, que fueron inoculados con *A. parasiticus*, almacenados durante 20, 30 y 50 días con distintos contenidos de humedad y a 25 °C. La menor humedad en la que se detectaron trazas de aflatoxinas en cebada con cáscara fue 16.5% en el período de 30 a 50 días, y la máxima producción de AFB₁ se produjo luego de 50 días y humedad de 24.5%. El valor más alto de AFG₁ se obtuvo a los 30 días de incubación con 24.5 ó 21.5% de humedad. El cultivar de cebada sin cáscara presenta un mínimo de humedad del 19.2% para la acumulación de trazas de las cuatro aflatoxinas en un período de 20 a 30 días. La máxima producción de AFB₁, AFG₁ y AFB₂ se presenta a los 50 días y 24.5% de humedad, y AFG₂ a la misma humedad y 30 días. Estudiaron también el efecto de la humedad sobre la producción de las cuatro toxinas a los 20 días de incubación a 25 °C. A 28% de humedad, los cuatro metabolitos alcanzaron la máxima concentración en cebada con cáscara, indicando que habría una humedad máxima. Con el cultivar sin cáscara, se alcanzó un máximo de concentración de AFB₁ y AFB₂ con un contenido del 31% de humedad mientras que AFG₁ y AFG₂ lo presentaron para el 28%. Sin embargo, al fijar el tiempo de incubación los autores no están comparando los máximos alcanzados en el período.

Chiou y col. (1984) estudiaron la influencia de los distintos componentes del maní so-

bre el crecimiento y la producción de aflatoxinas. La mayor producción se observó a los 30 días de incubación y 28 ° C en el maní dentro de la vaina. La producción de aflatoxinas en el tegumento y cáscara del maní fue menor, sugiriendo que puede deberse a diferencias en la composición del sustrato. El tegumento de maní mostró mayor crecimiento del *A. parasiticus* comparado con los otros componentes debido posiblemente a sus características higroscópicas. Sin embargo, la menor concentración de aflatoxinas observada podría deberse a que después de tres semanas de incubación, ya habrían sido degradadas. La falta de datos en función del tiempo no les permite a los autores llegar a conclusiones exhaustivas.

Niles y col. (1985) estudiaron la influencia de la a_w del trigo y la cebada sobre la producción de aflatoxinas. A los 30 días de incubación, la óptima producción de aflatoxinas en trigo se observó a 25 ° C y a_w 0.925, o a 30 ° C y a_w 0.975. Las máximas producciones de aflatoxinas fueron estimuladas por valores de a_w mayores a 0.90 en el rango de 25 a 30 ° C. Las combinaciones de temperatura y a_w que soportaron mínima producción de aflatoxinas (< 3ppm) fueron 15 ° C y a_w 0.950; 20 ° C y a_w 0.900; 25 ° C y a_w 0.875; 40 ° C y a_w 0.825 y 42 ° C y a_w 0.900. Significa que al aumentar la temperatura en el rango entre 15 y 40 ° C, disminuye el nivel de a_w (de 0.950 a 0.825) al cual se detectan las mínimas concentraciones de aflatoxinas. Pero a la máxima temperatura estudiada (42.5 ° C), el crecimiento fue muy restringido y se detectaron trazas de toxinas (1ppm) a los niveles 0.900 y 0.925.

Koehler y col. (1985) estudiaron la producción de AFB₁ por *A. flavus* inoculado sobre caupí y un alimento preparado a base de esas semillas. Determinaron la influencia de la temperatura (21, 30 y 37 ° C) y a_w (0.76 a 0.98) sobre la acumulación de aflatoxinas en función del tiempo (3 a 32 días). En caupí las condiciones óptimas de mayor acumulación fueron a_w 0.95, 30 ° C y 14 días de incubación. La concentración máxima de AFB₁ aumentó al variar la a_w entre 0.89–0.95 a la vez que disminuyó el tiempo necesario para alcanzar ese valor. Las condiciones limitantes fueron a_w 0.89 a 21 ° C y a_w 0.82 a 37 y 30 ° C, aunque no se estudiaron valores intermedios de a_w entre 0.82 y 0.89. En el alimento las condiciones óptimas fueron a_w 0.96, 30 ° C y 20 días de incubación. En el alimento adicionado con cebolla se vió muy favorecida la producción de AFB₁, alcanzándose las mayores concentraciones con a_w 0.98, 21 ° C y 20 días de incubación. El valor limitante de a_w fue 0.89 tanto a 21 como a 30 ° C y en general la acumulación fue muy baja a 37 ° C y a_w entre 0.85 y 0.93.

Moreno Romo y col. (1986), estudiaron el mínimo contenido de humedad para el crecimiento y la producción de aflatoxinas por *A. flavus* en alimentos balanceados. El mínimo contenido de humedad para el crecimiento fue 16.5%. Muy poca cantidad de aflatoxinas se acumuló 1 ó 2 días después de iniciado el crecimiento cuando el contenido de humedad era del 17% o menor; por otro lado, cantidades apreciables se detectaron cuando ésta era del 18% o mayor.

Durakovic y col. (1987) estudiaron el efecto de la temperatura (15, 20, 30 y 40 °C) y el tiempo (7, 14, 21 y 28 días) sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas en maíz entero y partido con un 40% de humedad. A 30 °C ambos sustratos soportaron máximas concentraciones de AFB₁ y AFG₁ observándose mayores concentraciones de ambas toxinas en el maíz partido. A 40 °C se observó mayor cantidad de biomasa que a 30 °C, sin embargo, las concentraciones de aflatoxinas fueron considerablemente menores. Para los distintos niveles de humedad, se determinó AFB₁ a los 14 días y AFG₁ a los 21 días, tiempos de máxima acumulación del grano con 40% de humedad. Esos datos los compararon con la producción a 70 días, ya que consideraron que el tiempo necesario para alcanzar el máximo es independiente de la humedad del sustrato. Las concentraciones de AFB₁ y AFG₁ eran menores a 70 días que aquellas observadas a 14 y 21 días respectivamente. Esto sugiere que los hongos pudieron haber metabolizado parcialmente o degradado las aflatoxinas en un cierto período de crecimiento.

Trucksess y col. (1988), estudiaron la producción de AFB₁ por *A. flavus* sobre maíz, soja y porotos Pinto, en función de la temperatura, a_w del sustrato y la presencia de otros hongos toxicogénicos. Los resultados son difíciles de interpretar por la dispersión de los datos, por ejemplo en porotos Pinto con a_w 0.88 y 26 °C las cantidades detectadas varían de 0.2 a 42 µg/g. Cuando se incubó a 26 °C durante 21 días y los sustratos se inocularon sólo con *A. flavus* las a_w mínimas fueron 0.89 para maíz, 0.88 para soja y 0.85 para porotos Pinto. Pero en maíz con a_w 0.94, no se detectó toxina y a 0.96 en las mismas condiciones la concentración de AFB₁ fue muy baja. Para la temperatura de 32 °C y 21 días los niveles mínimos de a_w fueron 0.86 para maíz y 0.85 para soja y porotos Pinto.

Montani y col. (1988 b) estudiaron la influencia de la a_w sobre la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* en maíz acondicionado a a_w 0.87, 0.90 y 0.97 e incubado a 30 °C en función del tiempo. Observaron que la a_w óptima fue 0.90 y la a_w mínima menor a 0.87.

Los valores de a_w que tienen importancia en relación al deterioro de los granos almacenados son mayores de 0.60 ya que debajo de este nivel no se produce crecimiento microbiano. Los valores de a_w mínimos para la producción de toxinas son, por lo general, más altos que aquellos que inhiben el crecimiento de los microorganismos toxicogénicos. En este trabajo se procedió a estudiar la influencia de la a_w sobre la acumulación de aflatoxinas partiendo desde los valores más altos y con probabilidad de ser alcanzados durante el almacenamiento hasta llegar a los valores limitantes.

Por otra parte algunos de los trabajos en la bibliografía consultada mostraron influencia de algunos de los factores sobre las cantidades relativas de las aflatoxinas citadas. Por ello se trabajó con una cepa de *Aspergillus parasiticus*, especie que ha sido aislada de

granos almacenados en la República Argentina (Varsavsky y col., 1985) y que, tal como se indicó en I.3.a, presenta estabilidad en la producción de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

I.3.d. Influencia del sustrato.

La influencia del sustrato en relación a la contaminación con aflatoxinas ha sido señalada por diferentes autores (Northolt y col., 1982; Beuchat y Lechowich, 1970; Trucksess y col., 1988).

Casi todos los productos agrícolas pueden ser susceptibles del crecimiento fúngico en alguna etapa durante su producción, procesamiento, transporte y/o almacenamiento, si se presentan condiciones favorables.

Hesseltine y col. (1966) observaron el comportamiento de sustratos inoculados con distintas cepas de *A. flavus* e incubados durante 6 días a 28° C. Productos como sorgo, maní, maíz y arroz no solamente soportaron el crecimiento de cepas de *A. flavus* sino que también permitieron la producción de cantidades apreciables de aflatoxinas. Por lo tanto no debería sorprender la presencia de estas toxinas en dichos productos, especialmente después de largos almacenamientos, bajo condiciones conducentes al crecimiento fúngico. En soja, en cambio, el autor sugirió que por tratarse de un sustrato poco propicio, el contenido de toxina fue muy bajo.

Los datos de incidencia de contaminación natural con aflatoxinas en distintos productos y en diversas partes del mundo parecen indicar que el maíz y el maní son los alimentos más propensos, en tanto que otros cereales, generalmente de granos pequeños (trigo, avena, cebada, arroz, mijo), presentarían menor riesgo de contaminación a menos que sean sometidos a manipulaciones inadecuadas (Smith y Moss, 1985; CAST, 1989). Cabe señalar que los trabajos de incidencia, en su mayoría, fueron realizados en maní y maíz.

Al seleccionar los sustratos empleados en el presente estudio, se trató de incluir cereales y oleaginosas de importancia económica para nuestro país (Anuario SIMA, 1990; Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 1984; Anuario Estadístico de Oleaginosas, 1984). Además se consideraron sustratos con distintas características físicas (granos grandes y pequeños, con o sin tegumento). También se tuvo en cuenta la información existente sobre incidencia de contaminación con aflatoxinas en la Argentina (Tabla I.3) y en el mundo a fin de trabajar con granos que en la naturaleza parecen presentar diferente grado de susceptibilidad a la contaminación.

Maíz, sorgo y girasol fueron los sustratos seleccionados para analizar su comportamiento en relación a la acumulación de aflatoxinas en condiciones ambientales controladas.

El maíz es uno de los granos que se producen y comercializan en mayor cantidad en el mundo. Cerca de la mitad de la producción mundial corresponde a América del Norte, pero también se obtienen cantidades apreciables en América Central y del Sur, Europa, Asia y África. Los datos a nivel mundial sobre incidencia de aflatoxinas en maíz han permitido comprobar la existencia de contaminación en todas las áreas de producción de este cereal, a veces con concentraciones muy elevadas. En Estados Unidos, el 80% de la exposición humana a las aflatoxinas se estima que proviene del consumo de maíz y sus subproductos (Smith y Moss, 1985).

El análisis de la distribución de la contaminación natural en granos de maíz individuales en la mazorca, muestran que es muy heterogénea y que está en el rango que va de 400 a 80.000 ppb (Lee y col., 1980).

Los niveles de aflatoxinas son generalmente altos en maíz contaminado luego de la cosecha comparado con el maíz contaminado en el período precosecha. Los niveles de AFB₁ alcanzados son frecuentemente de 2.000 a 5.000 ppb en estados del sudeste de Alabama (Davis y col., 1986).

Tal como se observa en la Tabla I.3, en nuestro país las aflatoxinas han sido detectadas en el maíz en diferentes cosechas, tanto a campo como durante el almacenamiento. También se han encontrado aflatoxinas en alimentos derivados de maíz (harinas) que son principalmente destinados a la población infantil. Cabe destacar, además, que este cereal es de gran importancia económica para la Argentina ya que representa la principal fuente de ingresos por exportaciones (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 1984).

El sorgo generalmente es incluido entre los productos que son sólo moderadamente susceptibles a la contaminación con aflatoxinas en el campo, pero cuando este producto es almacenado en condiciones inadecuadas puede producirse contaminación (CAST, 1989).

En algunos países como Estados Unidos, la presencia de micotoxinas en sorgo representa un riesgo potencial para los animales debido a que la mayor parte es destinado a la alimentación animal. Un estudio de incidencia realizado por Shotwell y col. (1980), mostró que de 197 muestras de sorgo provenientes de la cosecha 1975/1976 sólo cuatro contenían aflatoxinas en pequeñas cantidades (54 ng/g, 6 ng/g, 10 ng/g y 7 ng/g de aflatoxinas). Sin embargo, la presencia de micotoxinas en granos en maduración en el campo fue detectada por McMillan y col. (1983), quienes analizaron muestras de 64 campos en Georgia entre los años 1980/1981 y observaron que un 56% de las muestras presentaban contaminación con aflatoxinas en niveles que variaron de 1 a 90 ppb.

En la República de Sudáfrica el sorgo es utilizado para la preparación de cerveza. Trinder (1988), investigó los niveles de aflatoxinas en productos de la industria cervecera de su país durante 5 años. Aunque algunas muestras de malta de sorgo estaban alta-

mente contaminadas con aflatoxinas, ninguno de los análisis realizados de cerveza mostró cantidades significativas de aflatoxinas.

Los datos de incidencia de contaminación con aflatoxinas en sorgo en nuestro país son escasos, si bien estas toxinas han sido detectadas en este cereal (Tabla I.3). Dadas las condiciones en las cuales este producto suele almacenarse (montículos a la intemperie) existe un peligro potencial de contaminación con micotoxinas. En relación a su importancia económica este cereal alterna el segundo puesto con trigo en las exportaciones del país. Además se prevé un incremento en la producción nacional de sorgo, ya que las épocas de cosecha con respecto al continente europeo son opuestas y no existe un nivel apreciable de reservas mundiales de este cereal. Por estas razones, y para contar en el estudio con un grano de tamaño pequeño, se seleccionó también este cereal.

En relación a las oleaginosas, los aspectos relacionados a la presencia de aflatoxinas han sido extensamente investigados en productos tales como maní (Diener y Davis, 1966 y 1977; Varsavsky y col., 1985), semillas de algodón (Stoloff, 1976; Watson, 1984) y soja (Ehrlich y Ciegler, 1985; Nagarajan y col., 1973; Fernández Pinto y col., 1991 b). En cambio son escasos los estudios relacionados con el girasol, a pesar que éste ocupa el segundo lugar en la producción internacional de aceite y es la cuarta fuente de proteínas provenientes de oleaginosas en el mundo (Nagarajan y col., 1974). Los escasos estudios de incidencia realizados en el mundo indican la presencia natural de aflatoxinas en tres países. En Hungría, de 73 muestras analizadas el 9.6% contenía aflatoxinas; en Alemania una de cuatro muestras analizadas estaba contaminada con 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y en Italia dos muestras analizadas contenían entre 50 y 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Chulze, 1985). En Estados Unidos, se analizaron 89 muestras con sólo una positiva, conteniendo 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Casper, 1981).

En nuestro país (Tabla I.3), en 300 muestras analizadas en diferentes cosechas provenientes de las tres provincias de mayor producción: Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, se encontró contaminación con aflatoxinas con una incidencia que variaba de 4 a 28%. Los niveles de contaminación, generalmente, fueron menores a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a excepción de tres muestras de la provincia de Córdoba (año 1980) que contenían 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 357 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Varsavsky y col., 1985).

El girasol es la principal oleaginosa producida en la Argentina, país que aporta al mercado mundial aproximadamente el 80% de subproductos oleaginosos, ocupando por ello el primer puesto. Por eso, teniendo en cuenta que existen escasos estudios de este sustrato, se consideró de interés incluirlo en el presente trabajo.

TABLA I.3
Contaminación de Cereales y Oleaginosas en la República Argentina

PRODUCTO	CARACTERÍSTICAS	AÑO	Nº DE MUESTRAS	% DE MUESTRAS POSITIVAS	AFLATOXINAS (rango µg/kg)
Mani ⁽¹⁾	Confitería	77/78	24	33	(4-76)
	A campo	77/78	186	19	(30->1000)
	Industrial	77/78	5	40	(22-40)
	Pellets	77/78	49	32.6	(10-410)
	A campo	77/78	72	16.7	(9- >1000)
	Confitería	78/79	35	0	
	A campo	78/79	182	6	(30->1000)
	Industrial	78/79	3	0	
	Pellets	78/79	86	9.3	(5-135)
	Almacenamiento	78/79	84	16.7	(9->1000)
	Confitería	79/80	47	6.3	(115-185)
	Industrial	79/80	9	33	(100-1000)
	Pellets	79/80	15	100	(20-360)
Maíz ⁽¹⁾	A campo	76/77	50	10	(>5)
	A campo	77/78	267	4.9	(>5)
	Acopios	1981	53	24.5	(30-305)
	Acopios	1981	41	34	(1.7-24.8)
	A campo	83/84	87	33.4	(2-50)
	A campo	86/87	70	11	(21-50)
	Harina de maíz ⁽¹⁾	cocción rápida	1983	53	26.4
cocción lenta		1983	47	21.2	(3-40)
envasada					
cocción lenta sin envasar		1983	10	20.0	(3-40)
Girasol ⁽¹⁾	Almacenamiento	1978	50	4	(>5)
	Acopios	1980	50	28	(20-357)
	Acopio Córdoba	1981	100	8	(12-28)
	Acopio Bs.As.	1981	100	8	
Sorgo ⁽¹⁾	Almacenamiento (en montículos)	1983	24	4.1	(12-20)
	Almacenamiento (en montículos)	1983	12	8.3	(30)
Soja ⁽²⁾	Recién cosechados	1986	34	5.8	(Tr-14.5)
		1987	60	11.6	(4.5-36)

Tr: trazas (< 1µg/kg)

(1): Datos tomados del Taller Conjunto FAO/OPS sobre prevención y control de micotoxinas en América Latina y El Caribe, San José, Costa Rica, 23 de febrero de 1991.

(2): Datos tomados de Fernández Pinto y col. (1991 b)

I.4. Objetivos.

El presente trabajo tiene por objetivo el estudio de la influencia de la actividad acuosa, el sustrato y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas en cereales y oleaginosas de importancia económica para nuestro país como maíz, sorgo y girasol.

Se analizarán los siguientes aspectos:

1. Efecto del tiempo de incubación sobre la acumulación de las aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 .
2. Influencia de la actividad acuosa en la acumulación de aflatoxinas totales y en las cantidades relativas de las cuatro aflatoxinas.
3. Comportamiento de los diferentes sustratos en relación a la susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas.

II. Materiales y Métodos

II.1. Sustratos.

Se dispuso de granos de maíz, sorgo y girasol. El primero, proveniente de la zona de Pergamino (Provincia de Buenos Aires) fue enviado por el Ing. E. Teyssandier del Laboratorio de Semillas de Cargill. El sorgo y el girasol procedentes de la zona de Río Cuarto (Provincia de Córdoba) fueron enviados por la Dra. S. Chulze de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

II.2. Acondicionamiento de los granos.

Este proceso comprendió varias etapas que debieron cumplirse cuidadosamente según se describe a continuación.

II.2.a. Selección.

Esta etapa tuvo por objeto eliminar elementos extraños, granos partidos y/o deteriorados. Inicialmente se seleccionaron con ayuda de tamices de diferentes números de mallas (5, 8, 12, 25 y 40 mesh) que se eligieron de acuerdo al tamaño del grano. Finalmente se procedió a la selección manual, asegurando la presencia solamente de material sano.

II.2.b. Desinfección.

Los sustratos fueron desinfectados superficialmente a fin de eliminar la micota contaminante, tratando de evitar tratamientos que pudieran alterar la viabilidad de los granos.

El material seleccionado se colocó en recipientes herméticos de 50 cm de diámetro formando una capa delgada. Se agregó hipoclorito de sodio al 5% sumergiendo completamente los granos, mezclando y agitando vigorosamente durante 5 minutos. Se enjuagó dos veces con agua estéril, asegurando en cada etapa que los granos quedaran perfectamente cubiertos. Aplicando la técnica descripta, se procedió a una nueva inmersión, durante 5 minutos, en etanol 70% y finalmente cuatro enjuagues sucesivos con agua estéril.

II.2.c. Secado.

Esta etapa se realizó en equipo de flujo laminar de aire estéril, en ambiente previamente desinfectado y calefaccionado. El material se dispersó sobre papel absorbente y se secó bajo corriente de aire en repetidas secuencias midiendo la a_w al final de cada una de ellas,

hasta alcanzar lo más aproximadamente posible los niveles de a_w previamente establecidos. Una vez logrado el nivel deseado, el material se dejó equilibrar en recipientes herméticos a temperatura de refrigeración durante una semana y se repitió la medición de a_w . Los valores finales de a_w alcanzados por los tres sustratos fueron 0.950, 0.925, 0.902, 0.868 y 0.851. Dentro de este rango se encontraron los valores de a_w limitantes para maíz y sorgo. En el caso del girasol se detectó acumulación de aflatoxinas en todos estos niveles de a_w y por ello se realizó para este sustrato una experiencia más al valor de a_w 0.827.

II.3. Determinación de la actividad acuosa.

Los valores de a_w se determinaron a 25 °C utilizando un higrómetro eléctrico Vaisala Humicap (manufacturado por Vaisala Oy PL 26 SF00421, Helsinki, Finland) con sensor modificado por Driesen y Kern (Postfach 1126, Tangstedt, West Germany). Este fue calibrado con soluciones salinas saturadas de a_w conocidas a 25 °C (tabla II.1) y los valores de a_w se calcularon a través de una recta de calibración obtenida por cuadrados mínimos.

TABLA II.1

Valores de referencia de a_w que se adoptaron para las soluciones saturadas a 25 °C (Chirife y col., 1983).

Soluciones salinas saturadas	a_w (25 °C)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck N° 1217)	0.802
KCl (Merck N° 4936)	0.843
Cl ₂ Ba (Merck N° 1719)	0.902
KNO ₃ (Merck N° 5063)	0.925
K ₂ SO ₄ (Merck N° 5153)	0.974

Las mediciones se realizaron en estufa de circulación forzada de aire a 25 ± 0.2°C fabricada por G.C.A. Corporation.

II.4. Preparación del inóculo.

En el presente trabajo se utilizó una cepa de colección, *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, productora de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, que se cultivó en tubos con agar papa dextrosa inclinado (Merck N° 10130) durante 7 días a 30° C.

A fin de obtener la suspensión de esporas necesaria para inocular cada uno de los sustratos equilibrados a un determinado nivel de a_w , se partió de quince tubos con el cultivo de la cepa en estudio, a cada uno de los cuales se agregaron 2.5 ml de solución de lauril sulfato de sodio (Vilmax) 0.1% y ClNa Merck N° 6404 en concentración adecuada para alcanzar el nivel de a_w correspondiente al sustrato de acuerdo a los datos de Chirife y Resnik (1984).

Luego de agitar cada tubo en Vortex durante un minuto se recogió la suspensión de esporas proveniente de los quince tubos en un recipiente estéril, a fin de obtener un inóculo de partida de concentración uniforme de 10^7 esporas/ml. Ese valor se determinó haciendo recuento de esporas en una cámara cuentaglóbulos de Thoma.

II.5. Inoculación.

El sustrato equilibrado se distribuyó en bolsas de polietileno en porciones de 100 g en el caso de sorgo y maíz y de 50 g para el girasol, teniendo en cuenta la diferencia del peso hectolítrico de los granos empleados para no modificar la relación volumen del inóculo/volumen del sustrato. Luego de sembrar el material contenido en cada bolsa con 2.5 ml de la suspensión de esporas descrita en II.4, se mezcló cuidadosamente durante 10 minutos. Se reunió el contenido de las bolsas de a pares repitiendo la operación de mezclado y así sucesivamente hasta formar una única muestra de partida.

II.6. Incubación.

Los granos inoculados se distribuyeron en condiciones de asepsia en cajas de Petri, pesando en cada una 20 g de sorgo o maíz y 10 g cuando el sustrato fue girasol.

Las cajas se ubicaron en la parte superior de bandejas metálicas diseñadas de modo tal que permitieron colocar en la parte inferior recipientes conteniendo soluciones con valores de a_w iguales a los de cada sustrato, a fin de mantener constante la humedad relativa de la atmósfera que rodeaba a los granos durante todo el período de incubación. Para dos de esos niveles de a_w se dispuso de soluciones salinas saturadas (tabla II.2). En los otros casos se emplearon soluciones de NaCl cuyas concentraciones se obtuvieron de Chirife y Resnik (1984). En este último caso, el contenido de los recipientes se renovó diariamente

para evitar variaciones de humedad relativa debido a modificaciones en la concentración de esas soluciones no saturadas. Las concentraciones de las soluciones empleadas para mantener la atmósfera de humedad relativa figuran en la Tabla II.2.

TABLA II.2

Valores de a_w de las soluciones para mantener la humedad relativa del ambiente

Solución salina	Concentración (% p/p)	$a_w(25^\circ\text{C})$
ClNa (Merck N° 6404)	21.0	0.827
ClNa	19.0	0.851
ClNa	16.5	0.868
Cl ₂ Ba	S.saturada (~ 50)	0.902
NO ₃ K	S.saturada (~ 50)	0.925
ClNa	8.0	0.950

Las bandejas se introdujeron en bolsas de polietileno de 40 micrones de espesor y se incubaron en estufa a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Longhi Hnos., DBO 120). Se retiraron tres cajas por cada nivel de a_w cada 7 días a lo largo de un período de ocho semanas. Se autoclavaron a 121°C durante 15 minutos, y se guardaron a -18°C hasta el momento de su análisis.

II.7. Determinación de la concentración de las soluciones patrones de aflatoxinas.

Se realizó siguiendo la técnica de "Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 26.006-26.012, 1980).

II.7.a. Calibración del equipo.

Se utilizó un espectrofotómetro (Marca Metrolab, U.V. 260) capaz de medir absorbancia en el U.V. (200-400 nm), con celdas de cuarzo de 1 ó 0.5 cm. Para su calibración se prepararon tres soluciones de dicromato de potasio en ácido sulfúrico. Para obtener la solución 1 se disolvieron 0.0454 g de dicromato de potasio en 500 ml de solución de ácido sulfúrico de concentración 9 mmol/l (1 ml de ácido sulfúrico concentrado (96%) en 2 l de agua destilada). Sabiendo que el peso molecular del dicromato de potasio (Merck N° 4864) es 294.2, la concentración final resultante fue:

$$[\text{solución 1}] = (90.8 \text{ mg/l}) / 294.2 = 0.3086 \text{ (mmol/l)}$$

La solución 2 se preparó tomando 25 ml de la solución 1 y llevando a 50 ml con la solución de ácido sulfúrico.

Para obtener la solución 3 se procedió de la misma manera, partiendo de la solución 2, resultando las siguientes concentraciones:

$$[\text{solución 2}] = 0.1543 \text{ mM}$$

$$[\text{solución 3}] = 0.0771 \text{ mM}$$

Se determinó la absorbancia (A) de las tres soluciones (tabla II.3) a la longitud de onda de máxima absorción que se encontró en la zona cercana a 350 nm, usando la solución de ácido sulfúrico (9 mmol/l) como blanco.

TABLA II.3

Absorbancia de las soluciones de dicromato de potasio

Long. de onda (nm)	Absorbancia solución 1	Absorbancia solución 2	Absorbancia solución 3
310	0.460	0.234	0.120
320	0.490	0.250	0.127
330	0.700	0.355	0.180
340	0.900	0.450	0.228
345	0.960	0.485	0.243
346	0.970	0.490	0.245
348	0.970	0.490	0.245
349	0.990	0.490	0.246
350	0.990	0.493	0.245
351	0.990	0.493	0.245
352	0.990	0.493	0.245

Las máximas absorbancias se observaron en el rango de longitud de onda de 346 a 352 nm y se tomaron estos valores como referencia para el cálculo del coeficiente de absorción molar (E).

$$E = A \cdot 1000 / c \cdot l$$

c = concentración en mmol/l

l = longitud del camino óptico

Para las tres soluciones se obtuvieron los siguientes coeficientes:

$$E(1) = 3208$$

$$E(2) = 3195$$

$$E(3) = 3177$$

El factor de corrección (CF) se calculó de la siguiente forma:

$$CF = 3160 / E_p = 0.989$$

E_p = promedio de $E(1)$, $E(2)$ y $E(3)$

Un factor de corrección (CF) cuyo valor está comprendido entre 0.95 y 1.05 indica una correcta calibración del equipo.

II.7.b. Cuantificación de las soluciones patrones de aflatoxinas.

Las aflatoxinas cristalinas (AFB_1 , Sigma N° A6636; AFB_2 , Sigma N° A9887; AFG_1 , Sigma N° A0138 y AFG_2 , Sigma N° A0263) se disolvieron en benceno (Merck N° 783) – acetónitrilo (Merck N° 30) en la relación 98:2.

Se determinó la máxima absorbancia de las soluciones entre 345 y 357 nm utilizando celdas de 0.5 cm o de 1 cm de acuerdo a la concentración de cada solución.

En la Tabla II.4 se presentan los valores de absorbancia (A) de las soluciones patrones de las distintas aflatoxinas en función de las longitudes de onda (λ).

La concentración de las soluciones se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$[AFLA] \mu g/ml = A \cdot PM \cdot 1000 \cdot CF/E \cdot l$$

donde

A = Absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima

PM = Peso Molecular de la aflatoxina en cuestión

CF = Factor de Corrección (obtenido en II.7.a)

E = Absortividad en benceno–acetónitrilo (98:2)

l = longitud de camino óptico

Los valores de E para las soluciones de las distintas aflatoxinas se muestran en la Tabla II.5.

TABLA II.4

Absorbancias de las soluciones patrones de aflatoxinas

λ (nm)	A AFB ₁	A AFB ₂	A AFG ₁	A AFG ₂
345	0.840	0.620	0.680	0.126
346	0.860	0.630	0.690	0.130
347	0.860	0.640	0.700	0.130
348	0.870	0.650	0.710	0.135
349	0.870	0.650	0.720	0.136
350	0.870	0.650	0.730	0.140
351	0.860	0.640	0.740	0.140
352	0.860	0.640	0.740	0.145
353	0.850	0.640	0.745	0.145
354	0.850	0.640	0.750	0.146
355	0.850	0.640	0.745	0.150
356	0.850	0.630	0.745	0.150
357	0.840	0.630	0.740	0.150

TABLA II.5

Absortividades de las aflatoxinas en benceno:acetonitrilo (98:2)

Soluciones	E
AFB ₁	19800
AFB ₂	20900
AFG ₁	17100
AFG ₂	18200

Las concentraciones resultantes de las soluciones patrones fueron:

$$[\text{AFB}_1] = 27.126 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AFB}_2] = 19.316 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AFG}_1] = 28.450 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AFG}_2] = 5.379 \mu\text{g/ml}$$

Estas soluciones se guardaron a -18°C protegidas de la luz y la humedad y fueron estables durante un año. Las concentraciones de estas soluciones se verificaron anualmente, procediendo tal como se expuso. A partir de las mismas, se prepararon las soluciones patrones de trabajo correspondientes, que se renovaron quincenalmente, para obtener una concentración final de:

$$[\text{AFB}_1] = 2.7 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AFB}_2] = 0.9 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AFG}_1] = 2.9 \mu\text{g/ml}$$

$$[\text{AFG}_2] = 1.1 \mu\text{g/ml}$$

II.8. Método de análisis de aflatoxinas.

Se utilizó la modificación de Quiroga (1985) del método oficial BF (AOAC, 1980 26032). Este método fue recomendado para maíz y sorgo por el Grupo de Trabajo de Micotoxinas del IV Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires (1985). También presenta una recuperación adecuada para el análisis de girasol (I. Rizzo, Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, comunicación personal).

En el caso de las muestras de sorgo y maíz se trabajó con 20 g por caja. Los granos se colocaron en una licuadora, se agregaron 100 ml de metanol (Merck N° 15827) - agua (60:40), 40 ml de hexano (Merck N° 4367) y 1 g de NaCl y la mezcla se agitó a alta velocidad durante 1 minuto. Con respecto al girasol se trabajó con 10 g por caja y las cantidades de solventes y sal utilizadas se redujeron a la mitad.

La mezcla se filtró a través de papel de filtro y se dejó reposar hasta que se separaron las dos capas. Una alícuota (25 ml) de la capa metanol-agua fue extraída en primer lugar en ampolla de decantación con 25 ml de tolueno (Merck N° 8325) agitando durante 1 minuto, y luego con 15 ml del mismo solvente. Ambos extractos se recogieron en un balón luego de filtrar a través de sulfato de sodio anhidro (Merck N° 6649). El sulfato de sodio se lavó con dos porciones sucesivas de 5 ml de tolueno que fueron recogidos en el mismo balón. El extracto se evaporó en evaporador rotatorio (Büchi 011, Suiza) hasta sequedad. Luego se redisolvió en un volumen adecuado de benceno-acetonitrilo (98:2) en el momento

de su cuantificación por cromatografía planar en cada delgada. Se utilizaron placas de sílica gel G60 de 0.25 mm de espesor (Merck N° 5721). A 2 cm del borde de la placa se sembraron con microaplicador (CAMAG) 0.5, 1, 1.5 y 2 μ l de la solución patrón junto con 2 y 5 μ l del extracto de la muestra a una distancia de 1.5 cm entre sí. El solvente de desarrollo fue cloroformo (Merck N° 10130) – acetona (Merck N° 14), 9:1.

Se trabajó a temperatura ambiente en cuba sin saturar. El tiempo de desarrollo para que el frente del solvente alcanzara 10 cm de la línea de siembra fue aproximadamente 20 minutos. Las placas se examinaron en un cuarto oscuro a una distancia aproximada de 30 cm de una lámpara ultravioleta (Desaga U.V. 131.000) a 366 nm. En las condiciones de trabajo descritas se obtuvo una buena resolución de las cuatro aflatoxinas. La concentración de cada una de ellas se determinó por el método de comparación visual. Generalmente un determinado volumen del solvente empleado para la redisolución del extracto resultaba adecuado para la cuantificación de AFB₁ y AFG₁, mientras que para cuantificar AFB₂ y AFG₂, que se encontraban en menor concentración, fue necesario llevar a sequedad nuevamente y redissolver el extracto en un volumen menor.

La concentración de cada aflatoxina en la muestra, expresada en μ g/kg se calculó mediante la ecuación

$$\text{Contenido aflatoxina } (\mu\text{g/kg}) = \frac{V_p \cdot C_p \cdot M_d}{V_m \cdot P}$$

V_p: μ l de solución patrón de aflatoxina que iguala el extracto de la muestra.

C_p: Concentración de la solución patrón de aflatoxina en μ g/kg.

M_d: Volumen en μ l de la dilución final de la muestra.

V_m: μ l de muestra cuya fluorescencia coincide con la de V_p.

P: Gramos de la muestra original contenidos en el extracto final.

La confirmación de las toxinas se realizó rociando las placas con solución de ácido sulfúrico al 10% y observando el cambio de coloración de las manchas fluorescentes de azul o verde al amarillo.

III. Resultados y Discusión

III.1. Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en sorgo.

En este sustrato no se detectó producción de aflatoxinas a los niveles más bajos de a_w (0.851 y 0.868) a 25° C. No se han encontrado en bibliografía datos relativos a los valores de a_w limitantes para la producción de aflatoxinas. Christensen (1970), cuando trabajó con semillas de sorgo observó que la mínima humedad relativa a la cual sufrían invasión era 75% (14% de humedad) y temperatura de 27° C. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que el valor limitante de a_w para la producción de aflatoxinas en el tiempo estudiado (8 semanas) está entre 0.868 y 0.902.

En las figuras III.1, III.2 y III.3 se presenta la variación de la concentración de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ con el tiempo de incubación, en sorgo de a_w 0.902, 0.925 y 0.950 respectivamente y a 25° C. Para cada tiempo se presentan las medias (valores unidos por líneas) y medianas (puntos sin unir) de cada una de las toxinas. Dado que la media es muy sensible a la presencia de valores extremos se analiza también el comportamiento de las medianas. Cuando entre los valores observados no se presenta ningún dato atípico, ambas curvas coinciden. Como se puede observar en las figuras la tendencia de las curvas de medias y medianas son similares.

Para sorgo de a_w 0.902 (Fig. III.1), se observa que las aflatoxinas AFB₁ y AFG₁ inician su acumulación entre los 14 y los 21 días de incubación, mientras que AFG₂ se detecta en muy bajas cantidades y recién a partir de los 35 días. En el período estudiado se observa AFB₂ solamente a los 42 días. En todo el tiempo de incubación AFG₁ es mayor que AFB₁ y ambas varían poco en sus concentraciones entre los 21 y 42 días, para luego disminuir al promediar las 8 semanas de incubación.

El tiempo tiene una evidente influencia en cuanto a las posibilidades de acumulación de las aflatoxinas individuales en sorgo. Antes de los 21 días no se detectan cantidades cuantificables de toxinas. A este tiempo sólo se observan AFB₁ y AFG₁ (25 µg/kg y 52 µg/kg respectivamente), mientras que las cuatro toxinas se detectan en un único tiempo (42 días) en concentraciones relativamente bajas (6 µg/kg de AFG₂, 10 µg/kg de AFB₂, 27 µg/kg de AFB₁ y 55 µg/kg de AFG₁).

A una a_w de 0.925 (Fig. III.2), al cabo de 7 días se detectan AFB₁ y AFG₁ mientras que AFB₂ y AFG₂ se empiezan a detectar a los 11 días. Luego se observa que la concentración tiende a aumentar hasta los 21 días, disminuye entre 21 y 35 días, para alcanzar nuevamente un máximo a los 35 días. A tiempos mayores se produce un decrecimiento de la acumulación de las cuatro aflatoxinas.

Figura III.1-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en sorgo, aw 0.902(25 C).

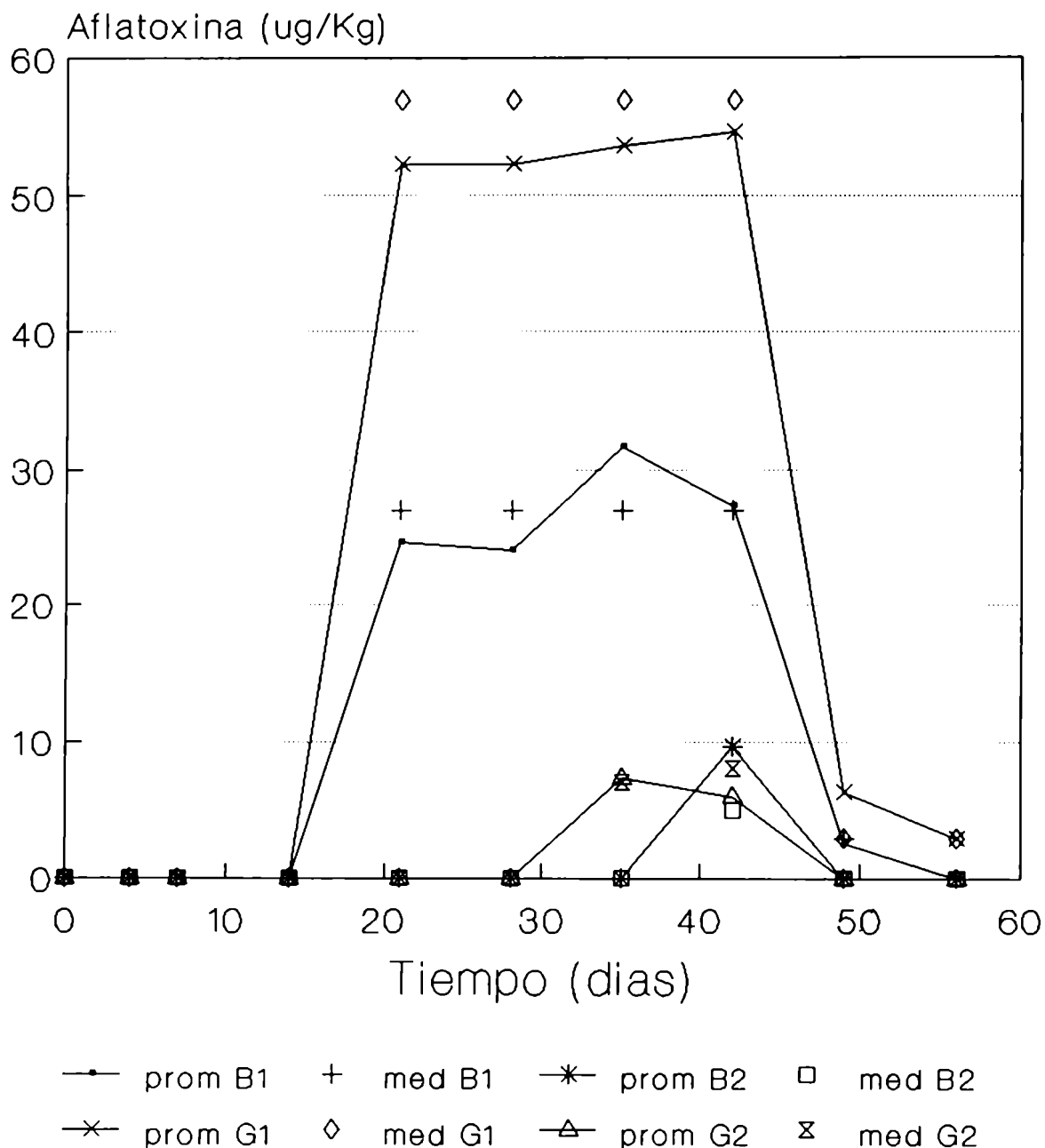
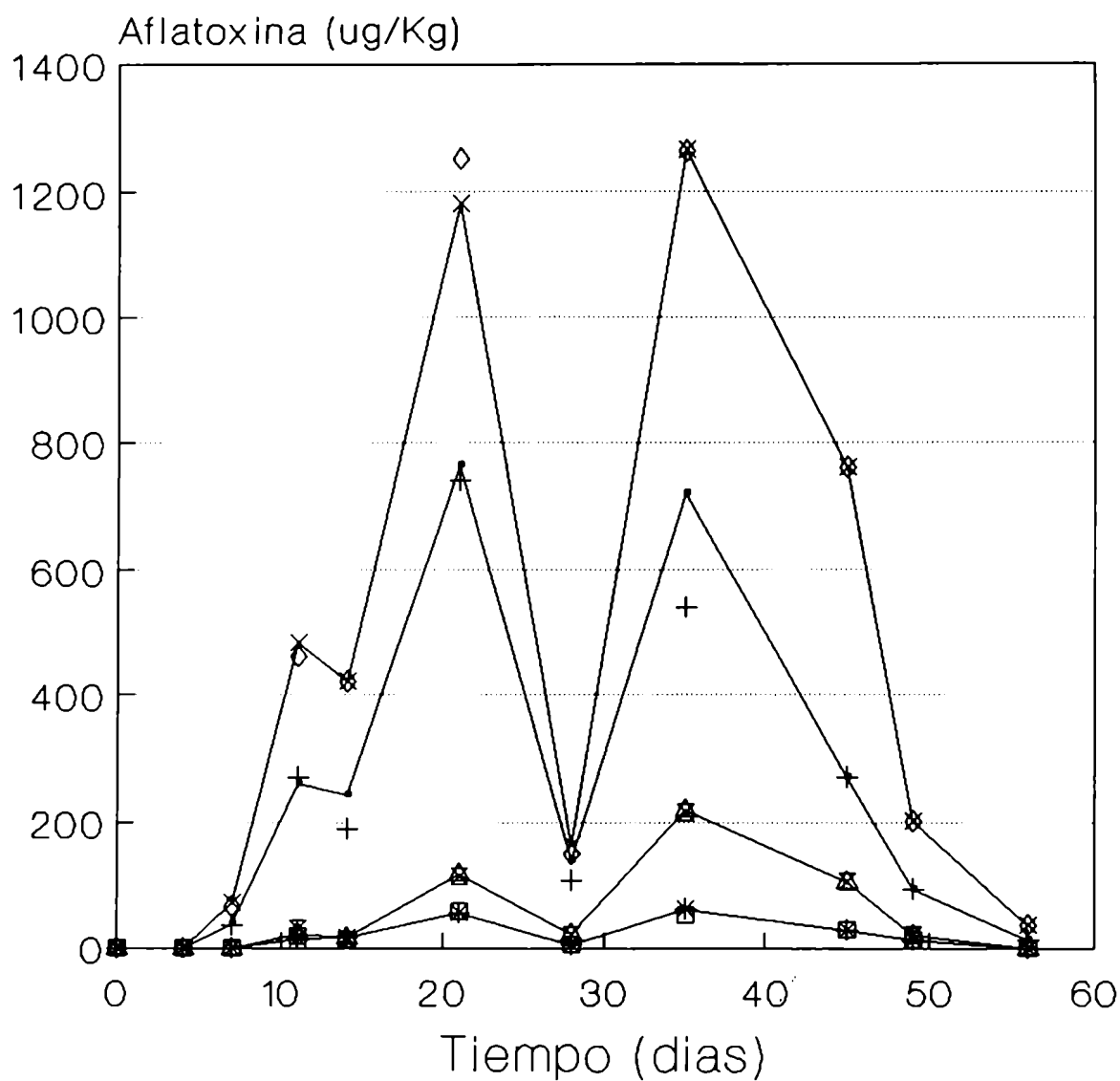
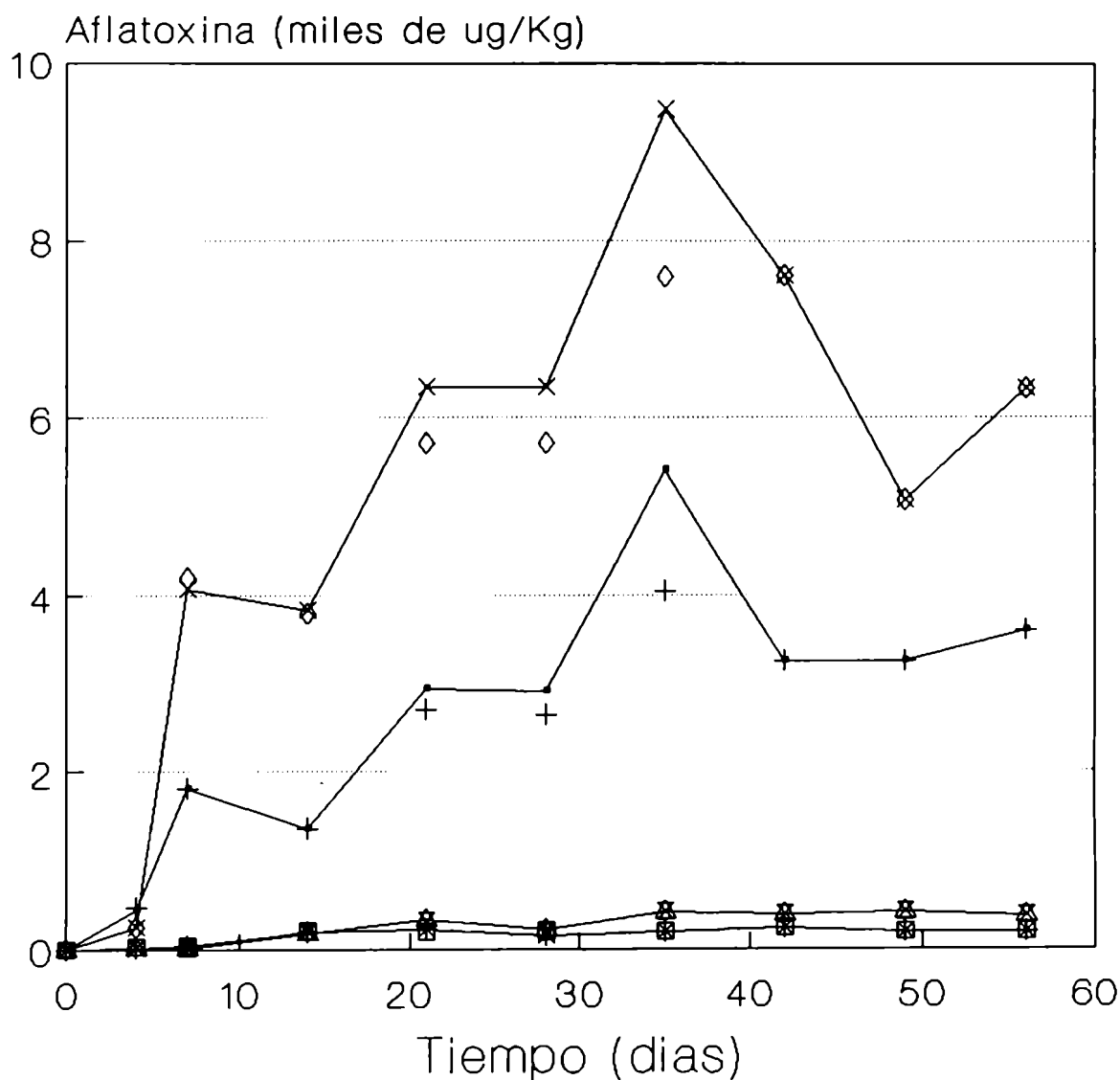


Figura III.2-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en sorgo, aw 0.925(25 C).



● prom B1 + med B1 * prom B2 □ med B2
 × prom G1 ◇ med G1 △ prom G2 ⊗ med G2

Figura III.3-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en sorgo, aw 0.950(25 C).



—●— prom B1 + med B1 —*— prom B2 □ med B2
 —x— prom G1 ◇ med G1 —△— prom G2 ⊠ med G2

Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores. Park y Bullerman (1981), trabajando sobre un medio de cultivo también observaron dos picos a los 12 y 21 días de incubación a 25° C, explicando que las fluctuaciones pudieron deberse a degradaciones producidas en cierta fase del crecimiento.

Otros autores observaron una disminución de la acumulación de aflatoxinas después de un cierto período. Schindler y col. (1967), sugirió que la metabolización luego de un máximo pudo deberse a la coincidencia de máximo crecimiento e iniciación de autólisis provocando una fase de degradación en el tiempo.

Marth y Doyle (1979) realizaron un análisis crítico de los factores que pueden contribuir a la degradación de las aflatoxinas presentes en cultivos de *A. flavus* y *A. parasiticus* luego de cierto tiempo de incubación. De dicho análisis surgen los siguientes factores:

- a) La edad del micelio.
- b) El micelio fragmentado es más activo que el micelio intacto (algunas sustancias intracelulares podrían ser responsables de la degradación de las toxinas).
- c) El sustrato que soporta mayor crecimiento de micelio también produce micelio con máxima habilidad de degradar aflatoxinas.
- d) La cepa más productora es la que presenta la mayor degradación.
- e) La temperatura (máxima degradación a 28° C siendo considerablemente menor a 7, 19, 36 y 45° C).
- f) El pH (máxima degradación a pH 5.0 a 6.5).
- g) Cantidad de aflatoxinas (mayor velocidad de degradación a mayor concentración de aflatoxinas).
- h) Cantidad de micelio (mayor velocidad de degradación a mayor cantidad de micelio).

De acuerdo a lo expuesto, es evidente que durante el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxinas existen dos procesos, uno de síntesis y otro de degradación que pueden ser simultáneos en gran parte del período. El análisis realizado en cada tiempo, evalúa el efecto neto de ambos acontecimientos, que en este trabajo se denomina acumulación. Si la velocidad de producción es mayor que la de degradación, se observa un aumento de la concentración de las toxinas. En la situación inversa, la toxina puede ser metabolizada o reabsorbida por el mismo hongo que la produce a mayor velocidad, y se presenta una fase de degradación.

En sorgo de a_w 0.950 (Fig. III.3), a los cuatro días de incubación, ya se acumulan cantidades considerables de toxinas en comparación con aquellas producidas a los otros niveles de a_w . Es la única a_w a la cual se detectan las cuatro toxinas antes de los 7 días. Winn y Lane (1978) detectaron aflatoxinas a las 48 horas en sorgo con un alto contenido de

humedad (no especificado) e incubado a 25 °C y 30 °C a una humedad relativa ambiente del 90%. Probablemente el nivel de a_w del sustrato sea superior a 0.950.

A partir de la primera semana, las cantidades de AFG₁ a AFB₁ guardan una relación que se mantiene constante (alrededor de 2:1) a lo largo de todo el período de incubación. Las cantidades relativas de AFG₁ y AFB₁ no se ven tan afectadas por el tiempo a este nivel de a_w como a 0.925 (figura III.2). Por su lado, AFB₂ y AFG₂ varían poco con el tiempo de incubación y son mucho menores que las anteriores.

III.2. Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en maíz.

Las figuras III.4 a III.7 ilustran la producción de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ por *A. parasiticus* NRRL 2999 inoculado en maíz de a_w 0.868, 0.902, 0.925 y 0.950 respectivamente en función del tiempo de incubación y a 25 °C. Las medianas y las medias presentan mayor grado de coincidencia entre ambos valores respecto a lo observado en sorgo.

En estas condiciones no se detectaron aflatoxinas a a_w 0.851; por lo tanto el valor limitante está en el rango de a_w 0.851–0.868 a 25 °C y durante 8 semanas de incubación. Hunter (1969) observó que a a_w 0.84 y 25 ° no se detectaban aflatoxinas en maíz y sí a a_w 0.86 que coincidió con el valor informado por Sauer y Burroughs en 1980.

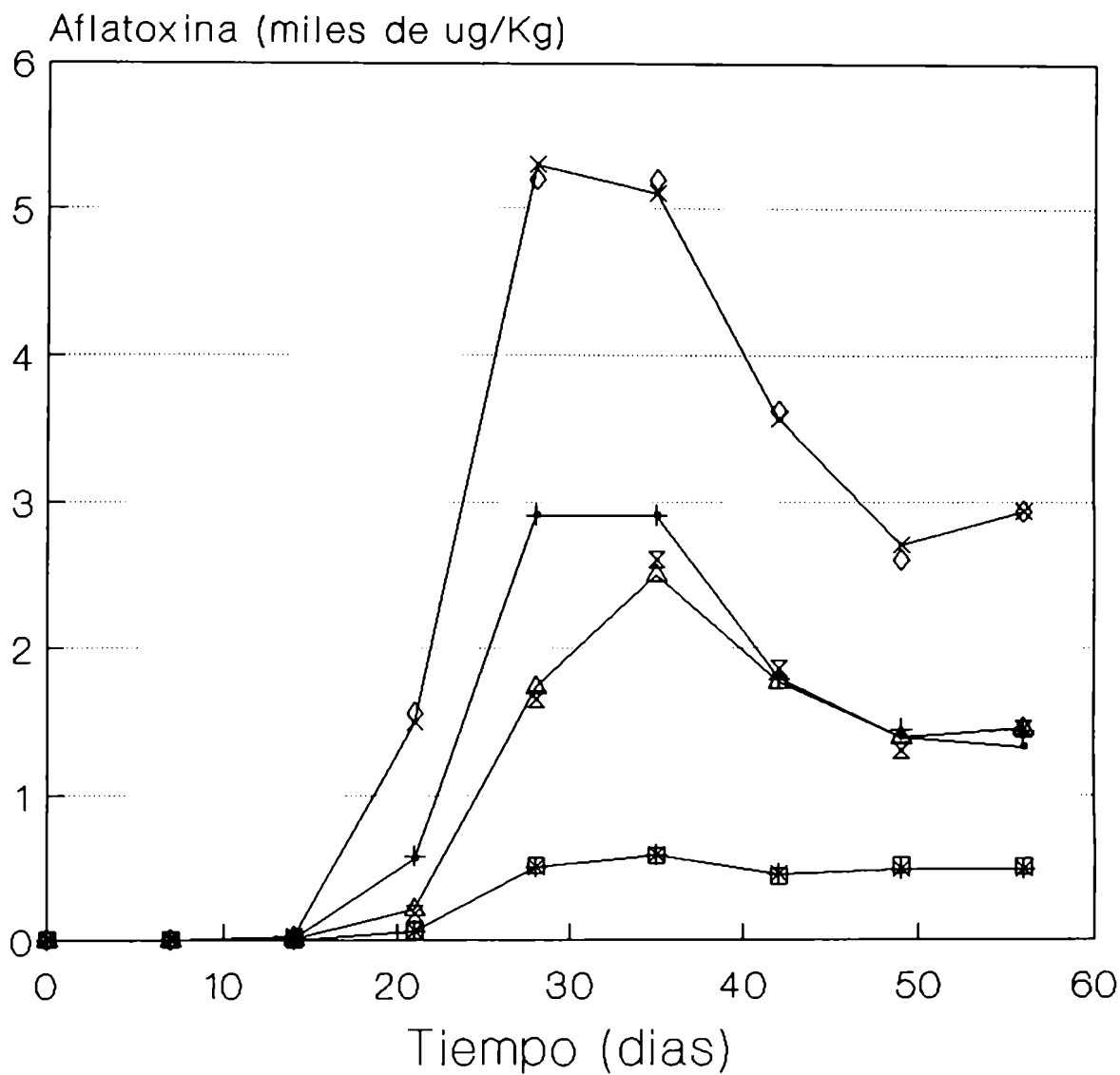
En el maíz acondicionado a a_w 0.868 (figura III.4) se empiezan a detectar las cuatro aflatoxinas en el intervalo comprendido entre los 14 y los 21 días de incubación, mientras que los valores de mayor acumulación se observan en el rango de 28 a 35 días. Las cantidades de AFG₂ son prácticamente coincidentes con las de AFB₁ luego de los 42 días y hasta el final de la incubación.

Con respecto al maíz de a_w 0.902 (figura III.5), a los 7 días de incubación se detectan las cuatro toxinas y se observa que AFG₁ y AFB₁ alcanzan un máximo a los 28 días, seguido de una fase de rápida degradación que luego aumenta presentando un segundo pico a los 49 días. Estas fluctuaciones son semejantes a las observadas en sorgo de a_w 0.925 (figura III.2).

En este valor de a_w se observa, al igual que en la curva correspondiente a 0.868 (figura III.4) una neta separación entre la acumulación de AFG₂ y AFB₂, siendo la primera mayor a la segunda en todo el período estudiado.

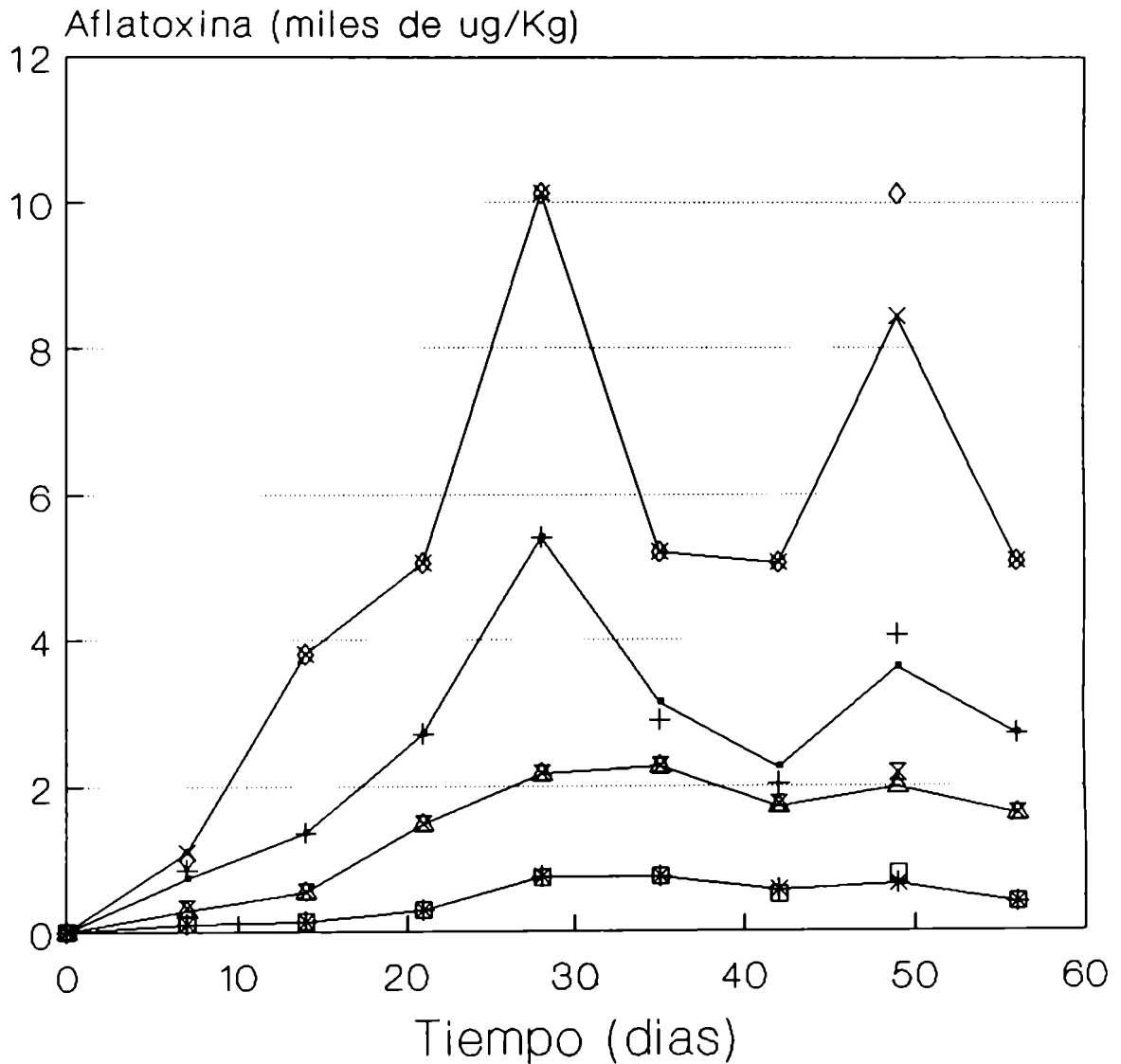
La variación de las cuatro aflatoxinas en función del tiempo, en maíz de a_w 0.925 (figura III.6) muestra que la curva de AFB₁ se acerca a la de AFG₁ mientras que la de AFG₂ se acerca a la de AFB₂.

Figura III.4-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en maiz de aw 0.868(25 C).



—●— prom B1 + med B1 *— prom B2 □ med B2
 —×— prom G1 ◇ med G1 —△— prom G2 ⋈ med G2

Figura III.5-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en maiz de aw 0.902(25 C).



● prom B1 + med B1 ✱ prom B2 □ med B2
 ✕ prom G1 ◇ med G1 △ prom G2 ⊗ med G2

Figura III.6-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en maiz de aw 0.925(25 C).

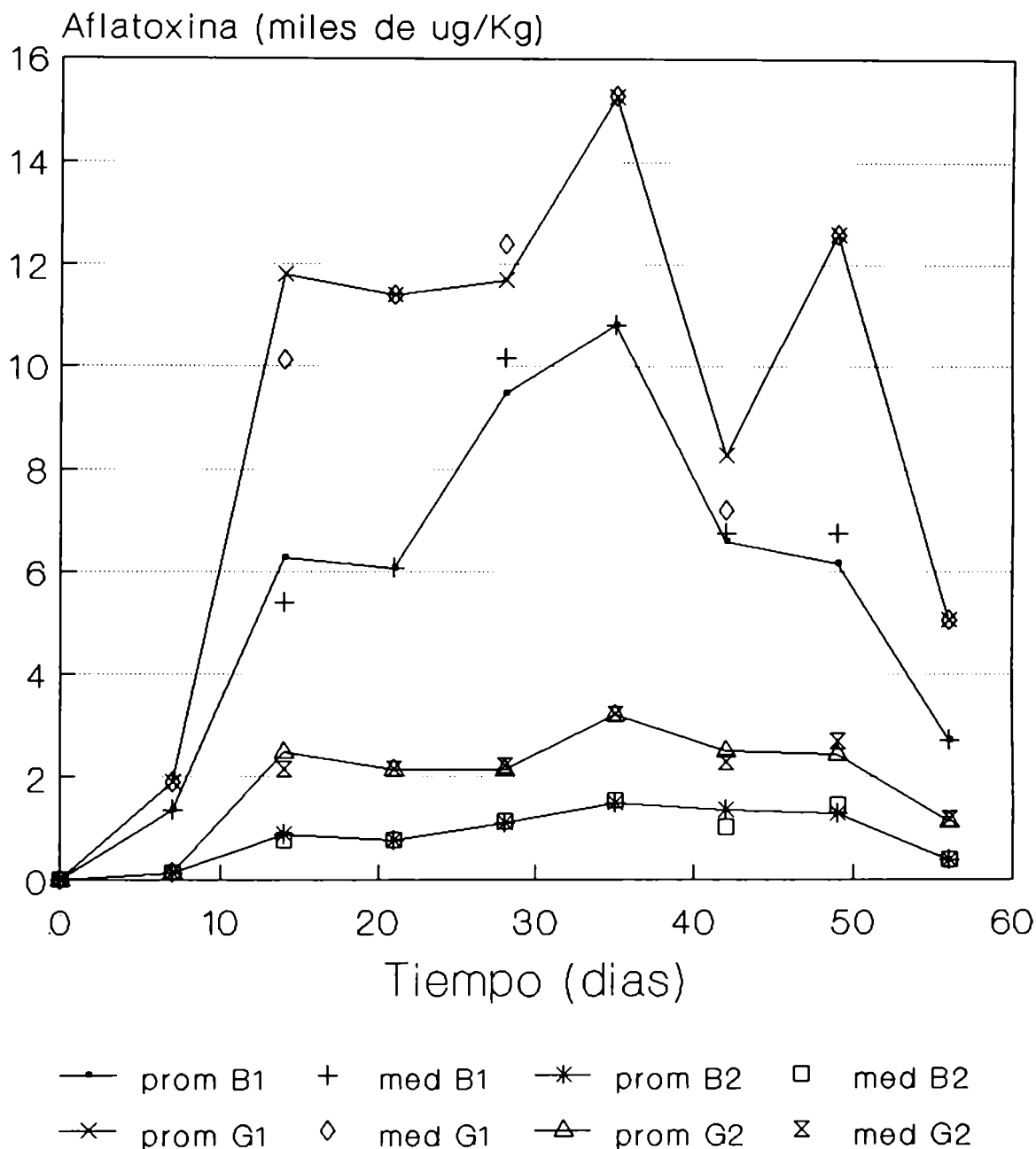
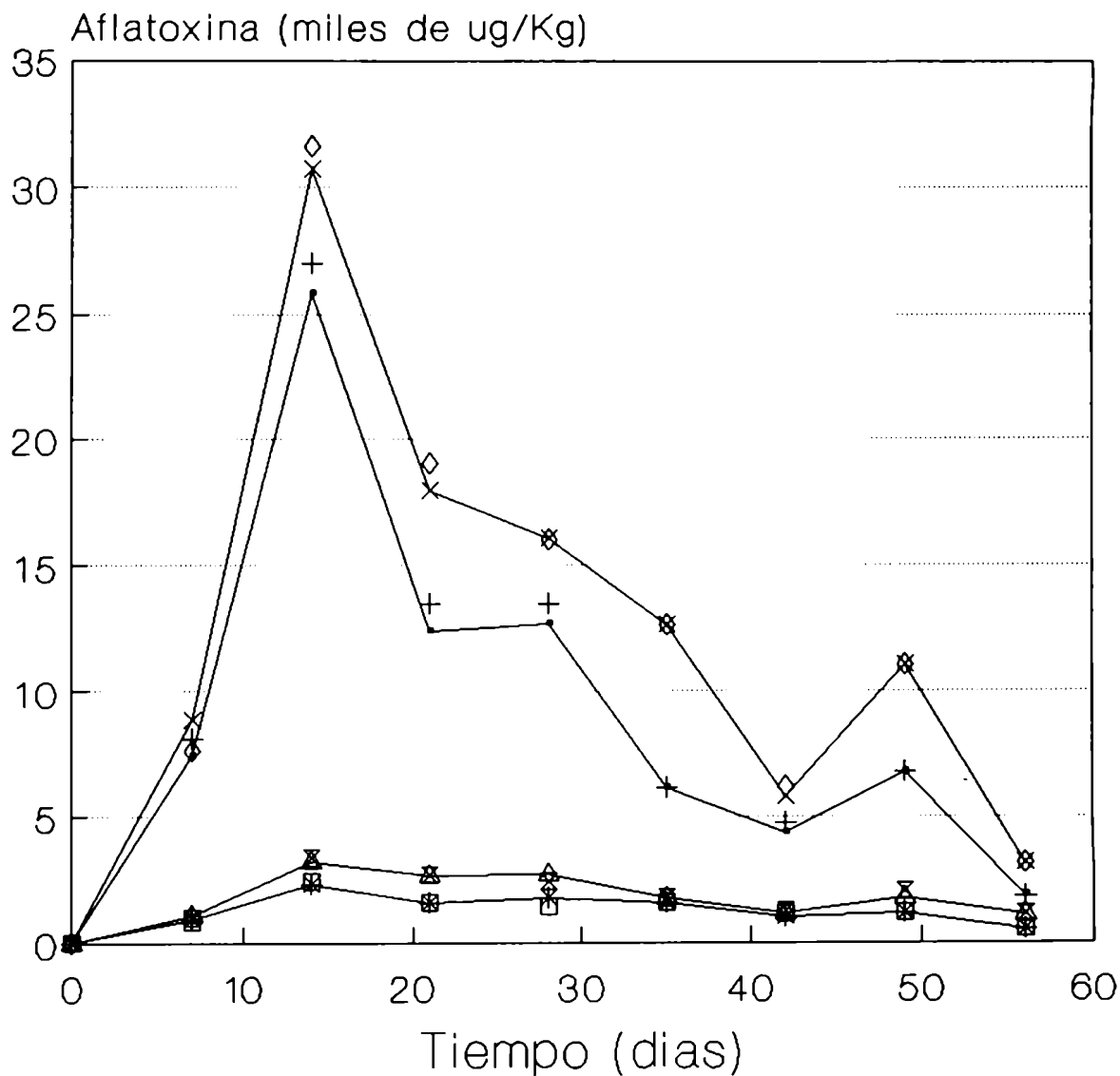


Figura III.7-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en maiz de aw 0.950(25 C).



—●— prom B1 + med B1 —*— prom B2 □ med B2
 —x— prom G1 ◇ med G1 —△— prom G2 ⊗ med G2

En la figura III.7, maíz de a_w 0.950, las curvas de acumulación de AFB₁ y AFG₁ son notoriamente semejantes en cuanto al perfil y a las cantidades acumuladas. Lo mismo se observa en las curvas de AFB₂ respecto a AFG₂. Además es interesante observar que se produce un máximo al cabo de 2 semanas de incubación, seguida de una degradación. Mashaly y El Deeb (1982), sugirieron que altas concentraciones de aflatoxinas podrían estimular al hongo a degradarlas. El material que tiene mayor contenido de humedad es el que presenta mayor crecimiento y esto explicaría la rápida disminución de la concentración de las aflatoxinas en función del tiempo que se observa en figura III.7.

La acumulación de AFG₁ y AFB₁ a a_w 0.950 es mucho mayor que en los otros niveles estudiados. En cambio la acumulación de AFG₂ y AFB₂ no se incrementa prácticamente respecto de los valores de a_w menores (0.925, 0.902, 0.868).

III.3. Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de incubación sobre la acumulación de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en girasol.

En girasol, el nivel más bajo de a_w estudiado fue 0.827, y debido a que no se detectó ninguna de las toxinas durante el período de incubación estudiado, se puede inferir que la a_w limitante en girasol almacenado a 25 °C se encuentra entre 0.827 y 0.851. No se encontró en la literatura ningún valor de a_w limitante relacionado con este sustrato.

En las figuras III.8 a III.12 se presenta la acumulación de las cuatro aflatoxinas en función del tiempo de incubación en girasol con a_w ajustada a los valores 0.851, 0.868, 0.902, 0.925 y 0.950 respectivamente, a una temperatura de 25 °C. En este sustrato al igual que en maíz, se observa una mayor coincidencia entre medias y medianas respecto de lo observado en sorgo.

En la figura III.8, correspondiente a la mínima a_w a la cual se observa acumulación de aflatoxinas (0.851), se destaca un largo período de latencia en la biosíntesis, puesto que las toxinas se comienzan a acumular en el intervalo comprendido entre los 28 y 35 días. Luego de alcanzado el máximo a los 42 días, se presenta una rápida degradación. Las curvas de las cuatro aflatoxinas presentan un perfil semejante, siendo la acumulación de AFG₁ la más importante.

El girasol con a_w 0.868 (figura III.9) muestra que se inicia la acumulación a partir de los 14 días observándose luego un aumento gradual de la concentración hasta obtenerse un máximo en los tiempos estudiados a los 49 días de incubación. Las mayores acumulaciones correspondieron a AFB₁ y AFG₁. También se destaca a este nivel de a_w que los valores de AFB₁ y AFG₁ así como los de AFB₂ y AFG₂ se presentan muy próximos entre sí.

Figura III.8-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en girasol, aw 0.851(25 C).

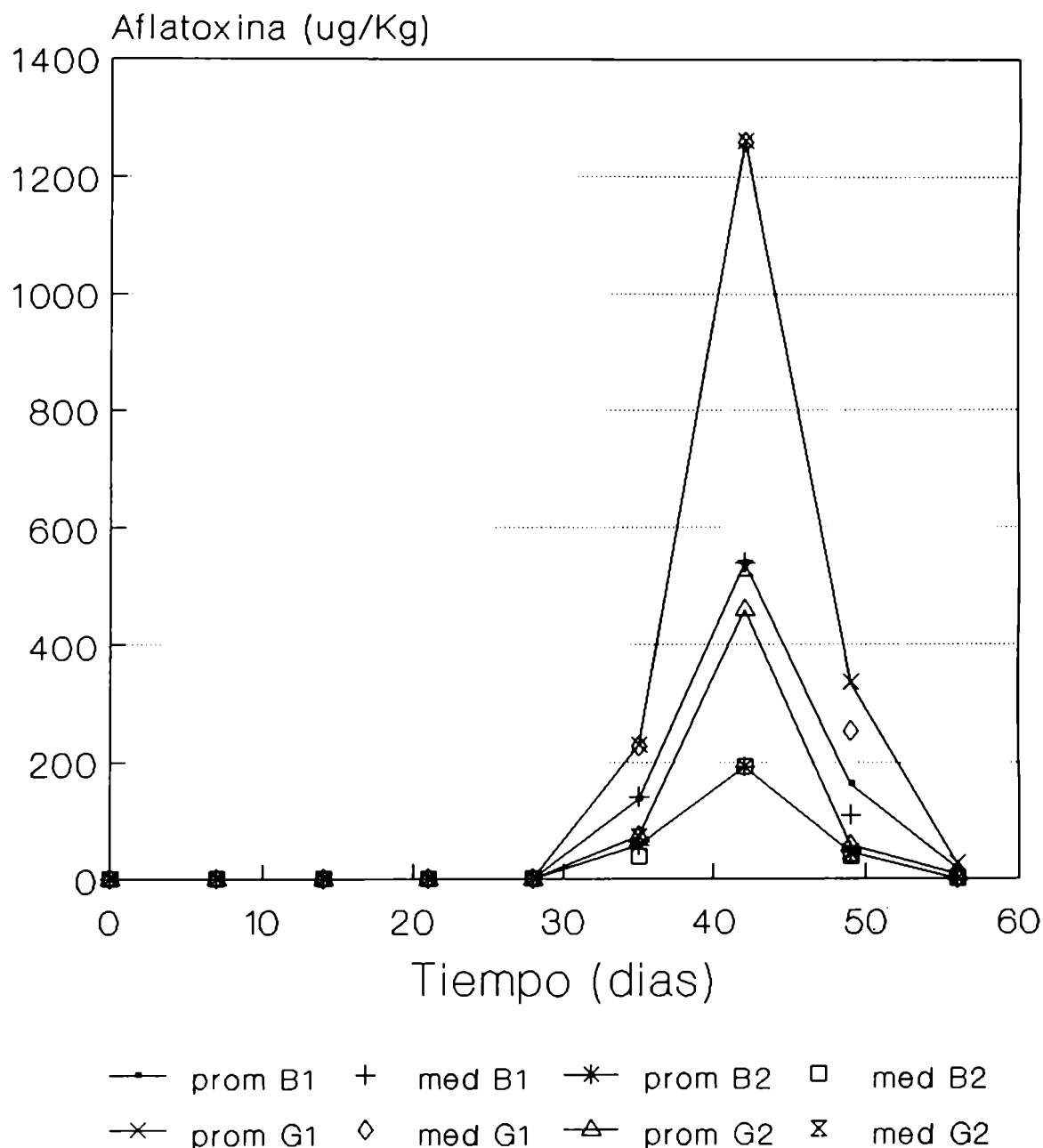
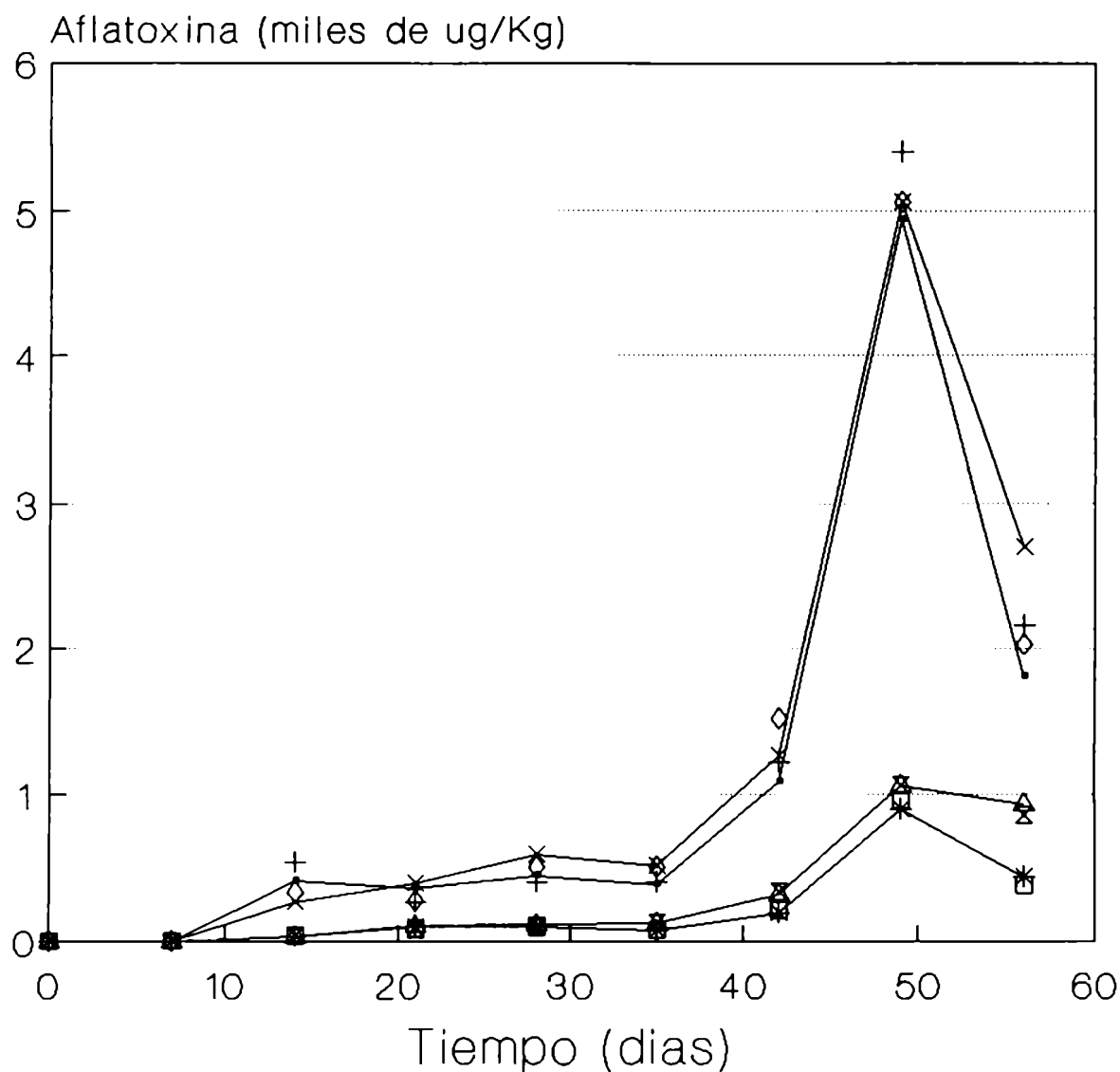


Figura III.9-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en girasol, aw 0.868(25 C).



—●— prom B1 + med B1 —*— prom B2 □ med B2
 —x— prom G1 ◇ med G1 —△— prom G2 ⌘ med G2

Figura III.10-Acumulacion de AFB1,AFB2, AFG1 y AFG2 en girasol, aw 0.902(25 C).

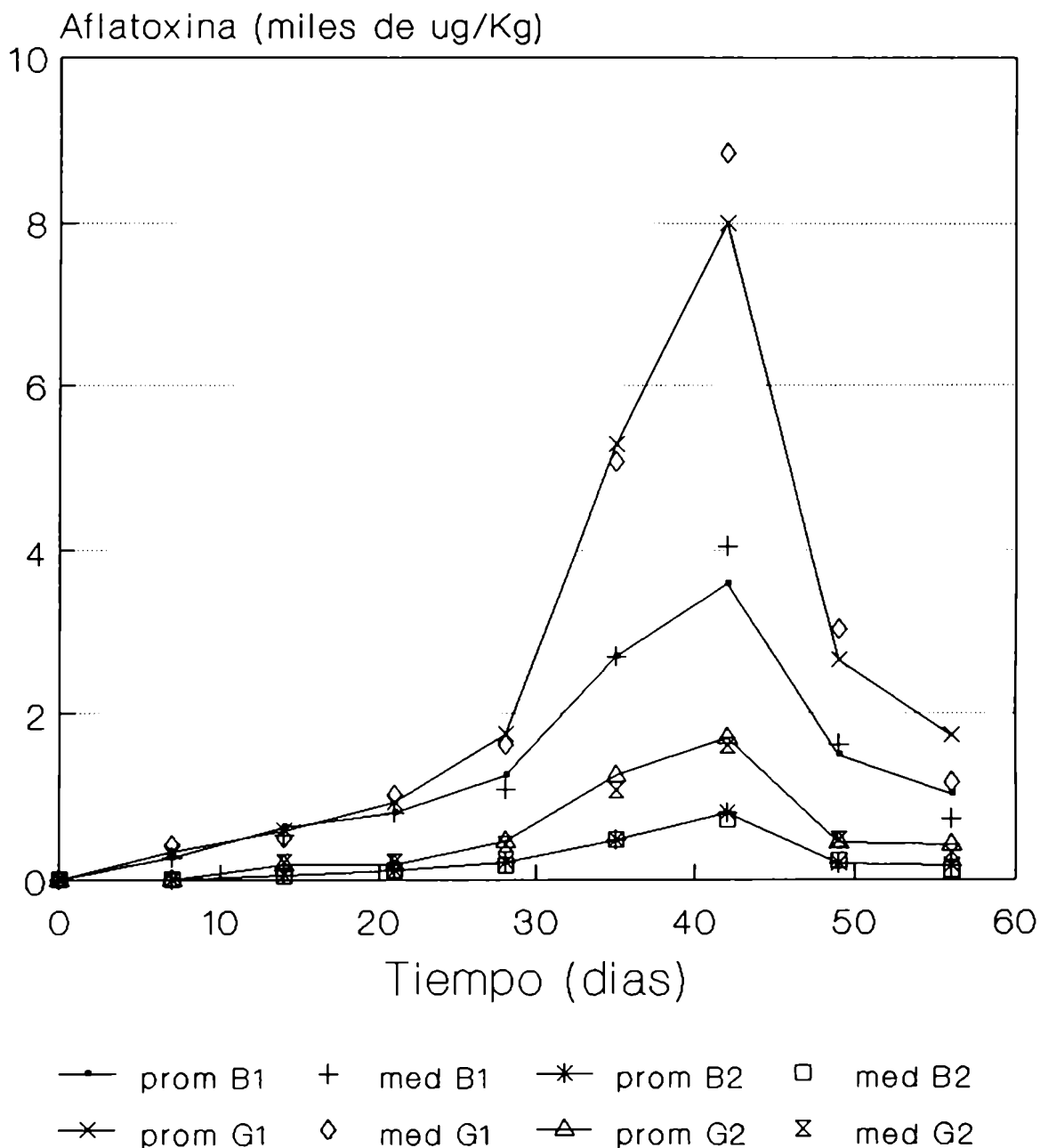
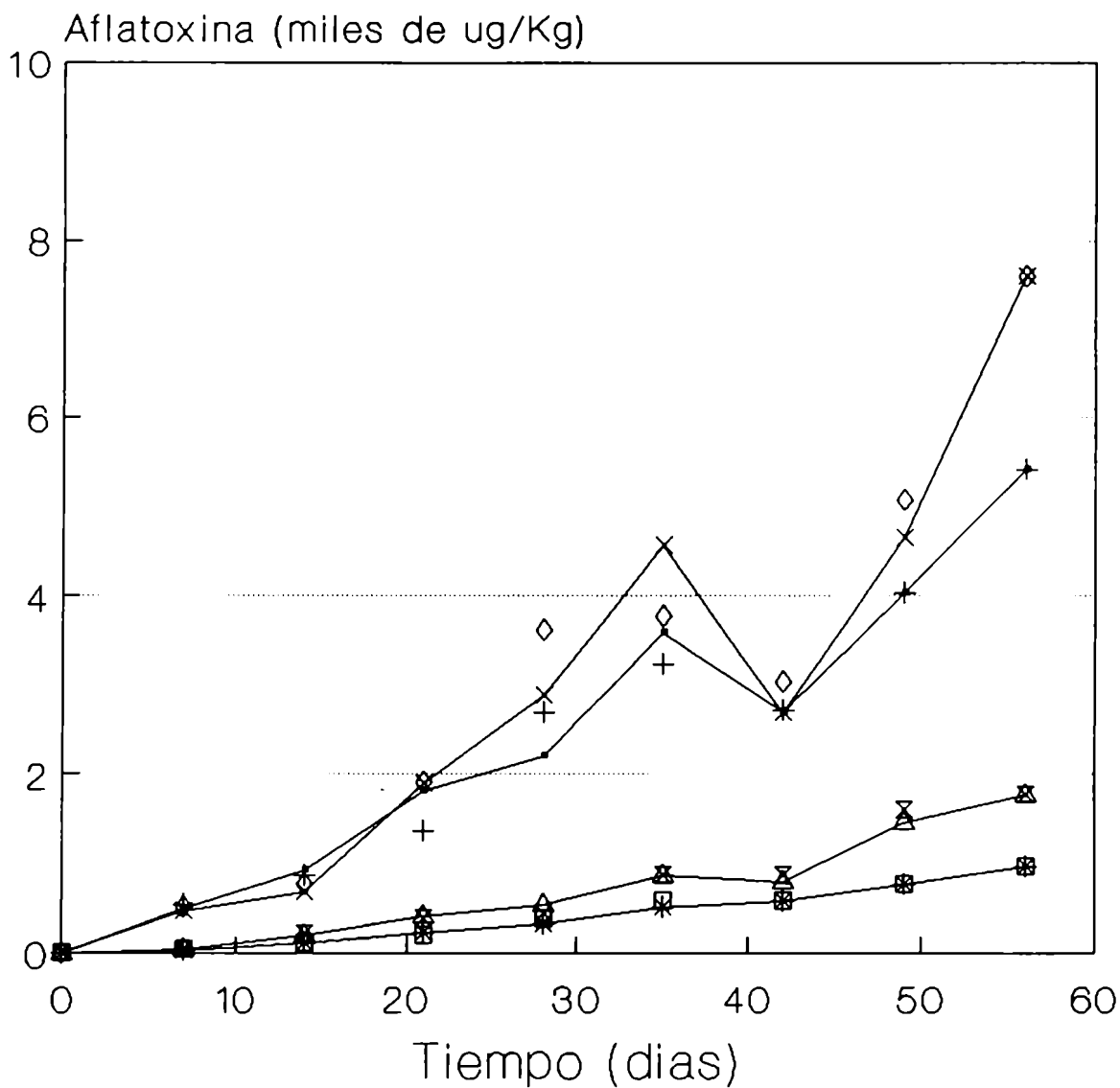
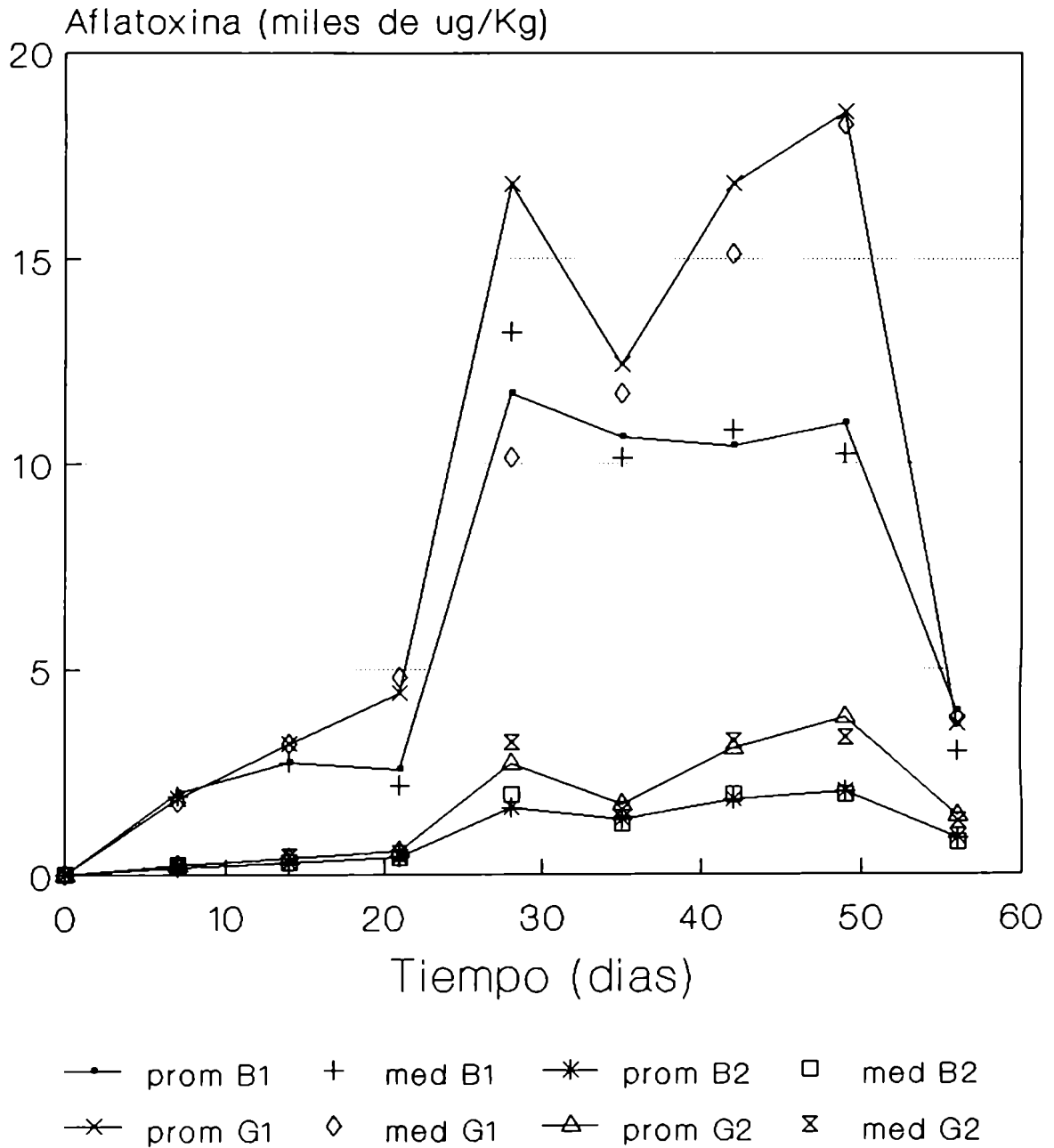


Figura III.11-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en girasol, aw 0.925(25 C).



—●—	prom B1	+ med B1	—*—	prom B2	□ med B2
—x—	prom G1	◇ med G1	—△—	prom G2	⊠ med G2

Figura III.12-Acumulacion de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en girasol, aw 0.950(25 C).



En la figura III.10, correspondiente a a_w 0.902 se observa que al cabo de 7 días es posible detectar AFB₁ y AFG₁ y a los 14 días también AFB₂ y AFG₂. Los resultados demuestran que este contenido de agua del sustrato es muy propicio para la biosíntesis de AFG₁ que alcanza cantidades significativamente mayores respecto de AFB₁, comportamiento realmente contrastante con el observado a a_w 0.868 (figura III.9) en el que las curvas de AFB₁ y AFG₁ se acercaban.

En la figura III.11, girasol de a_w 0.925, se observa un constante aumento de la concentración de AFB₂ y AFG₂ a lo largo del período de incubación sin que se haya alcanzado para estas toxinas la fase de degradación que en general fue observada en todas las demás experiencias con este sustrato. Para las otras dos aflatoxinas, luego de una máxima acumulación a los 35 días y un decrecimiento a los 42 días, se observa un nuevo incremento en la acumulación.

En la figura III.12, girasol de a_w 0.950, se observa que la acumulación de AFB₁ y AFG₁ se ven significativamente favorecidas respecto de AFB₂ y AFG₂ y muestran una alta velocidad de acumulación a partir de los 21 días de incubación.

III.4. Definición de los parámetros cinéticos para el estudio de la acumulación de aflatoxinas.

Algunos autores, a fin de estudiar el efecto de diferentes sustratos o de distintos componentes del mismo o bien el comportamiento de diversas variedades o híbridos sobre la producción de toxinas, realizan entre una a tres determinaciones en el tiempo: 7 días, Nagarajan y col. (1974); 2 semanas, Llewellyn y Eadie (1974); 21 días, Diener y Davis (1977); 48 y 72 horas, Winn y Lane (1978); 10 y 21 días, Park y Bullerman (1983b); 20, 30 y 50 días para comparar cultivares de cebada, Chang y Markakis (1980).

Cuando se analiza la acumulación de aflatoxinas en función del tiempo (Fig. III.1 a III.12) se observa que en ciertos períodos la concentración es creciente y en otros disminuye. Por ello no es adecuado la elección de tiempos fijos para realizar este tipo de estudio. Es conveniente elegir un período con una extensión razonable en el tiempo, e incluir un número suficiente de determinaciones que permitan tener conocimiento de la tendencia global de la acumulación.

En relación a la influencia del contenido de agua del material sobre la producción de micotoxinas, algunos autores extraen conclusiones comparando resultados obtenidos a un único tiempo. Diener y Davis (1977) estudiaron la acumulación de aflatoxinas luego de 21 días de incubación en maní sano maduro, partido maduro e inmaduro en función de la a_w . Chang y Markakis (1980), analizaron la influencia de la humedad sobre la acumulación de aflatoxinas en cebada al cabo de 20 días. Niles y col (1985), estudiaron el efecto combinado de la a_w y la temperatura sobre la producción de aflatoxinas en trigo luego de 30 días de

incubación. Durakovik y col. (1987) observaron el cambio en la acumulación de AFB₁ y AFG₁ en maíz entero y partido a contenidos de humedad de 20, 30 y 40% a los 70 días de incubación comparado con los máximos de ambas toxinas obtenidos a 14 y 21 días respectivamente.

En la figura III.13 se presenta la variación de las aflatoxinas totales (AFT), suma de AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂, en función del tiempo de incubación a los distintos valores de a_w estudiados en maíz en el presente trabajo.

Como se puede observar, el tiempo necesario para alcanzar la máxima producción depende del nivel de a_w del sustrato. Un análisis a los 35 días mostraría que la a_w 0.925 es la que presenta la mayor acumulación, pero si el estudio se realizara a los 14 días la a_w de máxima acumulación es 0.950.

La metodología de un único tiempo (o pocos puntos en un período corto), no permite conocer el comportamiento completo de la acumulación y puede conducir a conclusiones contradictorias o erróneas. Situaciones que en algunos trabajos mencionados se interpretan como inhibición o resistencia a la contaminación (Nagarajan y col., 1974), pueden ser en realidad un retraso en la iniciación de la producción debidas a que algunos de los datos que se comparan corresponden a fases en las que prevalece o bien la degradación o bien la acumulación.

De acuerdo con lo expuesto, conviene obtener las curvas de acumulación. La evaluación de las mismas permite calcular los parámetros cinéticos que se definen a continuación y se ejemplifican en la figura III.14.

- * P_i : Período en el que se inicia la acumulación de cantidades detectables de aflatoxinas. La notación $(a, b]$ indica que la toxina comienza a acumularse en algún momento entre los días a y b donde a es el tiempo de la determinación anterior y b el tiempo en el que se detectó la toxina.
- * T_m : Tiempo en el que se alcanza el valor máximo absoluto en el período de incubación. Cuando éste es observado en más de una situación el T_m se obtuvo a partir del promedio ponderado de los datos correspondientes y fue expresado con un asterisco (*).
- * A_m : Máximo valor de la concentración de aflatoxinas alcanzado en el período de incubación estudiado.

Estos parámetros serán aplicados en el presente trabajo para analizar la influencia de la a_w , el tiempo de almacenamiento y el sustrato sobre la acumulación de aflatoxinas por *A. parasiticus*.

Figura III.13-Acumulacion de AFT en maiz a diferentes aw.

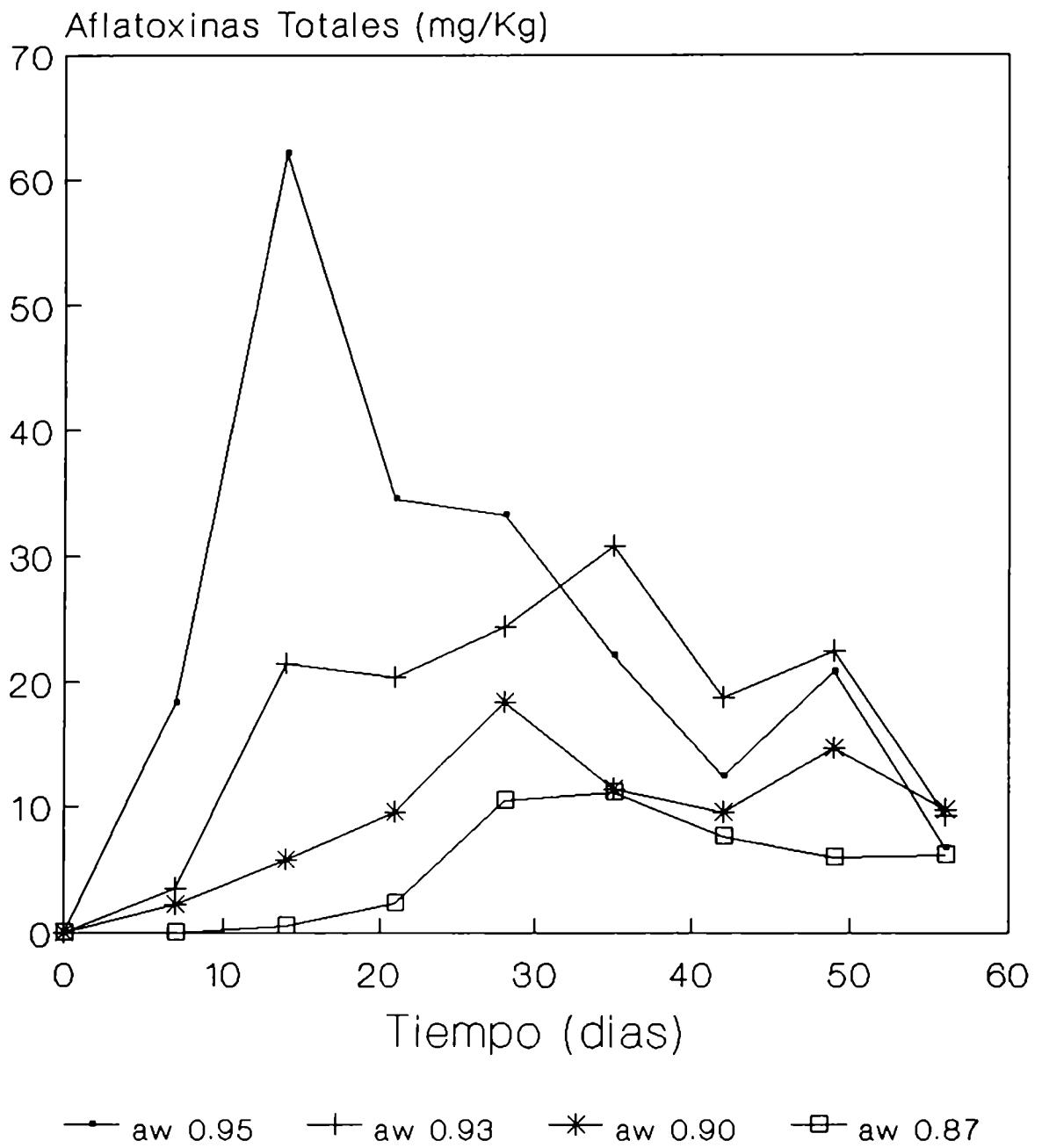
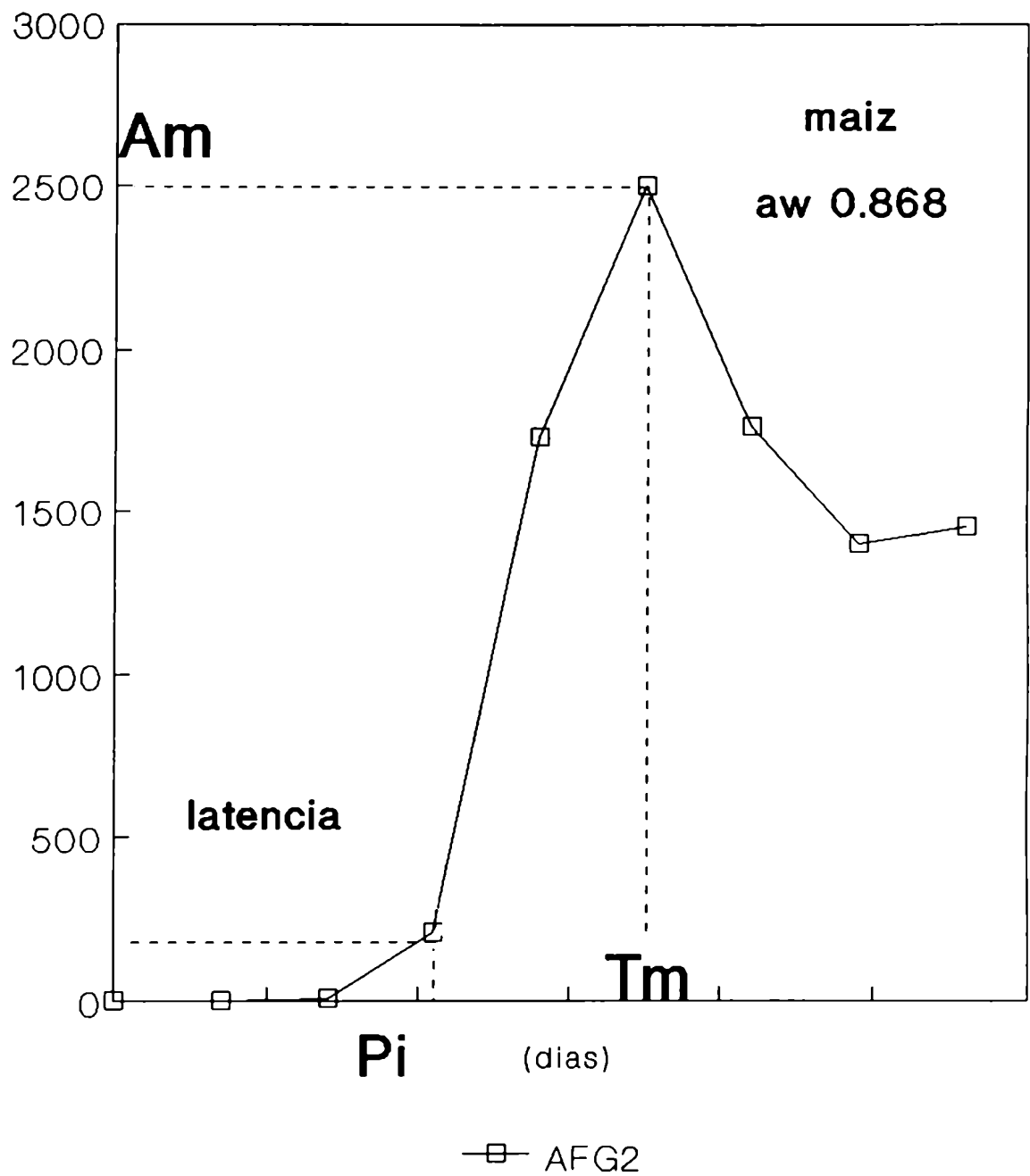


Figura III.14 - Definición de los
Parametros Cineticos.



III.5. Influencia de la actividad acuosa sobre los parámetros cinéticos en sorgo.

En las Tablas III.1 y III.2 se ilustra la influencia de la a_w sobre los parámetros cinéticos definidos en III.4 (P_i , T_m y A_m). La mínima a_w a la cual se produce biosíntesis de las aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en sorgo a 25 °C es 0.902. A a_w 0.868 y 0.851 no se detectaron aflatoxinas a lo largo de las 8 semanas de incubación en las que fueron realizados los análisis. En todos los casos se observa que a medida que disminuye la a_w , la A_m es menor a la vez que aumenta el P_i .

En cuanto al tiempo requerido para alcanzar el valor máximo (T_m) parece ser independiente del nivel de a_w para AFB₁, AFG₁ y AFG₂, mientras que disminuye para AFB₂ al aumentar la a_w . Esta toxina es la se acumula en menor cantidad para los niveles 0.925 y 0.950. A a_w 0.902 se detecta sólo a los 42 días.

Es interesante analizar el efecto de la a_w sobre los valores de A_m . Cuando la a_w disminuye de 0.950 a 0.925 se observa una reducción de siete veces en la concentración máxima de AFB₁, y casi nueve veces en AFG₁. La reducción es de dos o tres veces para AFG₂ y AFB₂ respectivamente. Cuando el nivel de a_w disminuye de 0.925 a 0.902, se produce también una reducción de A_m . En el caso de AFB₁, AFG₁ y AFG₂ esta reducción (entre diecisiete a treinta veces) es mucho mayor que en el caso anterior, cuando la a_w baja de 0.950 a 0.925.

Por todo lo expuesto surge que pequeñas variaciones de la a_w pueden ejercer un marcado efecto en la acumulación de aflatoxinas en este sustrato. Esta característica es importante durante el almacenamiento, ya que la presencia de zonas de alta humedad generaría contaminaciones peligrosamente altas en forma localizada.

III.6. Influencia de la actividad acuosa sobre los parámetros cinéticos en maíz.

En las Tablas III.3 y III.4 se presentan los parámetros cinéticos en función de la actividad acuosa para AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en maíz. La actividad acuosa más baja a la que se produce toxina es 0.868 mientras que una a_w de 0.851 resultó inhibitoria para la biosíntesis de aflatoxinas en el período estudiado.

A la actividad acuosa 0.868 se presenta un retardo en la iniciación de la acumulación de todas las aflatoxinas en este sustrato (P_i 14 días) respecto de los valores obtenidos a los niveles mayores de a_w .

La A_m aumenta con la a_w , siendo la magnitud del incremento dependiente de la toxina. Por ejemplo, la A_m de AFB₁ en el rango de a_w 0.868 a 0.950 muestra un aumento de nueve veces y para AFB₂ y AFG₁ fue de 4.2 y 4.7 respectivamente. Por su lado AFG₂ presenta un comportamiento diferente, ya que no se observa una disminución al variar entre 0.950 a 0.868. Este resultado indicaría que el agua disponible del sustrato

Tabla III.1-Parametros Cineticos de AFB1 y AFB2 en sorgo.

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	-----	-----	-----
0.902	(14-21]	35	54
0.925	(0-7]	35	1080
0.950	(0-4]	35	8100

Sorgo - AFB1

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	-----	-----	-----
0.902	(35-42]	42	24
0.925	(7-11]	35	87
0.950	(0- 4]	21	288

Sorgo - AFB2

Tabla III.2-Parametros Cineticos de AFG1 y AFG2 en sorgo.

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	-----	-----	-----
0.902	(7-21]	39•	86
0.925	(4- 7]	36	1623
0.950	(0- 4]	36	13260

Sorgo - AFG1

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	-----	-----	-----
0.902	(28-35]	36	11
0.925	(7- 11]	36	226
0.950	(0- 4]	35•	430

Sorgo - AFG2

Tabla III.3-Parametros Cineticos de AFB1 y AFB2 en maiz.

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	----	-----	-----
0.868	(7-14]	32•	2900
0.902	(0-7]	28	5400
0.925	(0-7]	36	10800
0.950	(0-7]	14	27000

Maiz - AFB1

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	(7-14]	36	604
0.902	(0-7]	42•	773
0.925	(0-7]	42	2060
0.950	(0-7]	28	2537

Maiz - AFB2

Tabla III.4-Parametros cineticos de AFG1 y AFG2 en maiz.

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	(7-14]	28	5600
0.902	(0- 7]	36	10120
0.926	(0- 7]	35	16280
0.950	(0- 7]	14	31600

Maiz - AFG1

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.851	-----	-----	-----
0.868	(7-14]	35	2600
0.902	(0- 7]	35	2270
0.926	(0- 7]	42	3900
0.950	(0- 7]	28	3500

Maiz - AFG2

afecta de diferente manera la biosíntesis de los cuatro metabolitos producidos por *A. parasiticus*.

Para las cuatro aflatoxinas, los valores menores de T_m se observan al nivel más alto de a_w (0.950).

III.7. Influencia de la actividad acuosa sobre los parámetros cinéticos en girasol.

En las tablas III.5 y III.6 se presenta la influencia de la a_w sobre los parámetros cinéticos de la acumulación de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en girasol. Un pequeño aumento en la a_w , de 0.851 a 0.868, tiene un efecto marcado en la concentración máxima alcanzada (A_m), que muestra un crecimiento de 10 veces para AFB₁, 5 para AFB₂, 4 para AFG₁ y 2.5 para AFG₂. Sin lugar a dudas la a_w 0.950 es la que presenta la mayor acumulación con un crecimiento de la A_m desde la a_w menor (0.851) a la mayor (0.950) que varía de 8 para AFG₂ a 21 veces para AFB₁. Las variaciones para los valores de A_m de las actividades acuosas intermedias no presentan una tendencia definida. Los T_m de las cuatro aflatoxinas son altos, mayores a los 40 días para casi todas las actividades acuosas, excepto el T_m de AFB₁ y AFG₁ a a_w 0.950 que son de 28 y 35 días.

III.8. Comparación de los parámetros cinéticos de acumulación de aflatoxinas totales en girasol, maíz y sorgo.

La acumulación de las aflatoxinas totales se obtuvo sumando las concentraciones detectadas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ en cada tiempo estudiado. De acuerdo a esta definición el P_i resulta ser el período correspondiente a la toxina detectada más precozmente.

Para cada uno de los niveles de a_w considerados se analiza comparativamente el P_i , T_m y A_m entre los tres sustratos, correspondiendo la parte superior de las figuras III.15 a III.19 a los dos primeros parámetros y la parte inferior a la acumulación máxima de AFT.

La menor actividad acuosa a la cual se observa producción de aflatoxinas es 0.851 y solamente ocurre en girasol (figura III.15). Los valores de P_i y T_m son bastante elevados (35 días y 42 días respectivamente) y la cantidad máxima acumulada es 540 $\mu\text{g}/\text{kg}$, indicando que en estas condiciones ambientales la biosíntesis de aflatoxinas está totalmente restringida en maíz y sorgo, siendo los valores observados en girasol relativamente bajos.

En la tabla III.7 figuran los valores de a_w mínimos encontrados en bibliografía para la acumulación de aflatoxinas en productos agrícolas. Para la construcción de la misma se han considerado solamente aquellos trabajos en los cuales se había informado el nivel de a_w del sustrato o aquellos en los que el mismo pudo ser calculado en forma aproximada.

Tabla III.5-Parametros Cineticos de AFB1 y AFB2 en girasol.

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.827	-----	-----	-----
0.851	(28-35]	42	540
0.868	(7- 14]	49	5400
0.902	(0 - 7]	42	4050
0.925	(0 - 7]	51*	5400
0.950	(0 - 7]	28	13800

Girasol - AFB1

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.827	-----	-----	-----
0.851	(28-35]	42	192
0.868	(7 -14]	49	960
0.902	(7 -14]	42	960
0.925	(0 - 7]	56	960
0.950	(0 - 7]	49	2560

Girasol - AFB2

Tabla III.6. Parametros Cineticos de AFG1 y AFG2 en girasol.

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.827	-----	-----	-----
0.861	(28-36]	42	1264
0.868	(7 -14]	49	5060
0.902	(0 - 7]	42	8840
0.925	(0 - 7]	51•	7600
0.950	(0 - 7]	35•	20240

Girasol - AFG1

aw	Pi (dias)	Tm (dias)	Am (ug/Kg)
0.827	-----	-----	-----
0.861	(28-36]	42	530
0.868	(7 -14]	56	1288
0.902	(7 -14]	42	2150
0.925	(0 - 7]	56	1760
0.950	(0 - 7]	49	4293

Girasol - AFG2

Figura III.15. Parametros CINETICOS de la acumulacion de AFT en los distintos sustratos a aw 0.851.

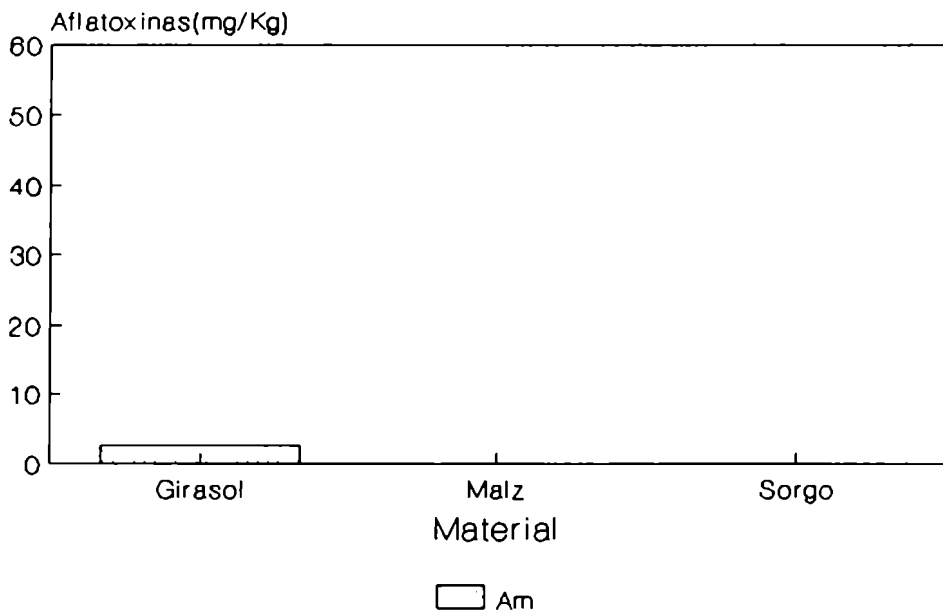
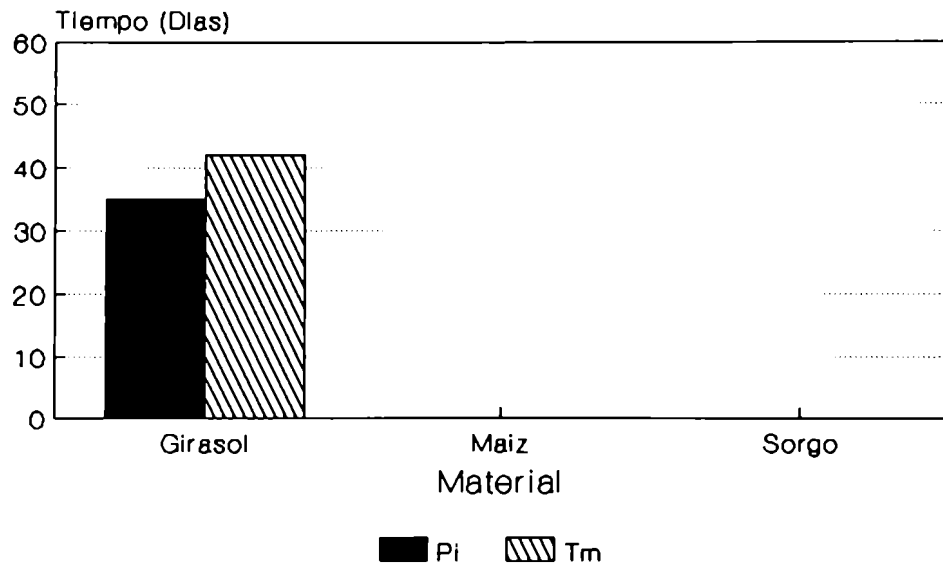


Figura III.16. Parametros Cineticos de Acumulacion de AFT en los distintos sustratos a aw 0.868.

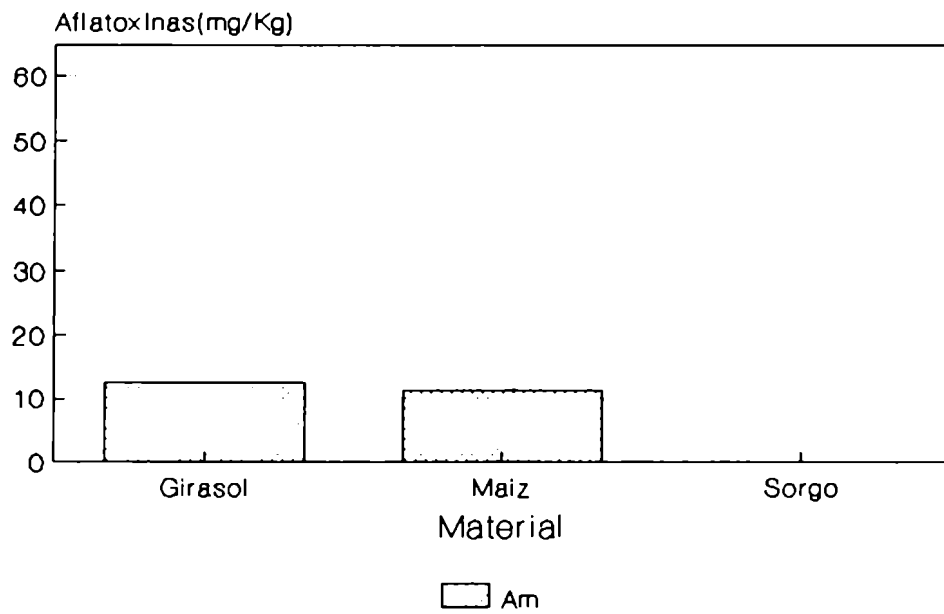
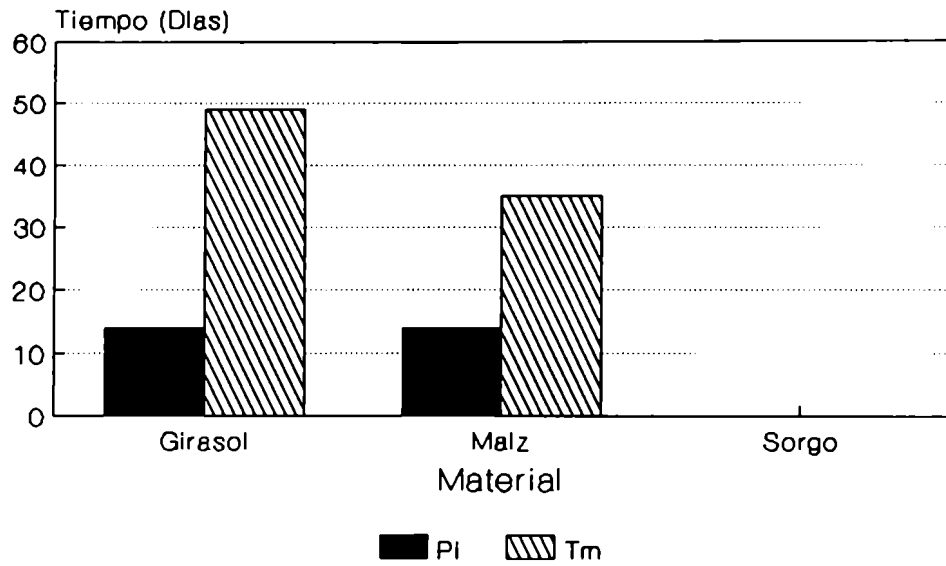


Figura III.17. Parametros Cineticos de Acumulacion de AFT en los distintos sustratos a aw 0.902.

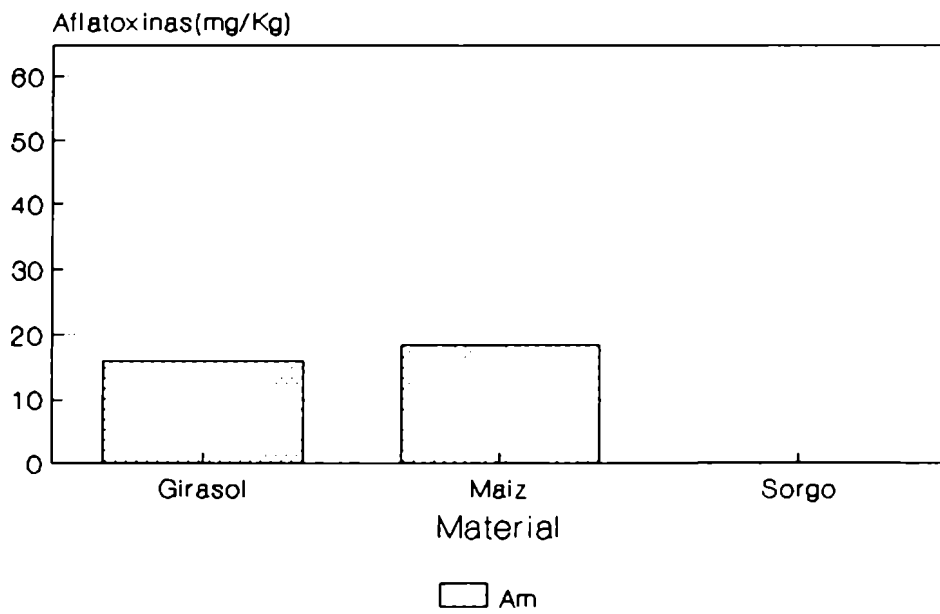
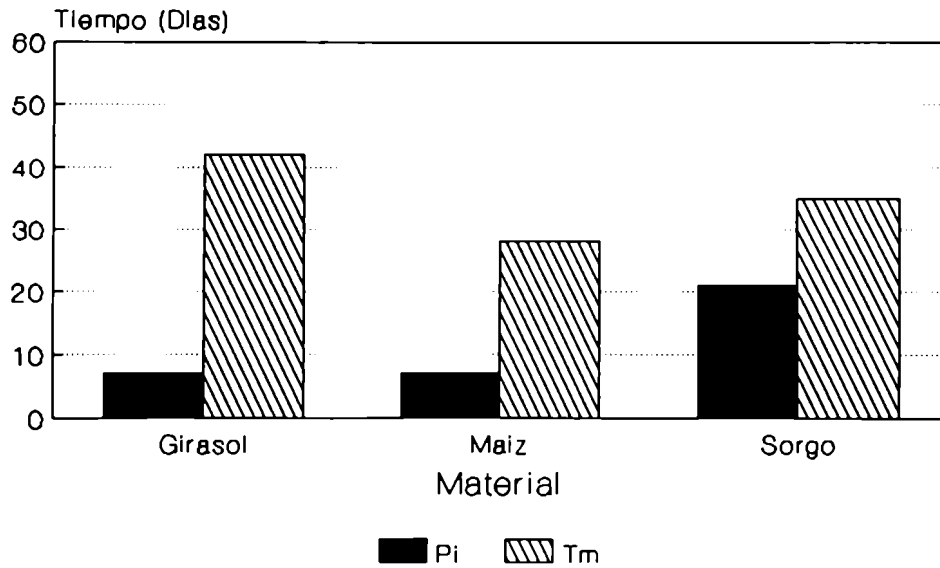


Figura III.18. Parametros Cineticos de Acumulacion de AFT en los distintos sustratos a aw 0.925.

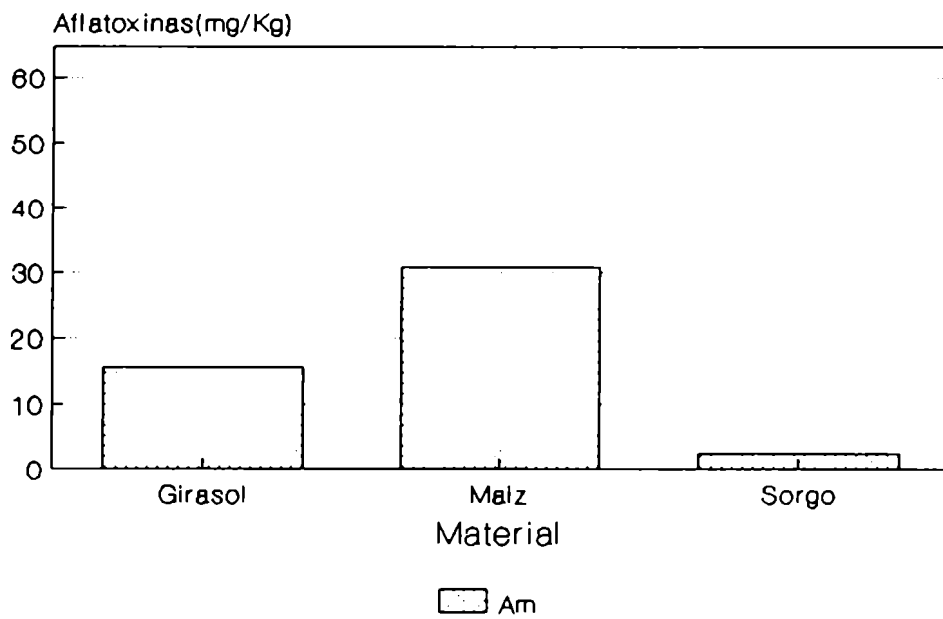
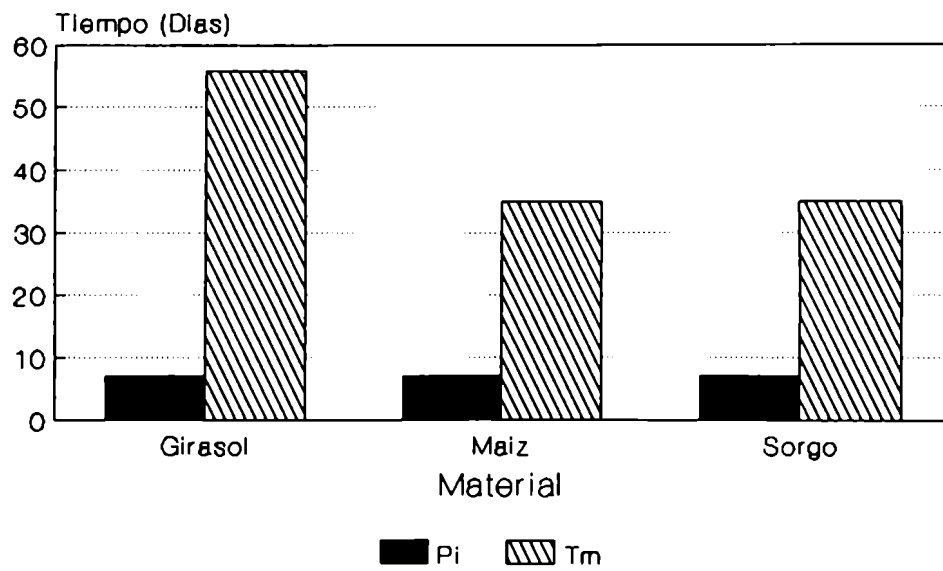


Figura III.19. Parametros CINETICOS de Acumulacion de AFT en los distintos sustratos de aw 0.950.

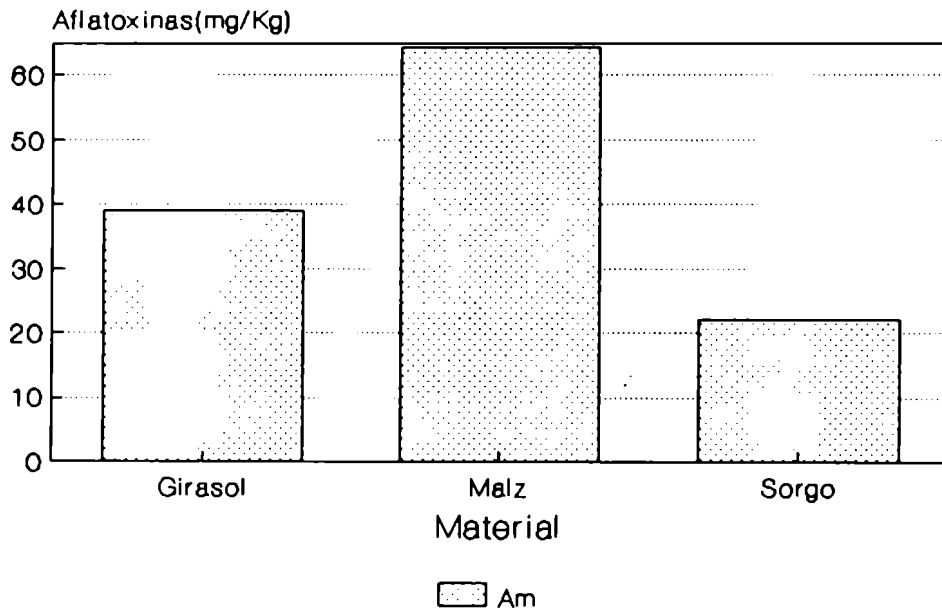
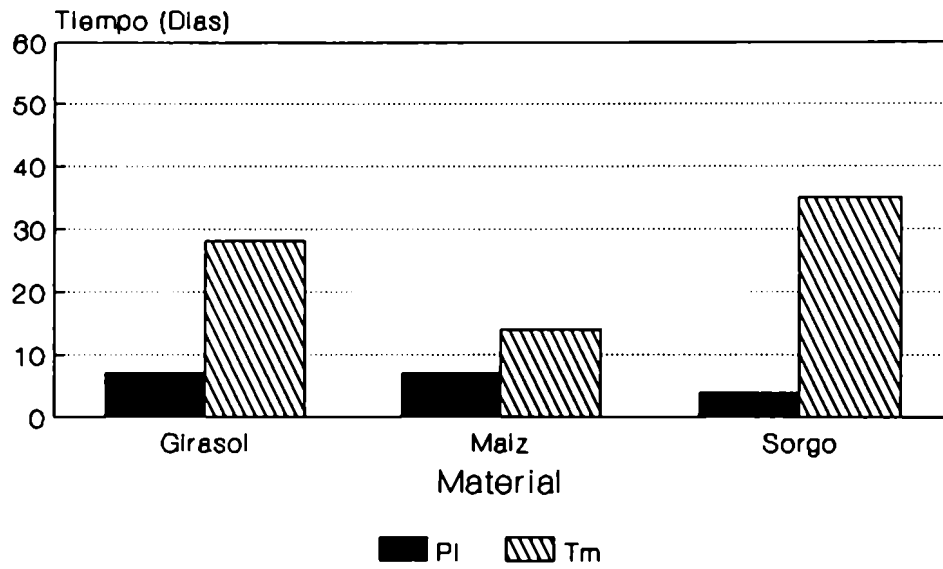


TABLA III.7

Valores limitantes de a_w para la acumulación de aflatoxinas en diferentes productos agrícolas

Producto	Hongo	a_w mín	T	Referencias
Trigo	<i>A. parasiticus</i>	0.90	20° C	Niles y col. (1985)
Avellanas	<i>A. parasiticus</i>	0.70	20° C	Sanchis y col. (1988)
Caupí (poroto)	<i>A. flavus</i>	0.89	21° C	Koehler y col. (1985)
Maíz	<i>A. parasiticus</i>	~0.90*	24 a 28° C	Rambo y col. (1975)
	<i>A. flavus</i>			
Maíz	<i>A. flavus</i>	0.87*	24° C	Trenk y Hartman (1970)
Maíz	<i>A. flavus</i>	0.86	25° C	Hunter (1969)
Soja	<i>A. parasiticus</i>	0.865	25° C	Fernández P. y col.(1991 a)
Trigo	<i>A. parasiticus</i>	0.875	25° C	Niles y col. (1985)
Arroz	<i>A. flavus</i>	0.85	25° C	Boller y Schroeder (1974)
Maíz	<i>A. flavus</i>	0.89	26° C	Trucksess y col. (1988)
Soja	<i>A. flavus</i>	0.88	26° C	Trucksess y col. (1988)
Porotos pintos	<i>A. flavus</i>	0.85	26° C	Trucksess y col. (1988)
Maíz	<i>A. flavus</i>	0.86	28° C	Sauer y Burroughs (1980)
Pistacho	<i>A. flavus</i>	0.85	29° C	Denizel y col. (1975)
Arroz	<i>A. parasiticus</i>	0.80	30° C	Boller y Schroeder (1974)
Maní(esterilizado)	<i>A. flavus</i>	0.82-0.84	30° C	Diener y Davis (1977)
Maní(desinfectado)	<i>A. flavus</i>	0.83-0.85	30° C	Diener y Davis (1977)
Maíz	<i>A. parasiticus</i>	< 0.87	30° C	Montani y col. (1988 b)
Caupí	<i>A. flavus</i>	0.82	30 y 37° C	Koehler y col. (1985)
Trigo	<i>A. flavus</i>	0.825	40° C	Niles y col. (1985)
Trigo	<i>A. flavus</i>	0.90	42.5° C	Niles y col. (1985)

* (valores estimados)

Se observa que la a_w limitante depende de la interacción entre los factores que integran el triángulo sustrato, cepa, medio ambiente.

No se han encontrado en bibliografía datos referidos a los valores de a_w limitantes para la producción de aflatoxinas en sorgo y girasol. A la temperatura utilizada en el presente trabajo (25° C), Hunter (1969) reportó un valor limitante de a_w 0.86 para la acumulación de aflatoxinas en maíz que es similar al obtenido en este trabajo. El único

valor que llama la atención por ser mucho menor que los observados por otros autores y los de este trabajo es el obtenido por Sanchis y col. (1988). Estos autores, trabajando con avellanas a 20 °C encontraron una producción de 12 ppm a a_w 0.70. La medición de la a_w se realizó antes del agregado del inóculo. Este consistió en una suspensión de esporas cuyo nivel de a_w no fue ajustado al del sustrato. Seguramente entonces la muestra varió su a_w localmente luego de agregado el inóculo, de allí el nivel de acumulación observado en el trabajo.

Con respecto al maíz y girasol de a_w 0.868 (figura III.16) se observa que los valores máximos de aflatoxinas totales (AFT) son semejantes como también los períodos necesarios para que se inicie la acumulación; sin embargo el tiempo para alcanzar el máximo (T_m) es menor en maíz que en girasol.

Los parámetros obtenidos para las AFT en maíz, sorgo y girasol de a_w 0.902 (figura III.17) muestran que el girasol y el maíz empiezan a acumular toxinas dentro del mismo período, mientras que se presenta un retardo de dos semanas para el sorgo.

Las acumulaciones máximas de AFT son semejantes en maíz y girasol mientras que la observada en soja es mucho menor. El tiempo necesario para alcanzar el valor máximo de AFT en sorgo es intermedio entre aquel que corresponde al maíz y al girasol siendo el de este último el mayor.

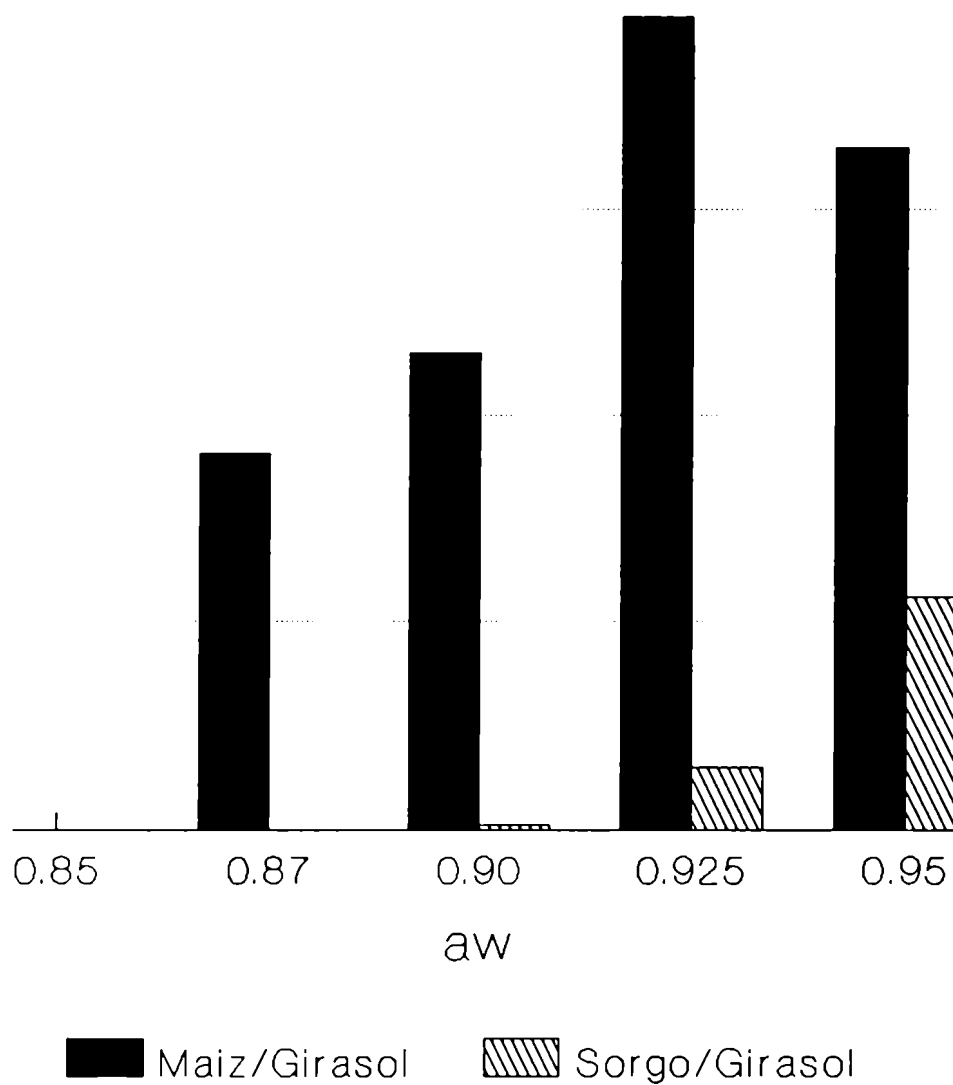
A a_w 0.925 (figura III.18) se empieza a detectar toxinas en los tres materiales dentro del mismo período. En girasol se observa que transcurre el mayor tiempo para alcanzar el valor máximo con respecto a los otros sustratos. En el maíz se acumula más que en girasol y en este más que en sorgo.

La actividad acuosa más alta estudiada (0.950), muestra resultados interesantes al comparar los tres sustratos (figura III.19). En maíz se acumula mayor cantidad de AFT, y este valor se alcanza en el menor tiempo; significa que presenta la mayor velocidad de acumulación, mientras que la menor se registra en sorgo.

En la figura III.20 se presenta la relación de las A_m de las AFT entre los distintos sustratos en función de la a_w . A medida que aumenta la a_w en el rango 0.868–0.925, aumenta la relación de AFT acumuladas en maíz respecto de girasol. A 0.950, a pesar de ser mayor las AFT en maíz respecto de girasol, la relación tiende a disminuir.

Cuando se compara el sorgo con respecto al girasol, se observa que a medida que aumenta la a_w la relación también se hace mayor, si bien la cantidad de AFT acumuladas en girasol siempre es superior. El sorgo, por lo tanto, a todos los niveles de a_w estudiados resulta ser un sustrato poco propicio desde el punto de vista de las máximas cantidades acumuladas.

Figura III.20-Acumulacion maxima de AFT.Relacion entre materiales



III.9. Comparación entre girasol, maíz y sorgo de las acumulaciones máximas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂.

En las figuras III.21.a y III.21.b se presenta la acumulación máxima de AFB₁ y AFG₁ en los distintos materiales a los diferentes niveles de a_w estudiados. Se observa que AFB₁ a a_w 0.868 (figura III.21.a), se acumula dos veces más en girasol que en maíz. Al aumentar la actividad acuosa este último resulta ser el sustrato más favorable a la acumulación de esta toxina. La concentración acumulada en sorgo siempre es menor que en los otros dos sustratos.

La figura III.21.b muestra que para todos los niveles de a_w se acumula mayor cantidad de AFG₁ en maíz que en girasol, siendo este efecto mucho más marcado a a_w 0.925 y a a_w 0.950. En forma similar a lo observado para AFB₁, la menor acumulación de AFG₁ se observa en sorgo aumentando a medida que se incrementa la a_w .

En la figura III.22.a se observa que la a_w 0.925 resulta propicia para la acumulación de AFB₂ en maíz mientras que a los otros niveles de a_w se acumula menos en ese sustrato que en girasol.

En la figura III.22.b se observa que la acumulación de AFG₂ en maíz es mayor que en girasol en el rango de a_w 0.868 a 0.925. A a_w 0.950 el girasol resulta ser el sustrato en el cual la acumulación de esta toxina es mayor. Cabe destacar que a a_w 0.868 el comportamiento de los sustratos en relación a la acumulación de AFG₂ es diferente respecto de lo observado para las otras aflatoxinas, ya que a esta a_w se incrementa notoriamente la acumulación en maíz.

III.10. Relaciones entre las acumulaciones máximas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ para los distintos materiales.

Las figuras III.23.a a III.25.b presentan las relaciones de la acumulación máxima de las cuatro aflatoxinas tomadas de a pares a las diferentes actividades acuosas de girasol, maíz y sorgo.

En la figura III.23.a se puede observar que para los tres sustratos en estudio y todos los niveles de a_w , AFG₁ aventaja en sus acumulaciones máximas a AFB₁ excepto en girasol de a_w 0.868, donde la A_m de AFB₁ resulta mayor. En sorgo se observa una disminución de la relación de AFB₁ a AFG₁ a medida que aumenta la a_w . En maíz esta relación presenta un incremento a medida que aumenta la a_w .

Figura III.21.a-Acumulacion maxima de AFB1.Relacion entre materiales.

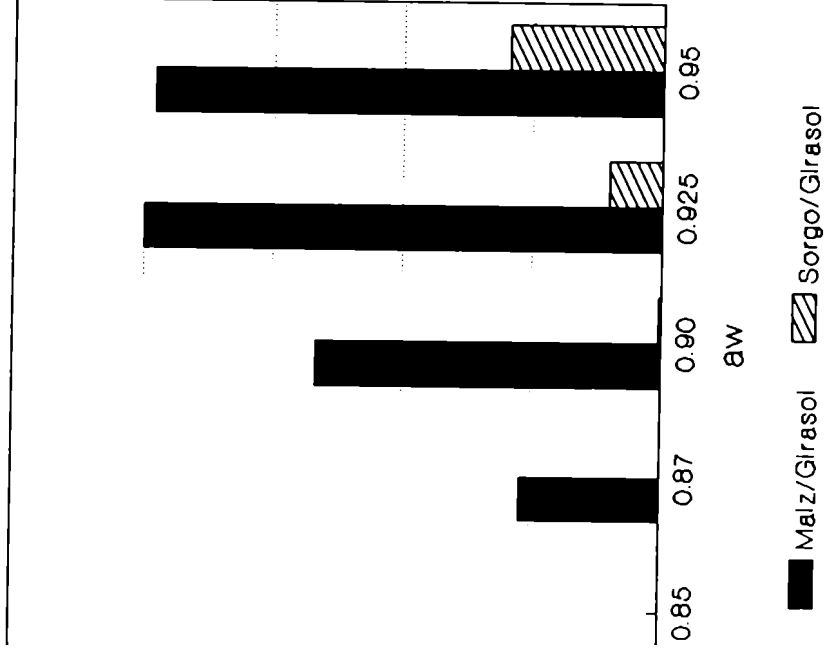


Figura III.21.b-Acumulacion maxima de AFG1.Relacion entre materiales.

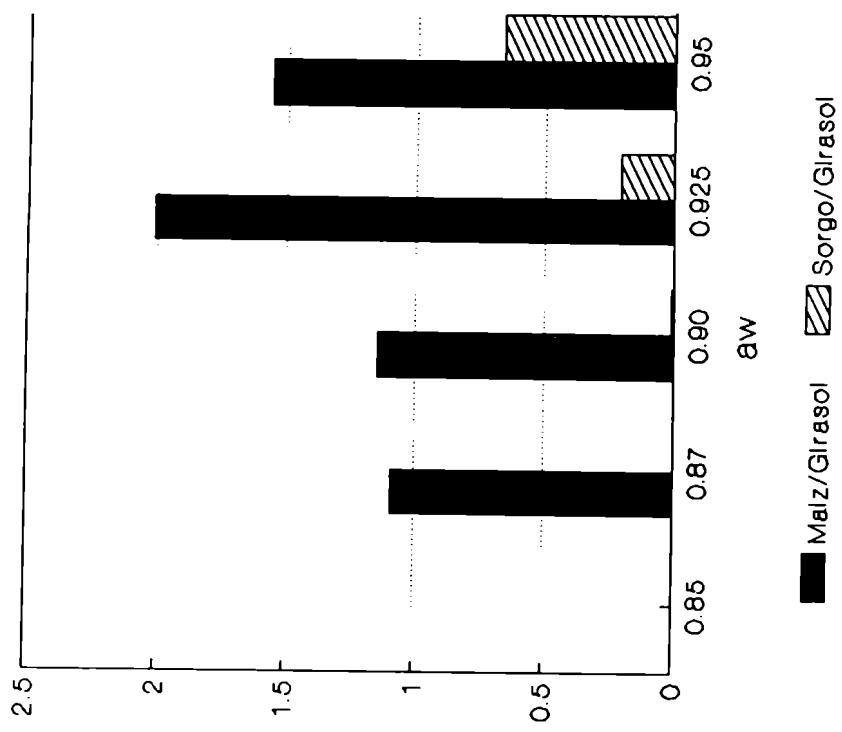


Figura III.2.2.a-Acumulacion maxima de AFB2.Relacion entre materiales.

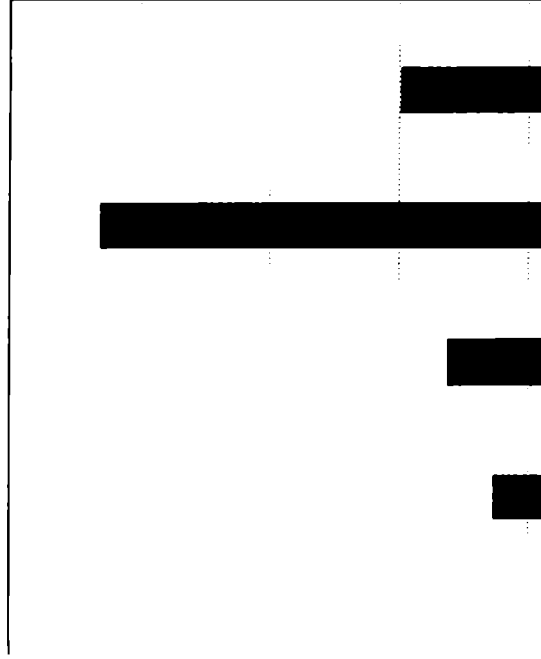


Figura III.2.2.b-Acumulacion maxima de AFG2.Relacion entre materiales.

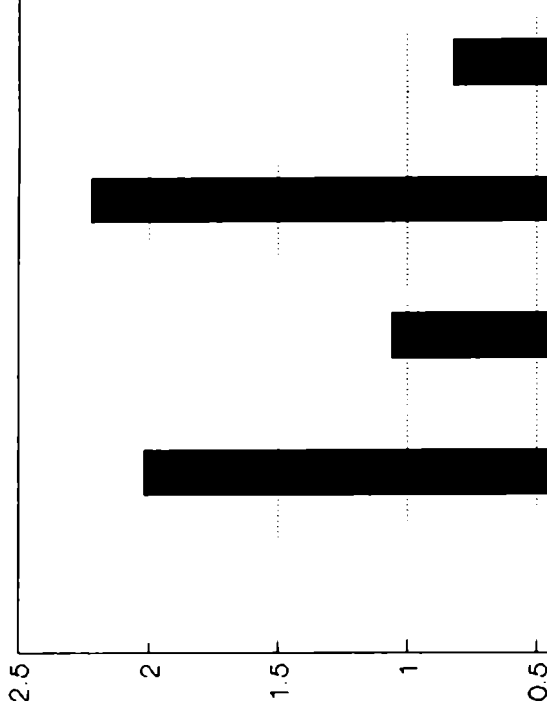


Figura III.23.a-Relaciones de Am
entre los distintos sustratos.
AFB1/AFG1.

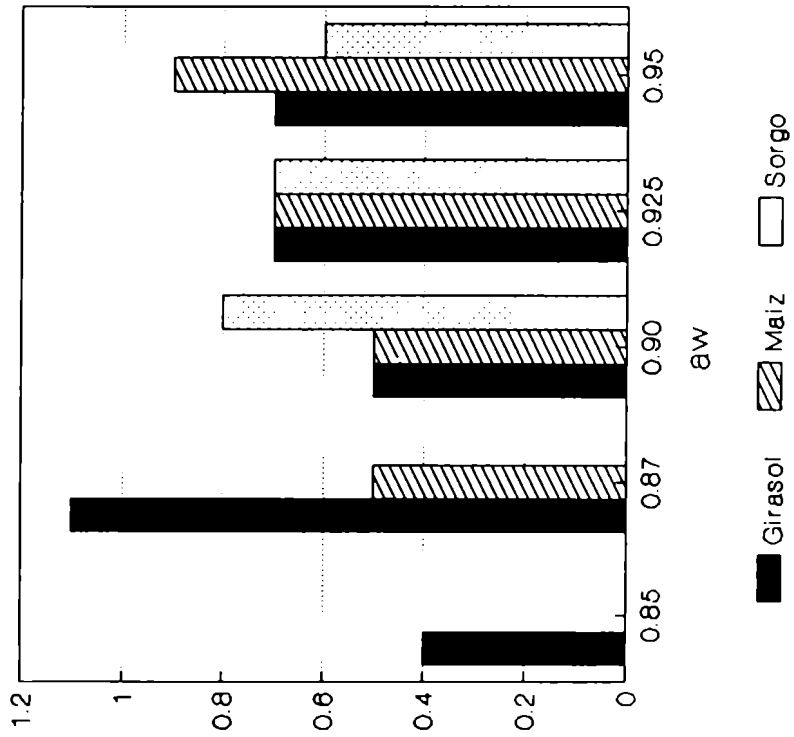


Figura III.23.b-Relaciones de Am
entre los distintos sustratos.
AFG2/AFB1

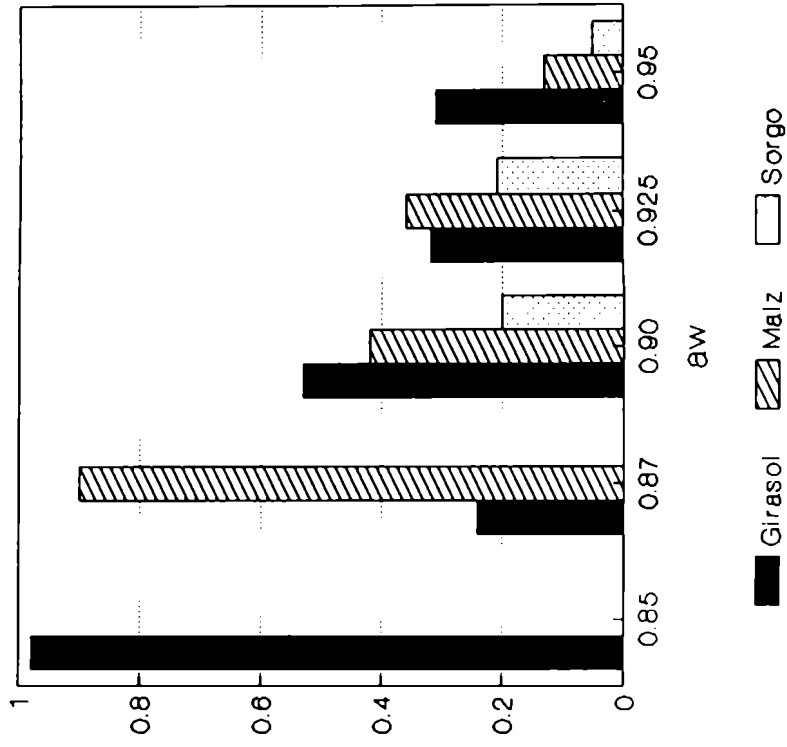


Figura III.24.a -Relaciones de Am
entre los distintos sustratos.
AFG2/AFG1

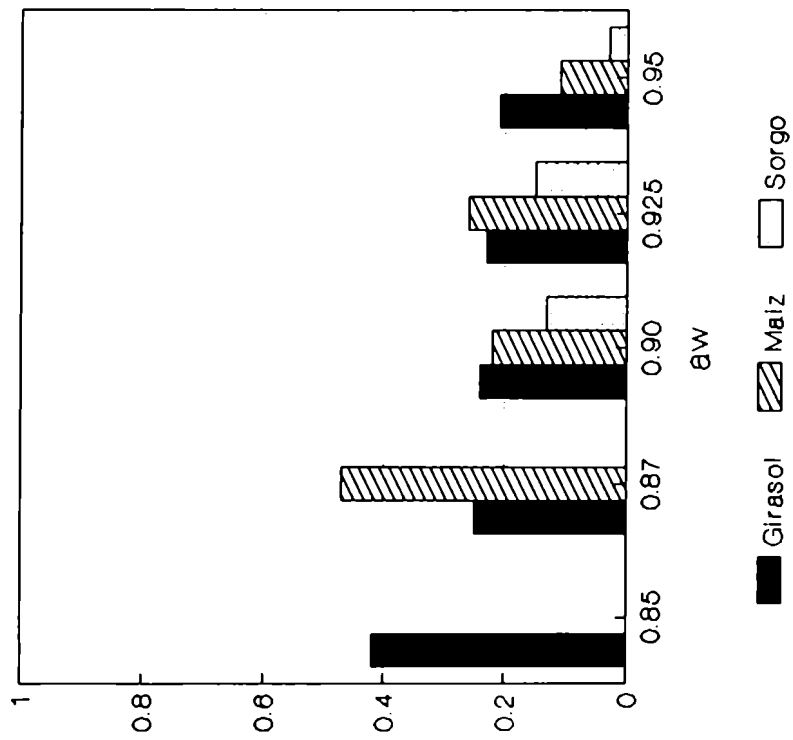


Figura III.24.b -Relaciones de Am
entre los distintos sustratos.
AFB2/AFB1

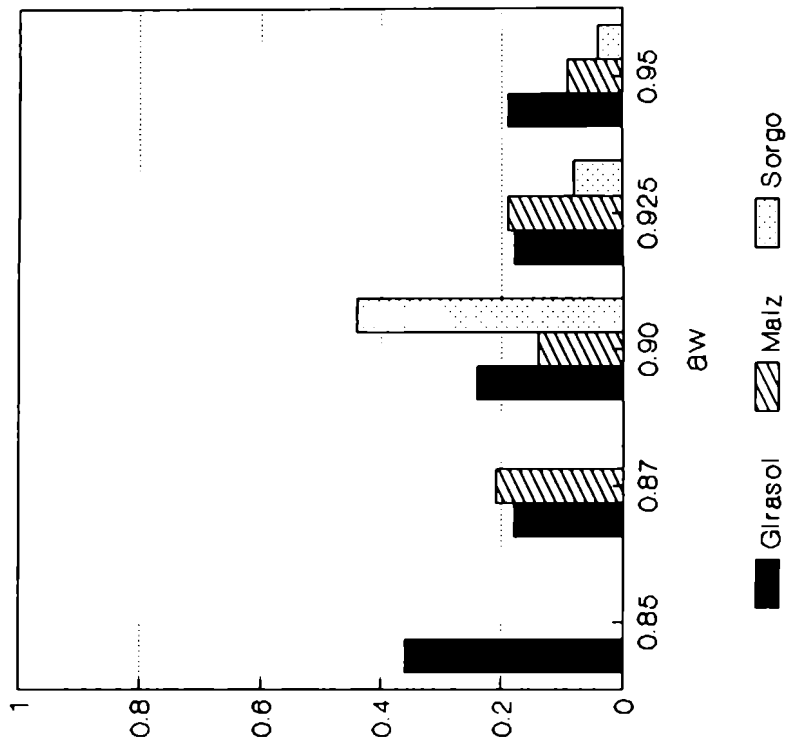


Figura III.25.a-Relaciones de Am
entre los distintos sustratos.
AFB2/AFG1

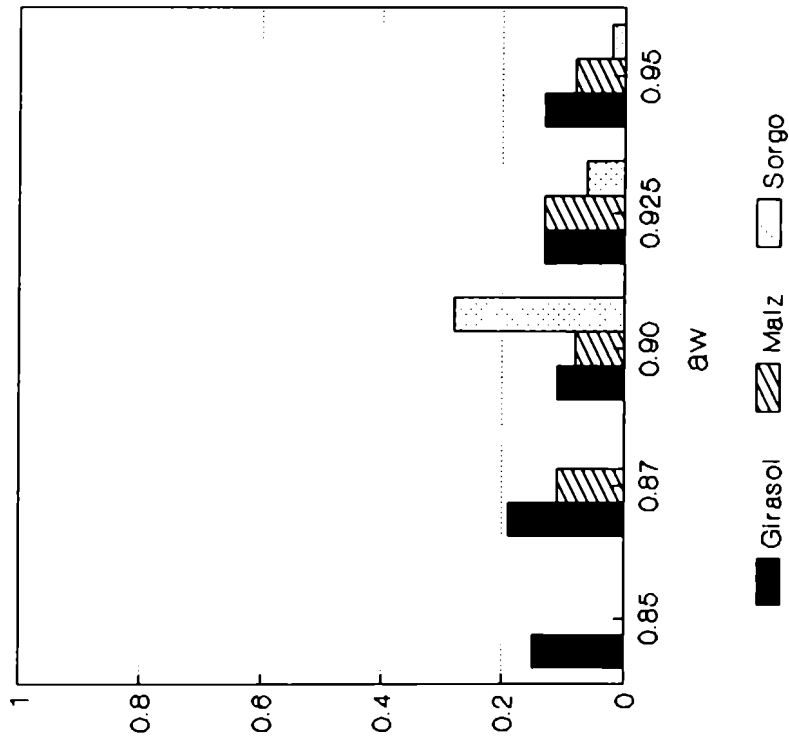
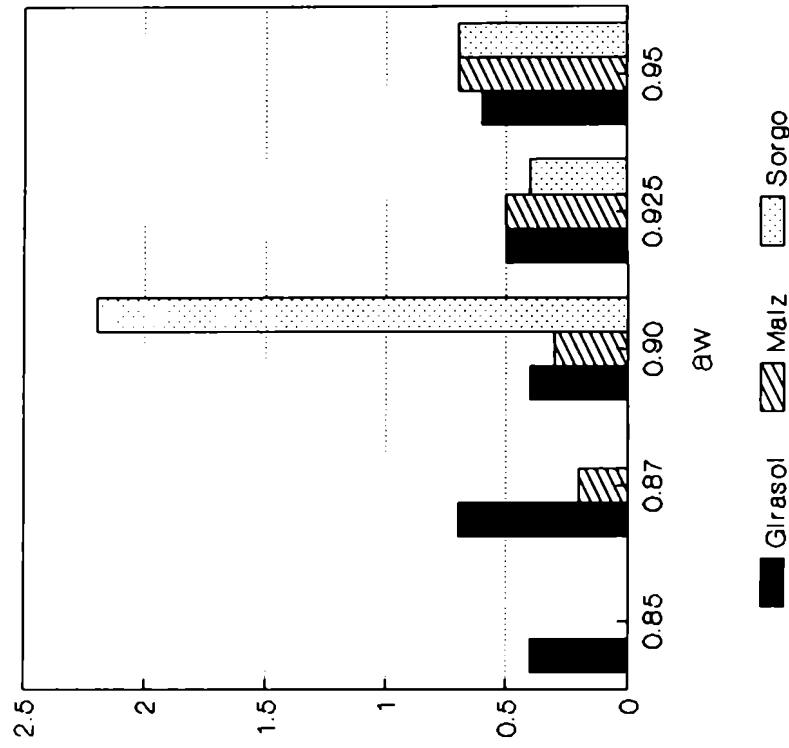


Figura III.25.b-Relaciones de Am
entre los distintos sustratos.
AFB2/AFG2



En girasol de a_w 0.851 (figura III.23.b), las cantidades acumuladas de AFG₂ respecto de AFB₁ son semejantes y la relación se reduce bruscamente con un pequeño aumento de la a_w de 0.851 a 0.868. En maíz, esta relación disminuye a medida que aumenta la a_w . En sorgo, AFG₂ es menor que AFB₁ en todos los niveles de a_w , y la mayor relación se presenta para a_w 0.950.

La figura III.24.a muestra que AFG₂ siempre es menor que AFG₁ en todos los sustratos y para todos los niveles de a_w estudiados. En maíz de a_w 0.868, relación más alta de la figura, la A_m de AFG₂ es casi la mitad de aquella alcanzada por AFG₁. A la a_w más alta (0.950) la acumulación de AFG₂ resulta poco favorable con respecto a AFG₁ en sorgo.

En la figura III.24.b la relación de los valores de A_m de AFB₂ a AFB₁ muestra que esta última es siempre mucho mayor. A a_w 0.851 la acumulación de AFB₂ se ve más favorecida con respecto a AFB₁ en girasol. Lo mismo ocurre en sorgo a a_w 0.902. En este sustrato además, la proporción va disminuyendo con el aumento de la a_w .

En la figura III.25.a se observa que la A_m de AFG₁ es siempre mucho mayor que la de AFB₂. La figura III.25.b muestra que la A_m de AFB₂ es mucho menor que la de AFG₂ con excepción de sorgo a a_w 0.902 en el cual AFB₂ duplica en valor a AFG₂.

Los resultados observados en las figuras anteriores permiten afirmar que tanto el sustrato como la actividad de agua influyen sobre las cantidades relativas de las cuatro aflatoxinas producidas por *A. parasiticus*.

Otros autores observaron también variación de las cantidades relativas de las aflatoxinas en función de distintos factores. Entre estos mostraron tener influencia sobre la relación de AFB₁ a AFG₁, el tiempo (Schindler y col., 1967; van Walbeek y col., 1969; Denizel y col., 1976; Park y Bullerman, 1981), la temperatura (Epstein y col., 1970; Park y Bullerman, 1981) y el sustrato (Denizel y col., 1976). Estos últimos observaron que dicha relación variaba según cual fuera la fracción constituyente del pistacho considerado (vaina, cáscara o grano). Por su parte, Chang y Markakis (1981) mostraron variaciones en la relación de AFB₁ a AFG₁ y de AFB₁ a AFG₂ debido al efecto de las diferencias entre los cultivares de cebada.

Al respecto es interesante también analizar la variación de la relación entre la concentración de AFB₁ respecto de AFT a lo largo del período de incubación para cada uno de los sustratos y de las actividades de agua estudiadas (Tabla III.8).

En girasol AFB₁ varía entre el 21% al 56% del total de las cuatro aflatoxinas, valor que depende tanto del nivel de a_w como del tiempo de almacenamiento. En maíz, la amplitud del rango es un poco menor; AFB₁ varía entre el 19% y el 46% del total. En sorgo la variación es del 0 al 63%.

TABLA III.8

Rango de las relaciones de acumulación de AFB₁ / AFT

a_w	Girasol	Maíz	Sorgo
0.851	0.21–0.36		
0.868	0.27–0.56	0.19–0.30	
0.902	0.24–0.48	0.22–0.36	0.00–0.43
0.925	0.34–0.52	0.24–0.42	0.23–0.49
0.950	0.27–0.47	0.27–0.46	0.24–0.63

Estos resultados muestran que la relación de AFB₁ a AFT es variable.

Como es sabido, la AFB₁ es mucho más tóxica que las demás aflatoxinas. Este hecho en conjunción con los resultados obtenidos permite realizar una evaluación de las legislaciones o regulaciones vigentes en diferentes países respecto de los niveles máximos de aflatoxinas permitidos en alimentos.

En la Tabla III.9 se presentan a modo de ejemplo, las legislaciones vigentes en algunos países de América Latina y del Caribe. En la misma se distinguen tres modalidades en relación a los niveles máximos. Algunos países estipulan un valor máximo para la suma de las cuatro micotoxinas (B₁ + B₂ + G₁ + G₂), otros se refieren a un valor máximo de AFB₁, en tanto que Chile y Argentina plantean un nivel para AFB₁ y otro para las AFT.

De acuerdo con los resultados observados en el presente trabajo, estos niveles no serían equivalentes pues sólo en algunas situaciones AFB₁ es la cuarta parte de las AFT.

En El Salvador, por ejemplo, la legislación establece un máximo de 10 µg/kg de AFB₁ para alimentos para animales y 20 µg/kg de AFT para alimentos para humanos; podría darse el caso de aceptar alimentos para humanos con una contaminación de AFB₁ mayor que el límite permitido en alimentos para animales.

Evidentemente, para unificar una legislación sobre micotoxinas en América Latina y el Caribe es necesario considerar las diferentes relaciones en que podría encontrarse una de las aflatoxinas respecto de las otras.

TABLA III.9
Niveles máximos de aflatoxinas en América Latina y el Caribe*

PAIS	NIVELES ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ó /lt)	PRODUCTOS
Argentina	5(B_1) ó 20 ($B_1+B_2+G_1+G_2$)(a) 0(B_1)(a) 30(B_1) 0.05(M_1)	Maní, maíz y subproductos Alimentos para bebés Harina de soja Leche fluida y en polvo
Bahamas ⁽¹⁾	20($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Alimentos y granos
Barbados	20($B_1+B_2+G_1+G_2$) 50($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Otros alimentos Alimentos balanceados
Belice	20($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Maíz y maní
Brasil	30($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Alimentos para humanos
Colombia	20($B_1+B_2+G_1+G_2$) 10($B_1+B_2+G_1+G_2$) 30($B_1+B_2+G_1+G_2$) 50($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Alimentos para humanos y aves y semillas de sésamo Oleaginosas (maní) Cereales (sorgo, mijo) Alimentos para bovinos
Costa Rica	35($B_1+B_2+G_1+G_2$) 50($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Maíz para consumo humano Maíz para consumo animal
Cuba	5($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Alimentos para humanos y piensos o materias primas destinadas para alimentación animal, cereales y maní
Chile	5(B_1) ó 20($B_1+B_2+G_1+G_2$) 20(B_1) ó 50($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Alimento para animales Ingredientes p/alimentos animales
El Salvador	20($B_1+B_2+G_1+G_2$) 50(B_1) 20(B_1) 10(B_1)	Alimentos para humanos Alimentos p/animales de un solo componente; balanceados p/bovinos,caprinos y ovinos Balanceados p/porcinos y aves de de corral y alimentos suplementarios para ganado bovino de ordeño Otros alimentos para animales
Guatemala	20($B_1+B_2+G_1+G_2$)	Maíz, frijoles, porotos, arroz y sorgo (Maní, mantequilla de maní, concentrado para animales) ²
Honduras	1(B_1) 0.01($B_1+B_2+G_1+G_2$)ó 0.02(M_1) 1(B_1) ó 5($B_2+G_1+G_2$)	Maíz/cereales en granos o molidos Alimentos para bebés Otros alimentos

(Continúa)

(a) Valor propuesto.

* Tomada del documento "Taller Conjunto FAO/OPS sobre prevención y control de micotoxinas en América Latina y el Caribe", San José, Costa Rica, 23 de febrero de 1991.

(Continuación Tabla III.9)

Niveles máximos de aflatoxinas en América Latina y el Caribe

PAIS	NIVELES ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ó /lt)	PRODUCTOS
Jamaica ⁽¹⁾	$20(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Alimentos y granos
México ⁽³⁾	$20(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Alimentos para humanos
	$0(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Alimentos p/ ganado lechero y aves
	$200(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Cereales p/alimentos balanceados de bovinos y porcinos de engorde ⁽⁴⁾
	$100(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Cereales p/alimentos balanceados para porcinos en crecimiento
Perú ⁽⁶⁾	$10(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Alimentos y piensos
	$10(B_1)$	Productos complementarios de los piensos p/animales productores de leche
República Dominicana	$20(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Maíz de importación
	$0(B_1+G_1)$	Maíz y subproductos, maní, soja Tomate y subproductos
	$20(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Maíz de importación
	$0(B_1+G_1)$	Maíz y subproductos, maní, soja, tomate y subproductos
Surinam	$30(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Maíz, piensos para animales
	$5(B_1)$	Maní y subproductos, legumbres
Trinidad y Tobago ⁽⁵⁾	$10(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Alimentos y piensos
	$10(B_1)$	Productos complementarios de los piensos p/animales productores de leche
Uruguay	$0(B_1)$	Manteca (mantequilla)
	$0.5(M_1)$	Manteca (mantequilla)
Venezuela	$20(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Piensos
	$5(B_1+B_2+G_1+G_2)$	Harina de arroz ⁽⁶⁾

1. No tiene reglamentación nacional pero utiliza normas FDA.
2. Valor guía hasta la aprobación de la norma guatemalteca.
3. Está en consideración la norma que permite disminuir de 20 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para alimentos de humanos.
4. Estos límites son dados para balanceados donde el cereal no supere el 10% del total y se toma un término de 90 días para engorde.
5. No hay normas nacionales. Se usan las propuestas por el Codex Alimentarius.
6. Esta norma se encuentra actualmente a nivel de discusión final por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN).

IV. Conclusiones

El análisis de las curvas de acumulación de aflatoxinas a 25 ° C en función del tiempo para los tres sustratos estudiados a distintos niveles de a_w permite inferir que:

- Una única determinación de la concentración de aflatoxinas después de un determinado período de incubación no es indicativa de la capacidad del sustrato para permitir la acumulación de estas toxinas bajo diferentes condiciones ambientales.
- La obtención de las curvas completas de acumulación de las toxinas en un período de tiempo razonable es necesaria a fin de extraer conclusiones valdezas acerca de la influencia de cualquier factor, relacionado con el medio ambiente, la cepa y/o el sustrato.
- Los tres parámetros cinéticos definidos en el presente trabajo (P_i , T_m , A_m) son adecuados para la comparación de la influencia del sustrato, y de la a_w sobre la acumulación de aflatoxinas.

El estudio comparativo de los parámetros para los tres sustratos a los diferentes niveles de a_w permite extraer las siguientes conclusiones:

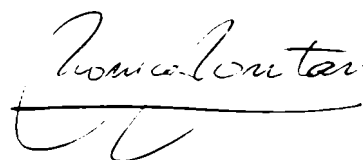
- En relación al período de iniciación (P_i): se observa que disminuye con el aumento de a_w para las aflatoxinas (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 y AFG_2) en todos los sustratos estudiados. En girasol y maíz las cuatro toxinas iniciaron su acumulación a cada nivel de a_w dentro del mismo período; en sorgo se observaron retrasos en la aparición de algunas de ellas (AFB_2 y AFG_2) al disminuir la a_w en el rango que permitió la acumulación de aflatoxinas (0.950 a 0.902).
- Con respecto al tiempo necesario para alcanzar la máxima acumulación (T_m), se observó que en todos los niveles de a_w los T_m de girasol son mayores que los observados para los otros sustratos ($a_w > 0.868$). La máxima acumulación de todas las aflatoxinas se alcanza en girasol después de los 40 días, a excepción de AFB_1 y AFG_1 a a_w 0.950. En maíz se observa una notable disminución del T_m de todas las aflatoxinas para el más alto valor de a_w estudiado (0.950). En sorgo, en cambio, los valores de T_m para las cuatro aflatoxinas no se modifican sustancialmente al variar la a_w .
- En cuanto a la acumulación máxima de AFT (A_m) se observa que aumenta con la a_w para todos los sustratos. En sorgo, a todos los niveles de a_w , la A_m fue menor respecto de los otros dos sustratos. A a_w 0.868 y 0.902 los valores acumulados de AFT en girasol y maíz son similares. Sin embargo, al aumentar la a_w se alcanzan valores de A_m mayores en maíz que en girasol. El mayor valor de A_m se observó en

maíz de a_w 0.950.

- En relación a las A_m de cada una de las aflatoxinas se pudo observar que para todas ellas la A_m en sorgo fue menor que en los otros dos sustratos a todos los valores de a_w . La A_m de AFB₁ en maíz es mayor que en girasol excepto para a_w 0.868. Para AFG₁ la acumulación máxima en maíz resultó mayor que en girasol a todos los niveles. El cociente de las A_m de AFB₂ y AFG₂ en maíz y girasol depende de la a_w .
- Las acumulaciones máximas de las cuatro aflatoxinas producidas por la cepa utilizada en el presente estudio (*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999) guardaron el siguiente orden en todos los sustratos y a todos los niveles de a_w : AFG₁ > AFB₁ > AFG₂ > > AFB₂, excepto en el caso del girasol a a_w 0.868 (AFB₁ > AFG₁) y sorgo a a_w 0.902 (AFB₂ > AFG₂).
- Al analizar las relaciones entre las concentraciones de AFB₁ respecto de las totales en cada punto de la curva de acumulación, se observó que la misma es variable y el rango de variación es dependiente del sustrato y del nivel de a_w .

Las características del sustrato determinan la facilidad con que los hongos pueden colonizar a los granos, el tiempo requerido para detectar las toxinas, las cantidades máximas que se pueden acumular, el tiempo necesario para alcanzar ese valor y los valores de a_w mínimas para la producción de aflatoxinas.

- En el girasol se observó acumulación de aflatoxinas a un nivel de a_w 0.851 que resultó inhibitorio para los otros sustratos. En las condiciones del presente trabajo (T = 25°C, período de incubación de ocho semanas), la a_w limitante se encontró entre 0.827 y 0.851. Sin embargo, en este sustrato se observó un retardo en alcanzar los valores de acumulación máxima, probablemente debido a la presencia de tegumentos que ofrecerían resistencia a la colonización fúngica.
- En el caso del maíz el valor de a_w mínima se encontró comprendido entre 0.851–0.868. A niveles de a_w superiores a 0.868 este cereal fue el sustrato que presentó la mayor velocidad de acumulación, ya que se alcanzaron las mayores concentraciones en el menor tiempo.
- El sorgo ofreció la mayor resistencia a la acumulación de aflatoxinas ya que fue el sustrato en el cual se detectaron las concentraciones más bajas a todos los niveles de a_w . La actividad acuosa limitante se encontró entre 0.868 y 0.902, siendo probablemente cercana a este último nivel, de acuerdo a la escasa acumulación observada en el mismo.



V. Tablas de Datos

Para cada sustrato se presentan los valores obtenidos por triplicado de cada toxina ($\mu\text{g}/\text{kg}$) a los diferentes valores de a_w en función del tiempo.

Sorgo

DIAS	AFB1	AFB1	AFB1	AFB2	AFB2	AFB2
aw=0.902						
0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	27	20	27	0	0	0
28	18	27	27	0	0	0
35	27	54	14	0	0	0
42	37	27	18	5	24	0
49	5	3	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0
aw=0.925						
0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
7	36	45	38	0	0	0
11	208	270	304	7	19	19
14	305	236	190	26	12	13
21	740	720	835	48	60	66
28	216	108	95	6	6	6
35	540	1080	540	53	87	48
45	270	270	270	29	29	29
49	95	95	95	13	13	13
56	13	13	13	0	0	0
aw=0.950						
0	0	0	0	0	0	0
4	474	474	405	14	24	24
7	1800	1800	1800	48	48	48
14	1360	1350	1350	192	192	192
21	2700	4050	2040	192	288	192
28	2638	4050	2025	96	193	193
35	4050	8100	4050	193	193	193
42	3250	3250	3250	241	241	241
49	3240	3240	3240	192	192	192
56	3600	3600	3600	192	192	192

Sorgo

DIAS	AFG1	AFG1	AFG1	AFG2	AFG2	AFG2
aw=0.902						
0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	57	43	57	0	0	0
28	43	57	57	0	0	0
35	57	85	19	7	11	4
42	57	85	22	8	8	2
49	14	3	2	0	0	0
56	3	3	3	0	0	0
aw=0.925						
0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
7	51	67	101	0	0	0
11	352	460	632	7	32	32
14	420	420	420	32	10	11
21	1012	1280	1253	107	115	132
28	190	150	150	29	22	22
35	1264	1012	1523	215	225	215
45	760	760	760	107	108	107
49	202	202	202	22	21	21
56	38	38	38	0	0	0
aw=0.950						
0	0	0	0	0	0	0
4	253	253	253	11	22	22
7	4210	4220	3800	11	11	11
14	3900	3800	3800	134	216	216
21	5700	7590	5700	430	322	268
28	5700	7590	5700	215	215	269
35	7590	13260	7590	430	430	430
42	7600	7600	7590	402	402	402
49	5060	5060	5060	429	429	430
56	6320	6320	6320	376	376	376

Maíz

DIAS	AFB1	AFB1	AFB1	AFB2	AFB2	AFB2
aw=0.868						
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	10	10	13.5	1.6	3	2
21	651	435	580	60	60	70
28	2900	2900	2900	505	505	485
35	2900	2900	2900	575	604	575
42	1785	1450	2150	400	500	435
49	1290	1450	1450	450	505	505
56	1440	1085	1450	500	450	505
aw=0.902						
0	0	0	0	0	0	0
7	920	840	440	118	106	88
14	1350	1350	1350	136	136	136
21	2700	2700	2700	288	288	288
28	5400	5400	5400	720	773	720
35	2900	2900	3620	750	750	750
42	2700	2025	2025	720	483	483
49	4050	2700	4050	773	384	773
56	2700	2700	2700	384	384	384
aw=0.925						
0	0	0	0	0	0	0
7	1350	1350	1350	129	129	129
14	5400	8000	5400	772	1119	772
21	6075	6075	6075	772	772	772
28	10140	8100	10150	1119	1108	1119
35	10800	10800	10800	1544	1544	1352
42	6750	4340	8680	966	1010	2060
49	5000	6750	6750	960	1440	1440
56	2700	2700	2700	384	386	384
aw=0.950						
0	0	0	0	0	0	0
7	6075	8100	8100	864	1158	864
14	27000	27000	23500	2415	2415	2200
21	10125	13500	13500	1600	1600	1600
28	13500	14500	10125	1425	2537	1364
35	6125	6125	6125	1600	1600	1600
42	4935	4750	3375	1120	1120	900
49	6750	6750	6750	1200	1200	1200
56	1687	2025	1850	483	600	540

Maíz

DIAS	AFG1	AFG1	AFG1	AFG2	AFG2	AFG2
aw=0.868						
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	26	26	23	4	13	7
21	1560	1280	1645	156	178	290
28	5200	5200	5500	1600	1650	1950
35	5200	5200	4900	2600	2600	2300
42	3625	3200	3900	1500	1850	1950
49	2900	2600	2600	1600	1300	1300
56	3220	2650	2925	1640	1275	1450
aw=0.902						
0	0	0	0	0	0	0
7	1424	996	806	330	360	180
14	3800	3800	3800	540	540	540
21	5040	5040	5040	1440	1500	1470
28	10120	10120	10120	2160	2160	2160
35	5200	5200	5200	2270	2270	2270
42	5040	5040	5040	1610	1750	1750
49	10120	5060	10120	2160	1600	2160
56	5060	5060	5060	1600	1600	1600
aw=0.925						
0	0	0	0	0	0	0
7	1890	1890	1890	143	143	143
14	10120	15200	10120	2150	3200	2120
21	11400	11400	11400	2150	2150	2150
28	12340	10300	12400	2415	1807	2212
35	15280	15280	15240	3200	3200	3200
42	7200	7200	10400	1325	2290	3900
49	12600	12600	12600	1940	2687	2700
56	5060	5060	5060	1060	1170	1170
aw=0.950						
0	0	0	0	0	0	0
7	7590	11370	7590	966	1290	966
14	31600	31600	28900	3350	3350	3000
21	15800	19000	19000	2660	2660	2660
28	16000	19500	12650	2437	3500	2150
35	12650	12650	12650	1766	1766	1766
42	6162	6475	4737	1271	1260	966
49	11060	12650	9475	2060	2020	1325
56	3150	3162	3150	975	1263	1119

Girasol

DIAS	AFB1	AFB1	AFB1	AFB2	AFB2	AFB2
aw=0.851						
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
35	140	108	160	96	38	38
42	540	540	540	192	192	192
49	270	108	108	58	38	38
56	54	0	0	0	0	0
aw=0.868						
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	540	540	167	38	38	19
21	540	270	270	158	77	77
28	405	270	676	96	96	115
35	540	404	217	100	77	58
42	1215	1215	810	211	259	115
49	5400	5400	4040	960	960	768
56	1080	2160	2160	384	560	384
aw=0.902						
0	0	0	0	0	0	0
7	379	162	270	0	0	0
14	540	538	810	48	45	96
21	1080	540	810	192	48	109
28	1620	1080	1080	308	164	164
35	2700	2700	2700	483	483	483
42	2700	4050	4050	720	720	960
49	1230	1620	1620	230	230	144
56	1620	739	729	288	115	115
aw=0.925						
0	0	0	0	0	0	0
7	540	540	400	38	38	28
14	808	867	1072	115	77	154
21	1350	2700	1350	192	280	192
28	1190	2700	2700	192	384	384
35	5400	3240	2160	576	576	384
42	2720	2700	2720	576	576	570
49	4040	4040	4040	768	768	768
56	5400	5400	5400	960	960	960
aw=0.950						
0	0	0	0	0	0	0
7	2160	1837	1896	230	158	134
14	2700	2350	3050	292	230	284
21	3400	2080	2142	468	392	374
28	13200	13800	8100	1920	1920	960
35	11600	10140	10140	1560	1216	1216
42	11320	10800	9100	1960	1920	1560
49	10200	12640	10080	1560	2560	1920
56	4040	2970	4860	768	768	1120

Girasol

DIAS	AFG1	AFG1	AFG1	AFG2	AFG2	AFG2
aw=0.851						
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
35	206	252	227	72	64	86
42	1260	1260	1264	530	530	320
49	506	252	252	86	42	42
56	76	0	0	22	0	0
aw=0.868						
0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
14	336	336	134	43	42	21
21	672	252	278	168	86	86
28	506	506	760	108	100	160
35	884	506	152	200	129	64
42	1518	1518	760	404	342	215
49	5060	5060	5060	1060	1060	1060
56	2024	4048	2024	640	1288	856
aw=0.902						
0	0	0	0	0	0	0
7	405	202	405	0	0	0
14	506	506	760	108	216	215
21	1264	506	1012	216	108	212
28	2024	1616	1616	536	430	430
35	5060	5060	5690	1075	1075	1610
42	6320	8840	8840	1340	1610	2150
49	1896	3036	3036	480	642	215
56	3036	1174	985	645	320	322
aw=0.925						
0	0	0	0	0	0	0
7	506	506	380	43	43	32
14	756	504	756	172	212	214
21	1260	2530	1900	376	530	322
28	1260	3800	3624	430	752	432
35	7600	3780	2272	1288	860	424
42	2000	3040	3040	640	856	856
49	5060	5060	3800	1600	1600	1140
56	7600	7600	7600	1760	1760	1760
aw=0.950						
0	0	0	0	0	0	0
7	2024	1756	1760	344	142	214
14	3160	2892	3420	428	312	436
21	5120	3264	4805	674	520	503
28	20240	20000	10120	3200	3220	1600
35	13800	11700	11700	1950	1560	1560
42	20240	15120	15120	3320	3224	2600
49	18200	18240	19240	3866	4293	3300
56	3790	3028	4060	1280	1072	1840

VI. Bibliografía

- ALLCROFT, R. and R.B.A. CARNAGHAN (1963a), Toxic products in groundnut: biological effects, *Chemistry and Industry* 2, 50-53.
- ALLCROFT, R. and R.B.A. CARNAGHAN (1963b), Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals feed toxic groundnut meal, *Vet. Rec.* 75, 259-263.
- Anuario del Servicio de Informaciones del Mercado Argentino (SIMA), 1990.
- Anuario Estadístico de Oleaginosas de la República Argentina (1984), Cámara de la Industria Aceitera de la República Argentina.
- BEUCHAT, L.R. and R.V. LECHOWICH (1970), Aflatoxin production on beans as affected by temperature and moisture content, *Journal Milk Food Technol.* 33: 373-378.
- BILGRAMI, K.S., S.P. SINHA and P. JESWAL (1988), Loss of toxigenicity of *A. flavus* strains during subculturing - a genetic interpretation, *Curr. Sci.* 57, 10, 551-552.
- BOLLER, R.A. and H.W. SCHROEDER (1974), Influence of relative humidity on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*, *Phytopathology* 64: 17-21.
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires, República Argentina, 1984.
- CASPER, H.H., L.F. BACKER and W. KUNERTH (1981), Survey of North Dakota Sunflower Seeds for Aflatoxin, *Journal A.O.A.C.* 64, 1, 228-230.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology, 1989). Mycotoxins Economic and Health Risks, *Task Force Report N° 116*, 37-42.
- CHANG, H.G. and P. MARKAKIS (1981), Effect of Moisture Content on Aflatoxin Production in Barley, *Cereal Chem.* 58, 2, 89-91.
- CHIOU, R.Y.-Y., P.E. KOEHLER and L.R. BEUCHAT (1984), Hygroscopic characteristics of peanut components and their influence on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Journal Food Prot.* 47, 791-794.
- CHIRIFE, J., G. FAVETTO, C. FERRO FONTÁN y S.L. RESNIK (1983), The water activity of standard saturated salt solutions in the range of intermediate moisture foods, *Lebensmittel wiss.u. Technologie* 16, 36-38.
- CHIRIFE, J. and S.L. RESNIK (1984), Unsaturated Solutions of Sodium Chloride Reference Sources of Water Activity at Various Temperatures, *Journal Food Science* 49, 1486-1488.
- CHRISTENSEN, C.M. (1970), Moisture Content and Invasion of Stored Sorghum Seeds by Fungi, *Phytopathology* 60: 280-283.

- CHULZE, S.N. (1987), *Aflatoxinas en semillas de girasol: factores bióticos que determinan su formación*. Tesis para optar al título de doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- DAVIS, D.N., C.G. CURRIER and V.L. DIENER (1986), Aflatoxin contamination of Corn Hybrids in Alabama. *Cereal Chem.* **63**, 6, 467-470.
- DENIZEL, T., E.J. ROLFE and B. JARVIS (1976), Moisture Equilibrium Relative Humidity Relationships in Pistachio Nuts with Particular Regard to Control on Aflatoxin Formation, *Journal Sci. Fd. Agric.* **27**, 1027-1034.
- DIENER, U.L., R.L. ASQUITH and J.W. DICKENS eds. (1983), Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn, *Department of Research Information, Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama*. Bulletin N° 279.
- DIENER, U.L. and N.D. DAVIS (1966), Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*, *Phytopathology* **56**, 1390-1393.
- DIENER, U.L. and N.D. DAVIS (1977), Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*, *Department of Research Information, Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama*. Bulletin N° 493.
- DURAKOVIC, S., Z. DURAKOVIC, A. DURAKOVIC, T. BERITIC, O. POSPISIL, F. DELAS (1987), Effect of temperature and moisture on growth and aflatoxin formation by fungi cultured on corn, *Period. biol.* **89**, 1, 45-52.
- ERLICH, K. and A. CIEGLER (1985). Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* grown on different grains. *Mycopathologia* **92**, 3-6.
- EPSTEIN, E., M.P. STEINBERG, A.I. NELSON and L.S. WEI (1970). Aflatoxin production as affected by environmental conditions. *J. Food Science* **35**, 381-391.
- ETCHEVERRY, M., S. CHULZE, A. DALCERO, E. VARSAVSKY, M. RODRÍGUEZ, E. MOSCHETTI and S. FERRERO (1987), Aflatoxins in sunflower seeds. Influence of fungicides and insecticides, *Int. J. Food Microbiol.* **5**, 103-109.
- EUGENIO, C.P., C.M. CHRISTENSEN and C.J. MIROCHA (1970), Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*, *Phytopathology* **60**, 1055-1060.
- FENNEL, D.I., R.J. BOTHAST, E.B. LILLEHOJ and R.E. PETERSON (1973), Bright greenish yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin, *Cereal Chemistry* **52**, 314-321.
- FERNÁNDEZ PINTO, V., G. VAAMONDE and M. MONTANI (1991a), Influence of water activity, temperature and incubation time on the accumulation of aflatoxin B₁ in soybeans. *Food Microbiology*, en prensa.

- FERNÁNDEZ PINTO, V., G. VAAMONDE, S. BRIZZIO and N.A. APRO (1991b), Aflatoxin Production in Soybeans Varieties Grown in Argentina, *J. Food Protection*, en prensa.
- FRISVAD, J.C. (1981), Physiological Criteria and Mycotoxin production as aids to identification of common asymmetric *Penicilia*, *Appl. Environ. Microbiol.* **11**, 568-579.
- GAREIS, M., J. BAUER, A. VON MONTGELAS and B. GEDEK (1984), Stimulation of Aflatoxin B₁ and T-2 Toxin Production by Sorbic Acid, *Appl. and Environ. Microbiol.* **47**, 416-418.
- GREENHALGH, R., G.A. NEISH and J.D. MILLER (1983), Deoxynivalenol, Acetyl deoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrate, *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 625-629.
- Grupo de Trabajo: Micotoxinas. Documento publicado por el IV Congreso Argentino de Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires (1985), Metodología Analítica, 63-94.
- HEATHCOTE, J.G. (1984), Introduction and review of the development of research activity into mycotoxins, *Chemistry and Industry* **15**, 530-532.
- HESSELTINE, O.L., J.J. SHOTWELL, ELLIS and R.D. STUBBLEFIELD (1966), Aflatoxin Formation by *Aspergillus flavus*, *Bact. Rev.* **30**, N° 4, 795-805.
- HUNTER, J.H. (1969), *Growth and aflatoxin production in shelled corn by the Aspergillus group as related to relative humidity and temperature*, Doctoral dissertation. Purdue University, W. Lafayette, IN., U.S.A.
- KOEHLER, P.E., L.R. BEUCHAT and M.S. CHINNAN (1985), Influence of Temperature and Water Activity on Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds and Meal, *Journal Food Protection* **48**, 12, 1040-1043.
- KURTZMAN, C.P., B.W. HORN and C.W. HESSELTINE (1987), *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin production species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarisii*, *Antonie van Leeuwenhoek* **53**, N° 3, 147-158.
- LEE, L.S., E.B. LILLEHOJ and N.F. KWOLEK (1980), Aflatoxin Distribution in Individual Corn kernels from Intact Ears, *Cereal Chemistry* **57**, 5, 340-343.
- LEITAO, J., J. LE BARS, J.R. BAILLY (1989), Production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus ruber* Thom and Church, *Mycopathologia* **108**, 2, 135-138.
- LILLEHOJ, E.B. (1983), Effect of Environmental and Cultural Factors on Aflatoxin Contamination of Developing Kernels: in Aflatoxins and *Aspergillus flavus* in Corn, Department of Research Information, Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama, Bulletin # 279, 27-34.

- LLEWELLYN, G.C. and T. EADIE (1974), Evaluating the Potential for Occurrence of Aflatoxins in Black Sunflower Seeds, *Journal A.O.A.C.* **57**, 4, 858–860.
- MARTH, E.H. and M.P. DOYLE (1979), Update on molds: degradation of aflatoxin, *Food Technol.* **33**, 81–87.
- MASHALY, R.I. and S.A. EL-DEEB (1982), Effect of fungus strains, Inoculation, Temperature and time and pH on aflatoxin production by *Aspergillus*, *Proceedings International Symposium on Mycotoxins*, 459–467.
- MCMILLIAN, W.W., D.M. WILSON, C.J. MIROCHA and W. WIELSTROM (1983), Mycotoxins Contamination in Grain Sorghum from Fields in Georgia Mississippi, *Cereal Chemistry* **60**, 3, 226–227.
- MIXON, A.C. (1977), Influence of plant genetics on colonization by *Aspergillus flavus* and toxin production (peanuts). In “Mycotoxins in Human and Animal Health”, J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman (eds.), Pathotox, Illinois.
- MONTANI, M.L., G. VAAMONDE, S.L. RESNIK and M.P. BUERA (1988a), Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearolenone in corn, *Int. J. of Food Microbiol.* **6**, 1–8.
- MONTANI, M.L., G. VAAMONDE, S.L. RESNIK and M.P. BUERA (1988b), Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn, *Int. J. of Food Microbiology* **6**, 349–353.
- MONTANI, M.L., G. VAAMONDE, S.L. RESNIK and M.P. BUERA (1988c), Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thom growth and citrinin accumulation kinetics, *Int. J. Food Microbiology* **7**, 115–122.
- MORENO ROMO, M.A., M.C. RAMOS CARTAGENA, E.F. RODRÍGUEZ FERRI y G. SUÁREZ FERNÁNDEZ (1986), Minimal moisture content for growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in mixed feeds, *Mycopathologia* **95**: 145–148.
- MOSS, M.O. (1984), Conditions and factors influencing mycotoxin formation in the field, *Chemistry and Industry* **15**, 533–536.
- MOSS, M.O. and F. BADI (1982), Increased production of Aflatoxins by *Aspergillus parasiticus* spore in the presence of Rubratoxin B, *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 895–898.
- NAGARAJAN, V., R.V. BHAT and P.G. TULPULE (1973), Aflatoxin production in some varieties of soybeans (*Glycine max* L.), *Experientia* **29**, 1302–1303.
- NAGARAJAN, V., R.V. BHAT and P.G. TULPULE (1974), Aflatoxin Production in Sunflower (*Helianthus Annuus*) Seed Varieties, *Curr. Sci.* **43**, 19, 603–604.

- NILES, E.V., J.A. NORMAN and D. PIMBLEY (1985), Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in wheat and barley, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **84**, 2, 259-266.
- NORTHOLT, M.D., C.A.H. VERHULSDONK, P.S.S. SOENTORO and W.E. PAULSH (1976), Effect of Water Activity and Temperature on Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, *Journal of Milk and Food Technology* **39**, 3, 170-174.
- NORTHOLT, M.D., H.P. VAN EGMOND and W.E. PAULSH (1977), Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and aflatoxin B₁ production in relation to water activity and temperature, *Journal Food Prot.* **40**, 11, 778-781.
- NORTHOLT, M.D. and L.B. BULLERMAN (1982), Prevention of Mold Growth and Toxin Production through Control of Environmental Conditions, *Journal of Food Protection* **45**, 6, 519-526.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th ed. (1980).
- PARK, K.Y. and L.B. BULLERMAN (1981), Increased Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* under Conditions of Cycling Temperatures, *J. Food Science* **46**, 4, 1147-1151.
- PARK, K.Y. and L.B. BULLERMAN (1983a), Effect of Cycling Temperatures on Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in Rice and Cheddar Cheese, *J. Food Science* **48**, 889-896.
- PARK, K.Y. and L.B. BULLERMAN (1983b), Effects of Substrate and Temperature on Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*, *J. of Food Protection* **46**, 3, 178-184.
- PAYNE, G.A. (1983), Nature of field infection of corn by *Aspergillus flavus*, in: "Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in Corn", V.L. Diener, R.L. Asquith and J.W. Dickens (eds.), Soc. Coop. Serv., Bull. 279, Ala. Agric. Exp. St.: Auburn, AL., 16-19.
- PITT, J.I. (1979), *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*, Academic Press, London.
- PRYADARSHINI, E. and P.G. TULPULE (1978), Relationship between Fungal Growth and Aflatoxin Production in Varieties of Maize and Groundnut, *J. Agric. Food Chem.* **26**, N° 1, 249-252.
- QASEN, S.A. and C.M. CHRISTENSEN (1958), Influence of moisture content, temperature and time on the deterioration of stored corn by Fungi, *Phytopathology* **48**, 544-549.

- QUIROGA, N.M. (1985), *Estudio de metodología analítica para aflatoxinas y zearalenona en maíz y aflatoxinas en pellet de soja*. Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires. Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- RAMBO, G., J. TUIITE and G.L. ZACHARIAH (1975), Fluorescence Associated with Corn Infected with *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in Storage, *Cereal Chemistry* **52**, 757-764.
- ROLAND, J.O. and L.R. BEUCHAT (1984), Influence of temperature and water activity on growth and patulin production by *Byssoschlamys nivea* in apple juice, *Applied Environ. Microbiol.* **47**, 205-207.
- ROY, A.K. and H.K. CHOURASIA (1989), Effect of Temperature on Aflatoxin Production in *Mucuna pruriens* Seeds, *Applied and Environmental Microbiol.* **55**, 2, 531-532.
- SANCHIS, V., M.L. QUILEZ, R. VILADRICH, I. VIÑAS and R. CANELA (1988), Hazelnuts as Possible Substrate for Aflatoxin Production, *Journal of Food Protection* **51**, 4, 289-292.
- SARGEANT, K., R.B.A. CARNAGHAN and R. ALLCROFT (1963), Toxic Products in groundnuts: chemistry and origin, *Chemistry and Industry* **2**, 53-55.
- SAUER, D.B., R. BURROUGHS (1980), Fungal Growth, Aflatoxin, Production and Moisture Equilibration in Mixtures of Wet and Dry Corn, *Phytopathology* **70**, 6, 516-521.
- SAUER, D.B. and J. TUIITE (1986), Conditions that affect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in stored maize. In: "Aflatoxin in Maize", M.S. Zuber, E.B. Lillehoj and B.L. Renfro (eds.), *Proceedings of Workshop CIMMYT*, El Batán, México, 41-50.
- SCHINDLER, A.F., J.G. PALMER and W.V. EISENBERG (1967), Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures, *Appl. Microbiol.* **15**, 5, 1006-1009.
- SCHINDLER, A.F. (1977), Temperature limits for production of aflatoxin by twenty-five isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, *J. Food Protection* **40**, 1, 39-40.
- SCHMIDT, F.R., N.D. DAVIS, U.L. DIENER and P.A. LEMKE (1983), Cycloheximide induction of aflatoxin synthesis in a nontoxigenic strain of *A. flavus*. *Biotechnology* **1**, 794-795.

- SHOTWELL, O.L., G.A. BENNETT, M.L. GOULDEN, R.D. PLATTNER and C.W. HESSELTINE (1980), Survey for Zearalenone, Aflatoxin and Ochratoxin in U.S. Grain Sorghum from 1975 and 1976 Crops. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **43**, 4, 922-926.
- SMITH, J.E. and M.O. MOSS (1985), *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, John Wiley & Sons, Great Britain (p. 83-87).
- SORENSON, W.G., C.W. HESSELTINE, O.L. SHOTWELL (1967), Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*, *Mycopathol. Mycol. Appl.* **33**: 49-55.
- STEYN, P.S. ed. (1980), *The biosynthesis of mycotoxins: a study in secondary metabolism*, Academic Press, New York.
- STOLOFF, L. (1976), Occurrence of mycotoxins in foods and feeds. In: "Mycotoxins and other Fungal Related Food Problems", J.V. Rodricks (ed.), *American Chemical Society*, Washington, 23-50.
- STOLOFF, L. (1977), *Aflatoxins. An Overview*, in *Mycotoxins in Human and Animal Health*, J.V. Rodricks, C.W. HesseLTine and M.A. Mehlman (eds.), Pathotox, Illinois.
- Taller Conjunto FAO/OPS sobre prevención y control de micotoxinas en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica, 23 de febrero de 1991.
- TRENK, H.L. and P.A. HARTMAN (1970), Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn, *Appl. Microbiol.* **19**, 5, 781-784.
- TRINDER, T.W. (1988), A survey of aflatoxins in industrially brewed South African sorghum beer and beer strainings, *J. Inst. Brew.* **95** (5), 307-309.
- TRUCKSESS, M.W., L. STOLOFF and P.B. MISLEVIC (1988), Effect of temperature, water activity and other toxigenic mold species on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on corn, pinto beans and soybeans, *J. of Food Protection* **51**, 5, 361-363.
- VAN WALBEECK, W., T. CLADEMENOS and F.S. THATCHER (1969), Influence of refrigeration on aflatoxin production by strains of *Aspergillus flavus*, *Can. J. Microbiol.* **15**: 629-632.
- VARSAVSKY, E., G. VAAMONDE, S.L. RESNIK (1985), *Micotoxinas, Panorama Actual en la República Argentina*, SECyT, Programa Nacional de Investigaciones en Tecnología de Alimentos.
- VON ZAHN, P. y I. RHEINHOLZ (1980), *Las múltiples facetas de la Investigación*. Econ Verlag, Düsseldorf, Viena.
- WATSON, D.H. (1984). Survey and control of mycotoxins in animal and human foods. *Chemistry and Industry*, 563-540.

- WINN, R.T. and G.T. LANE (1978), Aflatoxin Production on High-Moisture Corn and Sorghum with Limited Incubation, *J. Dairy Sci.* **61**, 762-764.
- ZUBER, M.S. (1977), Influence of plant genetics on toxin production in corn. In "Mycotoxins in Human and Animal Health", J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman (eds.), Pathotox, Illinois.