

Tesis de Posgrado

Evaluación de triticale, trigo y centeno como sustratos para la producción de aflatoxinas

Bilotti, Luis Gustavo

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos 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:

Bilotti, Luis Gustavo. (1999). Evaluación de triticale, trigo y centeno como sustratos para la producción de aflatoxinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3164_Bilotti.pdf

Cita tipo Chicago:

Bilotti, Luis Gustavo. "Evaluación de triticale, trigo y centeno como sustratos para la producción de aflatoxinas". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3164_Bilotti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS DE MAESTRIA
Evaluación del triticale, trigo y centeno como sustratos para la
producción de aflatoxinas

Ing. Agr. Luis Gustavo Bilotti

1997

Resumen

El triticale, cereal sintético derivado del cruzamiento del trigo con centeno, es un cultivo con promisorias perspectivas en cuanto a satisfacer las necesidades del hombre de más y mejores alimentos. Además de su buen rendimiento, ya sea como forrajera o para la producción de grano, el triticale parece combinar algunas de las mejores cualidades de sus antecesores. Junto con las aptitudes del trigo para la elaboración de diferentes tipos de alimentos, posee la capacidad que tiene el centeno de adaptarse a ambientes adversos, así como la resistencia a diversas plagas y enfermedades. La información existente sobre la contaminación de este cereal con micotoxinas es muy escasa. El principal objetivo de este trabajo de Tesis fue evaluar el comportamiento del triticale como sustrato para la biosíntesis de aflatoxinas, en comparación con los cultivos parentales. Para ello se obtuvieron las curvas de acumulación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en función del tiempo para los tres sustratos inoculados con una cepa toxicogénica (*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999) e incubados en condiciones ambientales controladas (25°C y actividad acuosa 0,925) durante 10 semanas. Los parámetros cinéticos obtenidos de estas curvas (P_i: período de iniciación de la producción de aflatoxinas; A_m: máxima concentración acumulada; T_m: tiempo necesario para alcanzar la acumulación máxima) permitieron comprobar que los dos cereales progenitores se comportan de manera diferente. Las concentraciones máximas de aflatoxinas fueron mayores en el centeno que en el trigo (de 5 a 10 veces para las diferentes toxinas), observándose también en el centeno una rápida colonización por parte del hongo toxicogénico. El triticale mostró un comportamiento similar al del trigo y ambos, también en comparación con otros granos como maíz y girasol, parecen ser sustratos poco propensos a la contaminación con aflatoxinas. La diferencia de comportamiento no parece estar relacionada con el tamaño de los granos, como se ha sugerido, sino con algunos de los constituyentes de la composición química que podrían tener influencia en la biosíntesis de las aflatoxinas. Otro aporte del presente trabajo es la puesta a punto de un método modificado de análisis de aflatoxinas que demostró poseer adecuadas características de ejecución en los tres sustratos estudiados.

Abstract

Triticale is a hybrid resulting from crossing wheat and rye. It combines many of the best qualities of both its prodigious parents. It can have most of wheat's qualities for making various types of noodles, pastries and some breads; and it can have most of rye's disease resistance, drought tolerance and adaptability to harsh environments. Little is known about mycotoxins contamination in this promising crop. The main purpose of this Thesis was to evaluate the triticale as substrate for aflatoxin accumulation in comparison with its parents. Aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂) accumulation curves were obtained for the three substrates inoculated with *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and incubated at 25°C

and water activity 0,925 for 10 weeks. Kinetic parameters from the accumulation curves (P_i : initiation period; A_m : maximum accumulation ; T_m : time for maximum accumulation) were analyzed. Rye was more prone than wheat to a fast colonization by *A. parasiticus* and accumulated larger aflatoxins quantities over the whole incubation period. Maximum aflatoxins concentrations on rye were larger (5 to 10 times for each toxin) than those obtained on wheat. Triticale behaved similarly to wheat: both of them were poor substrates for aflatoxins production, also in comparison with other grains such as corn and sunflower. It is well known that, in general, natural incidence of aflatoxins is low in small grains, but this behaviour seems to be more related with chemical composition than with the size of the seeds.

In this work a modified method was proposed for the aflatoxin analysis. According to its analytical attributes, this method is suitable for aflatoxins analysis on wheat, rye and triticale.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FCE y N BIBLIOTECA

*Evaluación de triticale, trigo y centeno como sustratos para la
producción de aflatoxinas*

Luis Gustavo Bilotti

Director de Tesis: Dra. Graciela Vaamonde

**Tesis presentada para optar al título de: Magister de la Universidad de
Buenos Aires en el área Bromatología y Tecnología de la
Industrialización de Alimentos**

-1997-

Índice

I. Introducción	
I.1. El cultivo de triticale	
I.1.1. Historia	1
I.1.2. Obtención del triticale	4
a) Trigo	5
b) Centeno	6
c) Creación del triticale	9
I.1.3. El grano de triticale	
I.1.3.1. Morfología	12
I.1.3.2. Composición química	12
a) Minerales y vitaminas	14
b) Componentes nitrogenados	14
c) Carbohidratos	15
d) Lípidos	16
e) Factores antinutricionales	16
I.1.3.3. Usos del grano en la alimentación	17
a) Productos de panificación	17
b) Usos para malteado y cervecía	19
c) Alimentación animal	21
d) Usos misceláneos	22
I.1.4. Plagas que afectan al triticale	22
I.2. Los hongos como agentes deterioro	23
I.2.1. Micotoxinas	24
I.2.2. Aflatoxinas	27
I.2.2.1. Factores que condicionan la producción de aflatoxinas en alimentos	30
a) Especie fúngica	31
b) Temperatura	33
c) Actividad de agua	35
d) Sustrato	36
I.3. Objetivos del presente trabajo	38
II. Materiales y métodos	
II.1. Sustrato	40
II.2. Acondicionamiento de los granos	40
a) Desinfección	40
b) Humedecimiento	41
c) Determinación de la actividad de agua	41
II.3. Preparación del inóculo	42
II.4. Inoculación	43
II.5. Incubación	43
II.6. Análisis de aflatoxinas	44

III. Resultados y discusión	
III.1. Características de ejecución del método de análisis de aflatoxinas	47
III.2. Curvas de acumulación de aflatoxinas en trigo, triticale y centeno	52
IV. Conclusiones	65
V. Bibliografía	67
VI. Tablas de datos	74

I. INTRODUCCION

I.1. *El cultivo de triticales*

I.1.1. *Historia*

Cuando en el campo, trigo y centeno se cultivan muy próximos, en raras ocasiones ocurre polinización cruzada. El conocimiento de este suceso fue aprovechado por Alexander Stephen Wilson, quien en su invernáculo de Escocia en 1876 cruzó por primera vez en forma deliberada estas dos especies. Wilson era un botánico aficionado que tomó polen de plantas de centeno y lo usó para fertilizar flores de trigo. Las plantas híbridas que él cultivó de las semillas resultantes fueron de gran interés para los biólogos pero no resultaron interesantes para los granjeros porque no se podían reproducir. Ahora se sabe que el trigo y el centeno imparten sus cromosomas a estas semillas, pero los mismos no se pueden aparear porque son incompatibles. Entonces aunque el híbrido produzca células huevo y polen permanece estéril.

La primera indicación de que esta línea de investigación no había caído en punto muerto llegó en 1891, cuando el botánico alemán Wilhelm Rimpau tuvo éxito al encontrar un híbrido de trigo y centeno que fue parcialmente fértil. Varias décadas más tarde, durante la cosecha de 1918, en los campos de cultivo de trigo de la Estación Experimental de Saratov en Rusia se obtuvieron miles de híbridos fértiles entre trigo y centeno. En la década siguiente, entre 1920 y 1930, investigadores soviéticos y suecos intentaron convertir estos especímenes en un cultivo. Pero a pesar de todos los esfuerzos, el hecho de que el polen de centeno pudiera fertilizar flores de trigo permaneció como una curiosidad académica. Los resultados de los

esfuerzos de investigadores suecos como Arne Muntzing y otros se encuentran resumidos en el libro "*Triticale: Results and Problems*" (1979). El nombre "triticale" apareció por primera vez en la literatura en 1935, y el mismo es atribuido a Tschermak, uno de los redescubridores de las Leyes Mendelianas. Esta denominación proviene de unir los nombres científicos de los géneros de trigo (*Triticum*) y del centeno (*Secale*) (Covas, G., 1983) La denominación correcta actual es: *x Triticosecale* Wittmack.

El próximo avance fundamental sobrevino en 1937 cuando los botánicos comprendieron que la colchicina, un alcaloide natural, podía duplicar los cromosomas en células en formación. Esto se usó para duplicar artificialmente los cromosomas de trigo y centeno de manera que el proceso meiótico pudiera proceder con una división reductiva normal. En 1938, Arne Muntzing trató los híbridos que había obtenido con colchicina y comprobó que los había transformado en plantas que producían semillas viables.

En 1954, los investigadores Sanchez Monge en España y Shebeski de la Universidad de Manitoba en Canadá realizan nuevos esfuerzos para mejorar los triticales a través de intercruzamientos y selección. Los canadienses recolectaron triticales de todo el mundo y su mayor éxito fue usarlo como puente para transferir la resistencia natural del centeno a las enfermedades de las hojas a los trigos duros canadienses. En este mismo período Sanchez Monge en España desarrolla la variedad Cachirulo que fue lanzada a la producción recién en 1969. En Hungría, Arpad Kiss desarrolló triticales tan exitosamente que en 1969 los agricultores húngaros sembraron 40.000 hectáreas de ellos, en su mayor parte destinadas a la alimentación animal (Varughese y col., 1996).

Hacia mediados de la década del 60 la Universidad de Manitoba en Canadá, y el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en México, establecieron un programa conjunto para desarrollar

el uso del triticales en países en vías de desarrollo. Pero en los lotes de investigación aparecen los primeros resultados desalentadores ya que los triticales que en Canadá igualaban los mejores rendimientos del trigo, en Méjico no producían ni la mitad que los mejores trigos mejicanos. Plantas que aparecían con excelente aspecto (algunas sobrepasaban al trigo en contenido de materia seca) presentaban rendimientos en grano deprimidos por su madurez tardía, enfermedades, tendencia al vuelco, arrugamiento, y la falla de muchas flores en producir semilla debido a no haberse superado totalmente la esterilidad híbrida (ACTI, 1989).

Para superar estas limitaciones muchos de estos triticales se cruzaron entre ellos y con trigo pan. Estos cruzamientos produjeron nuevos tipos que llamaron favorablemente la atención en varias partes del mundo ya que la productividad del cultivo parecía muy promisoría.

Estos primeros triticales se destacaban desde el punto de vista nutricional ya que sus granos contenían mucha mas proteína y lisina que el grano de trigo. Esto llevó a pensar que en algún momento este grano competiría con el trigo, pero estos primeros triticales comerciales eran primitivos y en la práctica demostraron tener muchas falencias agronómicas, como por ejemplo: bajo rendimiento en grano, fallas florales en la producción de semilla, semillas arrugadas, pobre adaptación a diferentes zonas climáticas, plantas con altura excesiva y pobre macollaje, susceptibles a enfermedades, granos con brotado precoz y bajo poder germinativo, además de pobre calidad panadera. Los observadores de esta masiva combinación de dificultades pensaron que las mismas nunca se podrían superar, y fue así como a mediados de la década del 70 los agricultores, las empresas agrícolas, las universidades y otros organismos de investigación abandonaron el trabajo sobre triticales (ACTI, 1989).

Unos pocos científicos no quisieron abandonar el trabajo y en Méjico un grupo de investigadores en trigo del CIMMYT mantuvo viable un programa de investigación en triticales. Fue así como un hecho fortuito sucedió en una de los criaderos: plantas silvestres de triticales fueron fertilizadas por polen de plantas de trigo pan enano. El resultado fue que después de unas pocas generaciones de selección surgió una nueva línea que se llamó Armadillo. Esta variedad presentaba buena fertilidad de sus flores, altos rendimientos en grano, no era sensible a la cantidad de horas de luz del día, las plantas eran de poca altura y de caña rígida, de madurez temprana y sus granos eran sólo parcialmente arrugados. De esta forma la variedad Armadillo ayudó a resolver muchos de los problemas agronómicos de los triticales, ya que como se descubrió más tarde estas características eran estables y heredables.

En menos de una década el accidente de la naturaleza que originó Armadillo se había convertido en un grupo de genes contenido en muchos triticales a los cuales les daba adaptabilidad a distintos tipos de suelos, fotoperíodos, regímenes de temperatura y precipitación, así como también a enfermedades y buena aptitud panadera.

1.1.2. Obtención del triticales

Las plantas de diferentes géneros están normalmente separadas por fuertes barreras de infertilidad y no se cruzarán porque el polen de una es incompatible con el óvulo de la otra. Estas barreras naturales dificultaron la creación del triticales, ya que en la naturaleza la necesaria polinización cruzada es bastante poco frecuente y solo tiene éxito cuando el centeno es el parental macho.

a) Trigo

El trigo en sí mismo evolucionó a partir de hibridaciones naturales; él también es un compuesto de diferentes especies. Existen tres tipos principales entre los trigos cultivados en la actualidad, cada uno es genéticamente diferente del otro y está caracterizado por un diferente número de cromosomas.

Trigos Diploides: El trigo cultivado más primitivo es un pasto llamado "einkorn" (*Triticum monococcum*), que es la forma domesticada de la especie salvaje *Triticum boeoticum*. El "einkorn" es una especie diploide y todavía se la cultiva en algunas partes de Turquía y al sur de Rusia.

Trigos tetraploides: Miles de años atrás el "einkorn" se hibridizó con otro pasto salvaje diploide, hasta la actualidad no se sabe con certeza cuál fue esa especie, pero era probablemente muy similar a una llamada *Aegilops speltoides*. La posibilidad de duplicación de los cromosomas resultó en un trigo tetraploide. Estos tetraploides tenían en un principio sus granos muy protegidos y fuertemente agarrados, pero después que fueron puestos en cultivo aparecieron mutantes con los granos desnudos y de fácil separación. Durante 7000 años los agricultores han seleccionado, sembrado, cosechado, y resembrado semillas de estas plantas transformándolas gradualmente en los modernos y productivos trigos actuales. Entre estas creaciones figura el trigo duro (*Triticum turgidum* var. *durum*), uno de los dos que en la actualidad alimentan al mundo.

Trigos Hexaploides: De forma subsecuente los trigos tetraploides se hibridaron con otra especie salvaje llamada *Aegilops squarrosa*. Otra vez los cromosomas se duplicaron y el resultado fue un trigo hexaploide. Después de miles de años de cultivo también se transformó en una especie valiosa, el conocido trigo pan (*Triticum aestivum*). Esta es la especie más ampliamente cultivada en el mundo por sus características panaderas.

Para acortar las designaciones los genetistas usan letras para indicar los grupos de cromosomas aportados por cada antecesor. El grupo de cromosomas del “einkorn” es designado con la letra A; el grupo de cromosomas que recuerda al *Aegilops speltoides* se designa con la letra B; y el grupo del *Aegilops squarrosa* con la letra D.

Con esta nomenclatura, las series de pasos que condujeron a la obtención de los actuales trigos resultan más claros. Cuando el “einkorn” (AA) se hibridizó con una especie que podría ser el *Aegilops speltoides* (BB) se originó un trigo duro tetraploide cuya composición cromosómica es designada AABB. Cuando uno de estos tetraploides se hibridiza con *Aegilops squarrosa* (DD) aparece un hexaploide cuya denominación cromosómica es AABBDD. El grupo de cromosomas D contribuye marcadamente a la fuerza del gluten que hace que estos trigos sean panificables (Fig. I.1. y I.2)

b) Centeno

El centeno es un cultivo probablemente originario del sudoeste asiático, al cual no se le prestó gran atención hasta que se lo empezó a cultivar en Europa Central (aproximadamente 1000 d.C.). La característica sobresaliente de este cereal es su robustez. Probablemente haya llamado al principio la atención de los agricultores por ser un vigoroso invasor de los campos de trigo, pero luego se comenzó a apreciar su vitalidad y su capacidad para adaptarse mucho mejor que el trigo a suelos infértiles de gran acidez y a climas extremos. Esta capacidad de soportar ambientes duros lo ha confinado a los peores suelos y a las condiciones ambientales más desfavorables, a tal punto que en ocasiones se lo llama “grano de los pobres”. Pero justo esas características son las que lo hacen más atractivo en la situación actual de la población mundial, dado que al ser necesario expandir las áreas cultivables para mantener la producción de alimentos, los

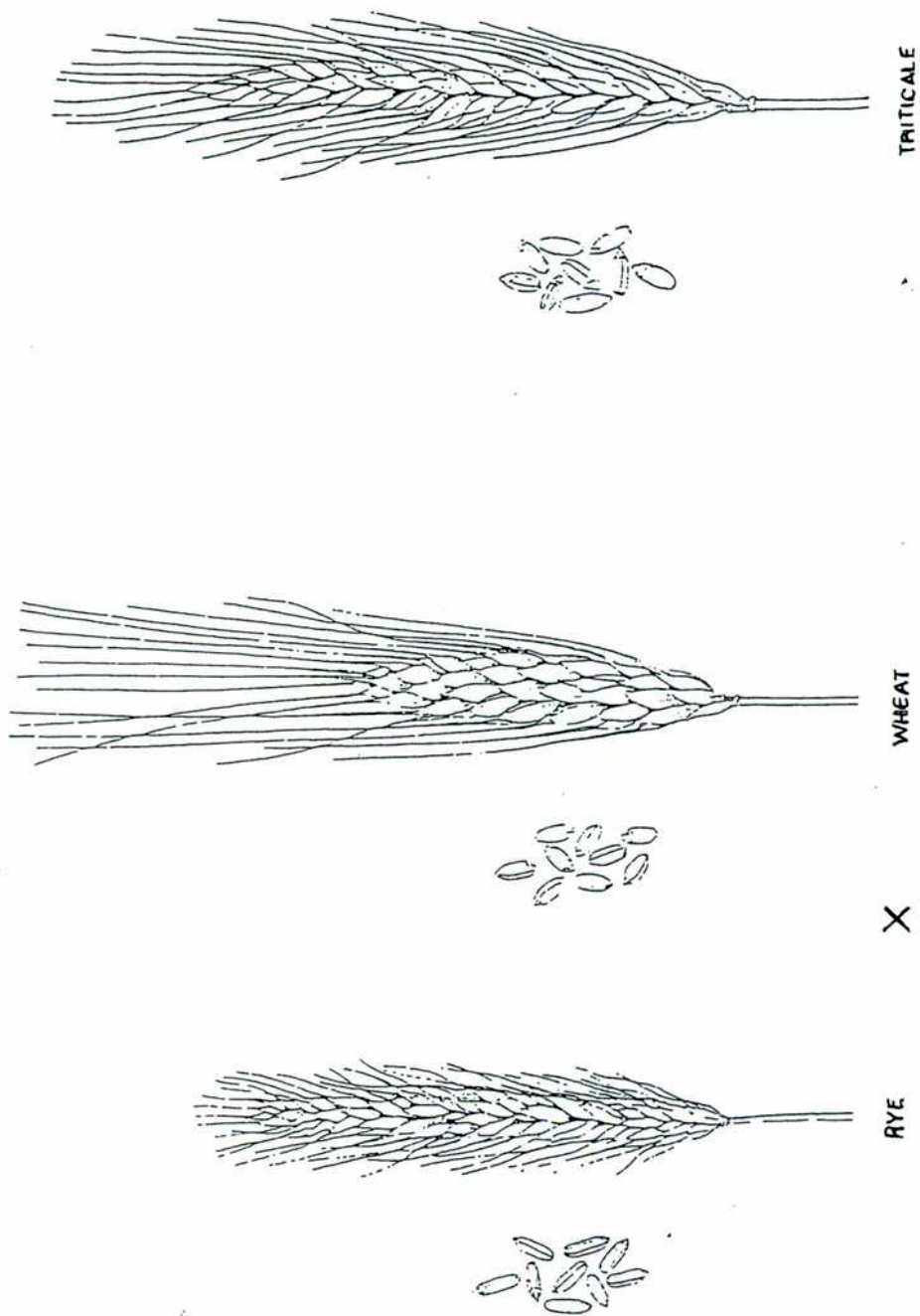


Figura I.1. Espiguillas de centeno, trigo y triticale

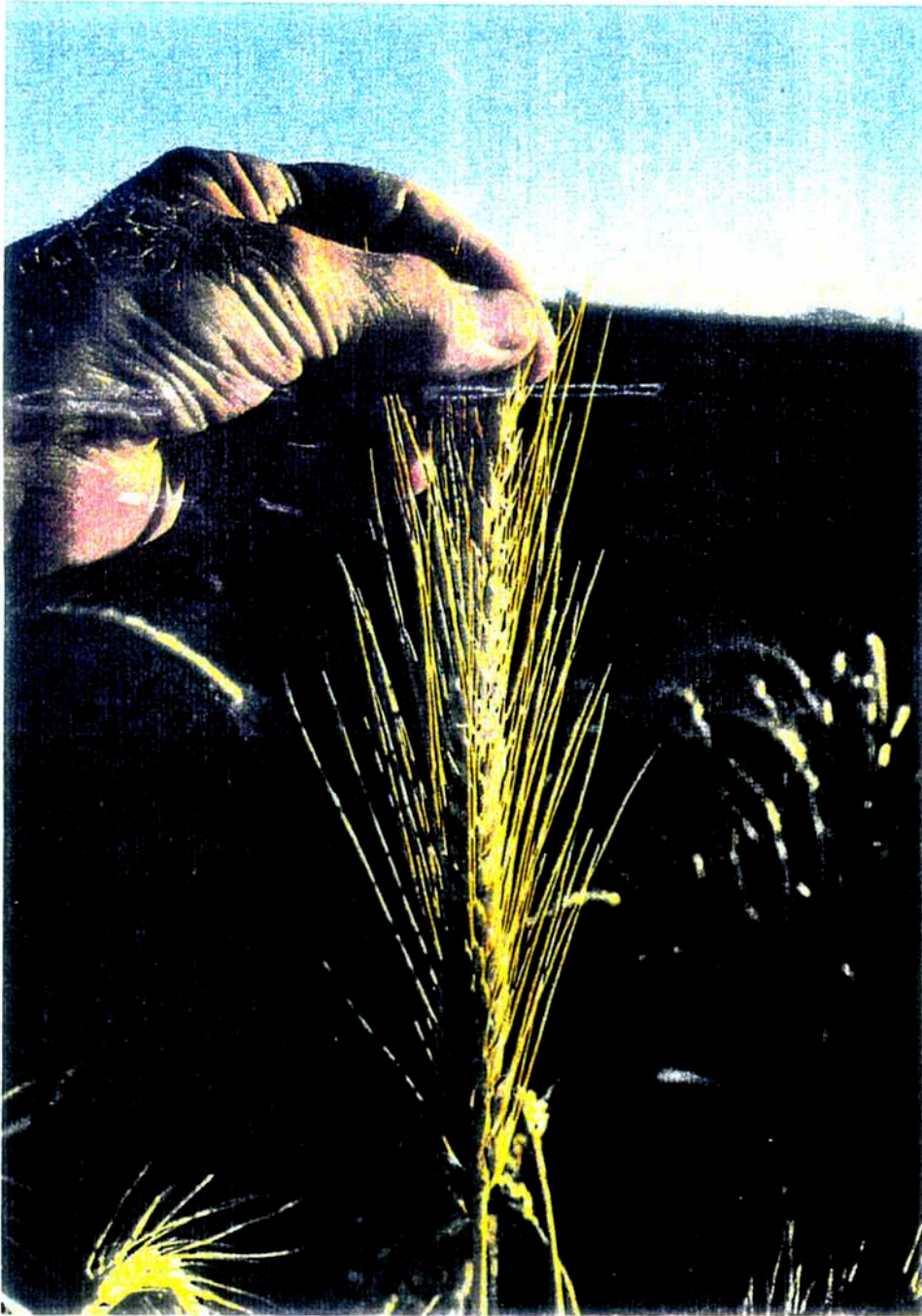


Figura I.2. Fotografía de una espiguilla de triticales

granos capaces de ser cultivables en áreas marginales se tornan más valiosos. Entre los problemas que afectan al centeno se puede mencionar su pobre polinización, su susceptibilidad al ergot que lo puede tornar tóxico para el consumidor y ciertos factores antinutricionales que pueden afectar a los animales.

Si bien en la actualidad es mucho menos popular que el trigo, puede ser empleado al igual que éste en panificación. Aunque su harina no tiene el mismo poder leudante, es apto para la elaboración de ciertos tipos característicos de pan, de modo que se lo considera como el segundo grano en importancia desde el punto de vista de la panificación (ACTI, 1989)

c) Creación del triticales

Para la creación del triticales la planta elegida de trigo es emasculada, en otras palabras, las anteras, que son los órganos reproductivos masculinos, son removidas para que no pueda ocurrir la autofertilización. En el momento de la floración, se recolecta polen fresco de las plantas de centeno elegidas como padre y se transfiere a los estigmas, órgano reproductivo femenino de las flores de trigo previamente emasculadas.

Las células fertilizadas, embriones, producidas de esta fertilización cruzada, portan un solo juego de cromosomas de ambos padres. El centeno es una especie diploide y por lo tanto tiene dos grupos de cromosomas, designados R. Si se poliniza trigo pan (AABBDD) con centeno (RR) se produce un híbrido con una fórmula cromosómica designada ABDR. Este es el tipo estéril de híbrido haploide que Wilson produjo en 1876.

Para hacer un triticales que produzca semilla las plantas haploides son tratadas con una solución diluida de colchicina. Generalmente se riegan las plantas con esta solución que migra hacia la zona de la corona del macollo en crecimiento. En la región apical en crecimiento se está produciendo la división celular y allí la colchicina suprime la separación ordenada de los

cromosomas. De este modo las cromátides hermanas permanecen unidas y la membrana celular que debería crecer entre ellas no se forma. El núcleo resultante retiene ambos grupos de cromosomas, por lo tanto en vez de ser ABDR, se duplica en un triticales octaploide AABBDDRR. Cada cromosoma ahora tiene una pareja y se puede producir una división reductiva normal cuando llegue el momento de formación de las células germinales.

Si en cambio se poliniza trigo duro (AABB) con centeno (RR) casi nunca se produce la semilla híbrida madura (ABR). Sin embargo el polen logró fertilizar algunos óvulos y los embriones resultantes crecen por unos 15 días para luego ser abortados por la incompatibilidad del endosperma. Estos embriones pueden ser retirados y mantenidos en un medio de cultivo estéril que provee los nutrientes. Cuando estos embriones crecen y se transforman en plantas todavía son estériles pero un tratamiento con colchicina produce triticales hexaploides parcialmente fértiles (AABBRR).

Todos los esfuerzos mundiales se centran en la obtención de estos triticales hexaploides ya que tienen mejor vigor y estabilidad reproductiva que los octaploides. Además también presentan mejor resistencia a enfermedades y respuesta a la selección. Lamentablemente como provienen de trigo duro la pérdida de los cromosomas D empobrece sus cualidades panaderas.

Los triticales octaploides como contienen el genoma D tienen mejores características de panificación, pero lamentablemente son inestables y tienen un comportamiento impredecible en el campo. A pesar de estas características los triticales octaploides han sido valiosos en el mejoramiento de los hexaploides (Fig. 1.3.)

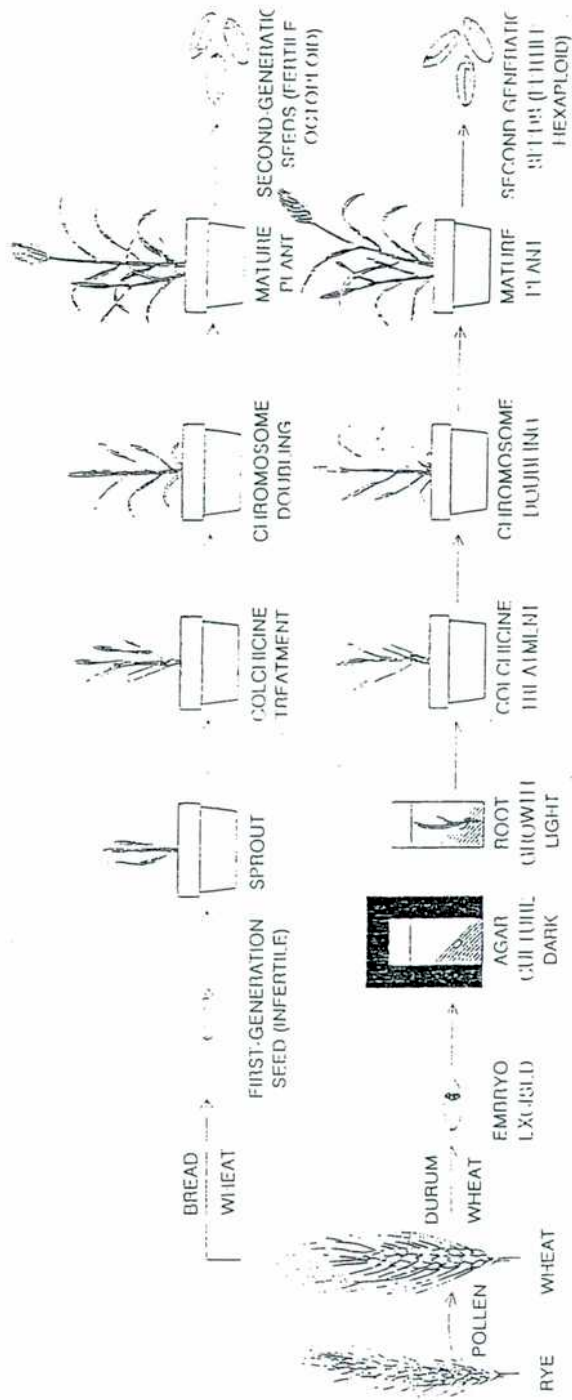


Figura I.3. Esquema de obtención del triticale

1.1.3. El grano de triticales

1.1.3.1. Morfología

El tamaño, forma, y color del grano de triticales se asemeja mucho más al grano de trigo que al de centeno. El triticales tiene granos más grandes y más largos que los de trigo con un color ligeramente más oscuro lo cual resulta de su típica apariencia arrugada principalmente en su zona ventral. Sin embargo los estudios de microscopia óptica y electrónica han demostrado que el arreglo y tamaño del pericarpio, capa de aleurona, y estructuras endospermales del grano son similares a las del trigo y centeno (Peña y col.,1982). En general los granos de los triticales que maduran más temprano presentan una apariencia más arrugada que varía desde leve a severa.

Peña y col. (1982) estudiaron los cambios morfológicos que ocurrían durante la maduración del grano para determinar las causas del arrugamiento. Ellos observaron que la cantidad de células del endosperma no fue suficiente para llenar la cavidad vacía del grano y en consecuencia el pericarpio, las cubiertas seminales, y las células de la capa de aleurona se colapsaron en la cavidad vacía del endosperma. Esto ocurre en las etapas tempranas del desarrollo del grano. En todo este proceso parece estar implicada la actividad de α -amilasa, la alta producción de endosperma aberrante, la actividad de fosfatasa ácida, y la de ADP glucopirofosforilasa.

A partir de mediados de los años 70 la presión de selección aplicada ha disminuido este efecto (Fig. I.4.)

1.1.3.2. Composición química

La composición química aproximada se asemeja mucho más a la del trigo que a la del centeno, excepto por el contenido de azúcares que es más alto



Figura I.4. Fotografía de granos de triticales antiguos y mejorados

que en el trigo y se asemeja mucho a la del centeno. Estas semejanzas se deben a que el triticales recibe dos grupos cromosómicos del trigo y sólo uno del centeno.

a) Minerales y vitaminas

Lorenz y colaboradores (1974) examinaron la composición mineral de triticales. Ellos encontraron en triticales mayores niveles de potasio, fósforo y manganeso que en ambas especies parentales; los contenidos de sodio, hierro y zinc fueron mayores que en trigo.

Michela y Lorenz (1976) estudiaron la composición vitamínica comparada entre los tres cereales encontrando que los niveles de riboflavina, biotina, folacina, y vitamina B6 eran similares entre ellos. Triticales y centeno presentaban menos niacina que el trigo y sólo un poco menos de ácido pantoténico.

En triticales, al igual que en trigo y centeno, la remoción de las cubiertas seminales (pericarpio y capa de aleurona) y el embrión durante la molienda lleva a la pérdida de la mayor parte del contenido en minerales y vitaminas presentes en el grano.

b) Componentes nitrogenados

Aminoácidos: Una de las razones que hizo a los triticales atractivos como nuevos cultivos potenciales fue su buen valor nutricional como lo demuestra su contenido proteico, particularmente por su alto contenido en lisina, ya que éste es uno de los primeros aminoácidos limitantes en cereales. Los triticales actuales tienen menor contenido proteico que los primitivos, pero se encuentran mayores niveles de lisina cuando los contenidos de proteína son bajos que cuando son altos. Tanto en triticales como en trigo y centeno la

composición de aminoácidos de la proteína varía como una función hiperbólica del contenido de nitrógeno total.

Proteínas: Como en todos los cereales son el factor que define el uso final del grano. La expresión de la cantidad y calidad (nutricional y funcional) de proteínas que están bajo control genético se encuentra significativamente influenciada por el ambiente y las prácticas culturales. El triticale no es una excepción y por lo tanto su cantidad y calidad proteica es lo que define su uso como alimento humano o animal. Normalmente su contenido varía entre 10 y 16%, ejerciendo el trigo mayor influencia en esta composición. También se observa que los granos arrugados tienen mayor contenido proteico que los lisos (Varughese y col., 1996). Estos mismos autores señalan que el contenido de albúminas y globulinas es mayor en triticales hexaploides que en trigo, mientras que es menor el contenido de proteínas solubles en alcohol, ácido e insolubles en ácido. Estas diferencias son las responsables del bajo contenido en proteínas del gluten en triticales. Una alta actividad enzimática es común en estos granos, la misma se concentra en la capa de aleurona y el endosperma exterior. Desde el punto de vista de la calidad panadera esto deprime las propiedades funcionales en el amasado, pero afortunadamente existen triticales resistentes al brotado precosecha. Son importantes desde este punto de vista la actividad de α -amilasa y la de proteasas, aunque estas últimas varían mucho su actividad entre genotipos y lugares de cultivo. La moderadamente alta actividad proteolítica de triticale no es perjudicial para su calidad panadera dado que el mismo presenta una aceptable fuerza de masa.

c) Carbohidratos

Almidón: El triticale presenta un contenido de almidón similar al de trigo y mayor que el de centeno, pero esta diferencia desaparece cuando se pasa de

grano a harina. Se ha encontrado que: en morfología (formas redondeadas y lenticulares presentes), tamaño, contenido de amilosa, temperatura de gelatinización, y afinidad por el yodo, el almidón de triticale es similar al de trigo y centeno. Los valores de consistencia de pasta a 92 y 35°C son mayores que para los almidones de sus padres. (Varughese y col., 1996).

Pentosanos: El contenido de pentosanos totales y solubles en grano es similar en triticale y trigo y mucho menor en centeno. En harina el contenido de pentosanos solubles en agua y la viscosidad de los extractos presentaba una variación inversa. Esto no parece ser una desventaja en el uso del triticale para producir pan o alimento para animales (Saini y Henry, 1982).

d) Lípidos

El contenido de lípidos totales (libres + unido) es similar en triticale, trigo, y centeno; y varía entre 3 y 4,5%. En lo que respecta a la composición parecen predominar los triacilglicéridos sobre el resto de lípidos no polares. digalactosil diglicéridos y fosfatidil etanolamina se encuentran en mayor proporción que el resto de lípidos polares, tanto en grano entero como en harina (Bertoni y col., 1995).

e) Factores antinutricionales

El triticale presenta niveles variables de inhibidores de tripsina que caen entre los observados para trigo y centeno. Los niveles de alquil resorcinol que reducen la ingesta y la ganancia de peso en animales, en triticale se parecen más a los de trigo que a los de centeno, en los tres cereales el contenido de este compuesto es mayor en la fracción de salvado que en la harina. En dietas animales no se observaron efectos antinutricionales en grano de triticale asociados al contenido de este compuesto. (Varughese y col., 1996).

El ácido fitico es la principal forma de almacenamiento de fósforo en semillas de granos pequeños, y es mencionado por algunos investigadores como un factor antinutricional. Esto es así porque muchos elementos minerales como Zn, Ca, Cu, Mg, y Fe forman quelatos con el ácido fitico en el tracto digestivo de humanos y animales monogástricos haciendo imposible su absorción. En los cereales el ácido fitico se concentra en el germen y la capa de aleurona, mientras que el endosperma se encuentra prácticamente libre del mismo. Feil y Fossati (1997) indican que el contenido de ácido fitico en triticales es similar al encontrado en trigo, y al igual que en éste el mejoramiento para obtener mejores rindes de grano tiende a reducir el contenido de ácido fitico.

1.1.3.3. Usos del grano en la alimentación

a) Productos de panificación

La harina de trigo puede ser completamente reemplazada por triticales, sin modificar los métodos de horneado, cuando va a ser usada en productos que requieran bajo contenido proteico, baja absorción de agua y mínima resistencia a la extensión. Las masas de triticales son débiles a causa de su relativamente bajo nivel de gluten, baja fuerza del mismo y alto nivel de actividad de amilasa. Por lo tanto es adecuado para productos en los que se usa el trigo pan, esto incluye galletitas, tortas, biscuits, waffles, panqueques, y tortillas.

Entre los productos no levados que se han producido con triticales se incluyen:

Chapatís, son panes chatos del sur asiático para cuya producción este cereal ha sido en algunos casos mejor que el trigo. Tortillas, esta típica comida mejicana tiene el mismo sabor cuando es de triticales que siendo de trigo,

aunque cuando es hecha con harina no blanqueada el color es gris amarillado; los pobladores de Michoacán (México) indican que su masa es más fácil de achatar que la de trigo lo cual hace más sencilla la preparación. Concha, este es un pan dulce hecho de grano entero muy popular en México, para el cual también se ha usado triticale sin problemas. Enjera, es la comida nacional etíope para cuya preparación el 50% de las harinas que se usan pueden ser reemplazadas por triticale (ACTI, 1989).

Los productos levados producidos con harina de triticale con propiedades panaderiles forman hogazas marrones parecidas a las de harina integral, y cuyo sabor es una combinación del de los panes de trigo y centeno. El pan se eleva porque el gluten atrapa y mantiene burbujas de gas producidas por las levaduras. Las proteínas de triticale representan una mezcla de las encontradas en trigo pan y centeno, lo cual es extraño ya que la mayor parte de los triticales usados en la actualidad (hexaploides), provienen del cruzamiento de centeno con trigo duro el cual ha perdido el genoma D, responsable de la calidad panadera del trigo. Aún así, los hechos demuestran que el contenido de gluten es bueno y la masa se eleva bien, originando panes de tamaño y porosidad normal, con buen flavor. Las pruebas de horneado de líneas avanzadas de triticale con grano liso han producido hogazas con un volumen similar al volumen de pan de trigo control. Sin embargo los procedimientos de panificación deben ser ligeramente modificados, la temperatura de fermentación debe ser disminuida y se debe aumentar un poco la concentración de levaduras. Usando los métodos de horneado normal muchos panes pueden ser hechos usando una mezcla 30:70 de triticale y trigo pan obteniendo panes iguales a los obtenidos con trigo pan puro. Aún así, los mejores triticales no pueden ser usados en forma pura en equipos de mezclado de alta velocidad dada la alta pegajosidad de su masa.

El triticale también puede ser mezclado con harinas que no sean de trigo; combina bien, por ejemplo, con proteína de maíz de alta calidad, contribuyendo ambos a la lisina de la dieta. También tiene uso potencial en alimentos en base a cereal como los copos para desayuno.

En Argentina un grupo de investigadores de la Universidad de Córdoba y del CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos) estudió la calidad de las harinas de 10 líneas de triticale en experimentación avanzada y analizó la utilidad de las mismas en la manufactura de galletitas y los factores que la afectan. Ellos demuestran que las harinas de los triticales Tatú, LA 24 Bve, Cananea, y Currency son adecuadas para la elaboración de galletitas, y que esto depende de la relación entre el contenido de prolaminas y glutelinas de la harina. Del mismo modo demuestran que la capacidad de retención de agua alcalina no es eficiente para caracterizar la calidad de la harina para la fabricación de galletitas como sí lo es en trigo. (Leon y col.,1996) (Fig. I.5.)

b) Uso para malteado y cerveceria

El lado positivo de la alta actividad de amilasa en el grano de triticale es su uso para producir malta y cerveza. Usando las mismas condiciones de malteado el triticale presenta altas pérdidas en el malteo, pero una mayor actividad diastásica y mayor actividad de α - y β -amilasa que cebada. Estas diferencias se deben a la longitud de la germinación y al humedecimiento durante la misma. Los compuestos obtenidos del malteado tienen alto contenido en compuestos nitrogenados y color oscuro, indicando alta actividad proteolítica de la malta. Las cervezas obtenidas de triticales son en



Figura I.5. Fotografía de productos de panificación de triticales

general mas oscuras que las de cebada, y presentan satisfactoria claridad y estabilidad del gas, siendo su gusto aceptable. (Varughese y col.,1996)

c) Alimentación animal

La mayor parte del triticale producido es usado en la alimentación de aves, rumiantes y monogástricos ya sea como forraje o como grano. Es un buen sustituto de otros granos y puede servir como sustituto parcial de otra fuente proteica como la harina de soja.

Un problema importante en el uso como grano es que este cultivo exhibe una gran variación en su contenido proteico en diferentes años de cultivo, lo cual hace que no se puedan agregar cantidades fijas del mismo en las fórmulas dietarias.

Varughese y col. (1996) señalan que los triticales estan viendo aumentado su uso como cultivo de pastoreo o doble propósito. Los requerimientos en términos de hábito de crecimiento y combinaciones agronómicas y nutricionales tienen grandes variaciones que dependen del lugar de cultivo, manejo, y uso del cereal. Estos usos incluyen: 1) monocultivo, 2) cereal de invierno consociado con leguminosas, 3) forraje para pastoreo o para henificación, y 4) doble propósito forraje/grano. Las mezclas pueden mejorar la cantidad y/o calidad del forraje. Khorasani y col. (1997) realizan una escala de calidad de forraje que los ubica en orden decreciente de la siguiente manera: cebada, cebada/triticale, triticale, y avena. Allí, además, señalan que la combinación cebada/triticale es una buena mezcla como silo de grano. Royo y Tribó (1997) también estudiaron las posibilidades del triticale como cultivo doble propósito en España, comparándolo con cebada, llegando a valiosas conclusiones respecto de la eficiencia fotosintética de este cultivo.

d) Usos misceláneos

El triticale ha sido usado como cultivo de cubierta para prevenir la erosión en suelos de viñedos de Sudáfrica, así como también para controlar la erosión eólica en campos de producción de algodón en Tejas. Otro uso propuesto es como material crudo para la producción de bioalcohol. Wang y col., (1997) señalan que los rendimientos de etanol varían entre 362 y 367 litros/tonelada de grano de triticale con 14% de humedad, y que la eficiencia de fermentación varía entre 90 y 91% , lo cual lo convierte en reemplazante del trigo en este uso ya que es de menor costo.

1.4. Plagas que afectan el triticale

Con la expansión del área de cultivo de triticale, este cereal ha sido susceptible de ser atacado por las mismas enfermedades y insectos que atacan trigo y centeno. El triticale pareciera ser resistente al ataque de hongos como *Puccinia sp.*, *Septoria sp.*, *Ustilago sp.*, *Tilletia sp.*, y *Erysiphe sp.* También a insectos como algunos pulgones (*Schizaphis graminum*), al áfido *Diurapis noxia*, a algunos nematodos y virus (Covas, G., 1983).

Del mismo modo se señala su escasa resistencia a *Fusarium sp.*, *Helminthosporium sp.*, y enfermedades bacterianas producidas por *Xanthomonas sp.*, y *Pseudomonas sp.* El mejoramiento se enfoca hacia la resistencia a estas enfermedades. Mejoras significativas se han logrado en este sentido contra *Fusarium* (Varughese y col., 1996). Nada se menciona en estos reportes acerca de las plagas que afectan los granos de triticale almacenados, y se desconoce por lo tanto su comportamiento como sustrato para estos ataques.

1.2. Los hongos como agentes de deterioro de los granos

Las semillas de las plantas cultivadas constituyen una fuente primordial de alimento para humanos, animales domésticos y la materia prima de muchos productos industriales. Desde que comienza a formarse la planta hasta su uso o consumo final, están sujetas al daño y destrucción por una gran variedad de agentes biológicos, dentro de los cuales los hongos son los más importantes. Los hongos que invaden las plantas durante el cultivo en el campo, pueden causar varios problemas(Christensen, 1991). *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Cladosporium* producen alteraciones en el color de las semillas. Las semillas invadidas por estos mohos pueden presentar un bajo porcentaje de germinación y vigor reducido de las plántulas que se originan de ellas cuando se siembran. En el caso de la cebada, disminuye su capacidad para producir buena malta. Otros hongos además de los mencionados, como por ejemplo *Fusarium*, pueden causar patogenicidad en las plantas que crecen de las semillas infectadas. Diversas enfermedades de trigo son causadas por hongos que se encuentran en las semillas (*Fusarium*, *Alternaria*, *Ustilago*, etc.).

En las etapas post-cosecha, los granos pueden ser sumamente estables siempre que se los mantenga en condiciones adecuadas, esto es con bajos niveles de humedad y temperaturas moderadamente bajas. Las semillas sanas en tales condiciones pueden ser consumidas por años manteniendo su calidad como alimento y aún su germinabilidad. Si las condiciones de almacenamiento permiten el desarrollo de "hongos de almacenamiento" la calidad de los granos, ya sea como alimento humano o animal, o como semilla puede verse seriamente afectada. Los hongos típicos del almacenamiento comprenden varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y, bajo ciertas circunstancias *Wallemia*, *Chrysosporium* y

Candida; todos ellos capaces de crecer en sustratos con baja cantidad de agua disponible (Frisvad, 1991).

El desarrollo de estos hongos en los granos puede causar daños como reducción de la germinabilidad, decoloración o alteración en el color de las semillas, degradación de hidratos de carbono, degradación de proteínas, degradación de lípidos y aparición de olores indeseables. Otra consecuencia importante de la contaminación de los granos es la producción de micotoxinas.

1.2.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidas por ciertas especies de hongos que pueden contaminar diversos sustratos, incluyendo alimentos que ingiere el hombre y los animales. Las enfermedades ocasionadas por la ingesta de alimentos contaminados por estas toxinas se denomina micotoxicosis.

La primera micotoxicosis descrita, el ergotismo, causada por el consumo de centeno contaminado con *Claviceps purpurea*, fue responsable de gravísimas epidemias en Europa y Lejano Oriente desde la Edad Media (Kurata, 1990). Los metabolitos tóxicos del hongo fueron identificados como alcaloides en 1875. Eso fue seguido en 1911 por la identificación de un síndrome asociado con la ingestión de un pan elaborado con granos infectados con *Fusarium graminearum* y por el reconocimiento en 1940 de estaquiobotriotoxicosis en caballos asociados con heno colonizado por especies de *Stachybotris*.

Entre 1940 y 1947 se produjo en ciertas regiones de Rusia una enfermedad denominada Aleuquia Tóxica Alimentaria (ATA), que fue asociada a la infección con *Fusarium poae* y *F. sporotrichiodes* de trigo y mijo que habían permanecido en el campo durante todo el invierno.

En Inglaterra en el año 1960 se produjo una enfermedad que afectó a las aves de corral, especialmente pavos, causando la muerte de millares de animales debido a necrosis hepática (Alcroft y col., 1963). Por su etiología desconocida se la denominó originalmente enfermedad X de los pavos (Turkey X disease). Posteriormente las aflatoxinas fueron descubiertas como el agente etiológico de esta enfermedad. Debido a que luego se probó que las aflatoxinas son potentes hepatocancerígenos numerosos investigadores de todo el mundo concentraron su investigación sobre esta materia.

En la actualidad se conocen muchas micotoxinas, pero la mayor parte de ellas han sido sólo parcialmente evaluadas en relación al problema sanitario que pueden presentar para los seres humanos y los animales. Las más estudiadas hasta el presente son las aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina, tricotecenos y fumonisinas. Estas toxinas comparten las siguientes características:

- a) Son capaces de producir efectos adversos bien definidos en diversas especies animales.
- b) Existe evidencia de exposición humana de grado variable a través de la contaminación de uno o varios componentes de la dieta.
- c) Existe algún tipo de patología humana, de etiología desconocida, cuya sintomatología puede ser compatible con la que cabe esperar de los efectos de estas toxinas.
- d) Existen numerosos casos de brotes de micotoxinas en ganado y animales de granja, en los cuales ha sido bien documentada la presencia de alguna de estas sustancias.

Por otro lado están aquellas toxinas de las que sólo se han detectado brotes de micotoxicosis en animales, pero no existe evidencia hasta el momento de exposición o de patología humana. Este es el caso de la esterigmatocistina, toxinas tremorgénicas, y citrinina.énicas, y citrinina.

Por último están aquellas que sólo han demostrado ser tóxicas en sistemas experimentales, es decir que hasta el momento no se ha encontrado que produzcan intoxicaciones en el hombre o animales. Dentro de éstas podemos considerar la patulina, el ácido penicílico, la toxina PR, y muchas otras.

Es importante tener en cuenta que:

a) 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 determinada micotoxina. Moss y Badii (1982) demostraron que *Penicillium purpurogenum* que produce rubratoxina puede favorecer la formación de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus*.

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 aflatoxina/ toxina T2 (Moss, 1984).

b) 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 receptoras 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).

c) 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).

1.2.2. Aflatoxinas

Las **aflatoxinas** son una familia de metabolitos secundarios producidos por ciertas cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius*. Constituyen un grupo de compuestos químicamente relacionados (difuranocumarinas), de las cuales la B₁, G₁ y M₁ son de importancia primaria en la naturaleza. Sus derivados dihidrogenados (B₂ y G₂) aparecen en menor cantidad. (Fig. 1.6.).

Al parecer hay más cepas de *A. parasiticus* productoras de aflatoxinas que de *A. flavus*. *A. parasiticus* prevalece más en áreas tropicales y subtropicales, mientras que *A. flavus* es más común en áreas templadas. Las

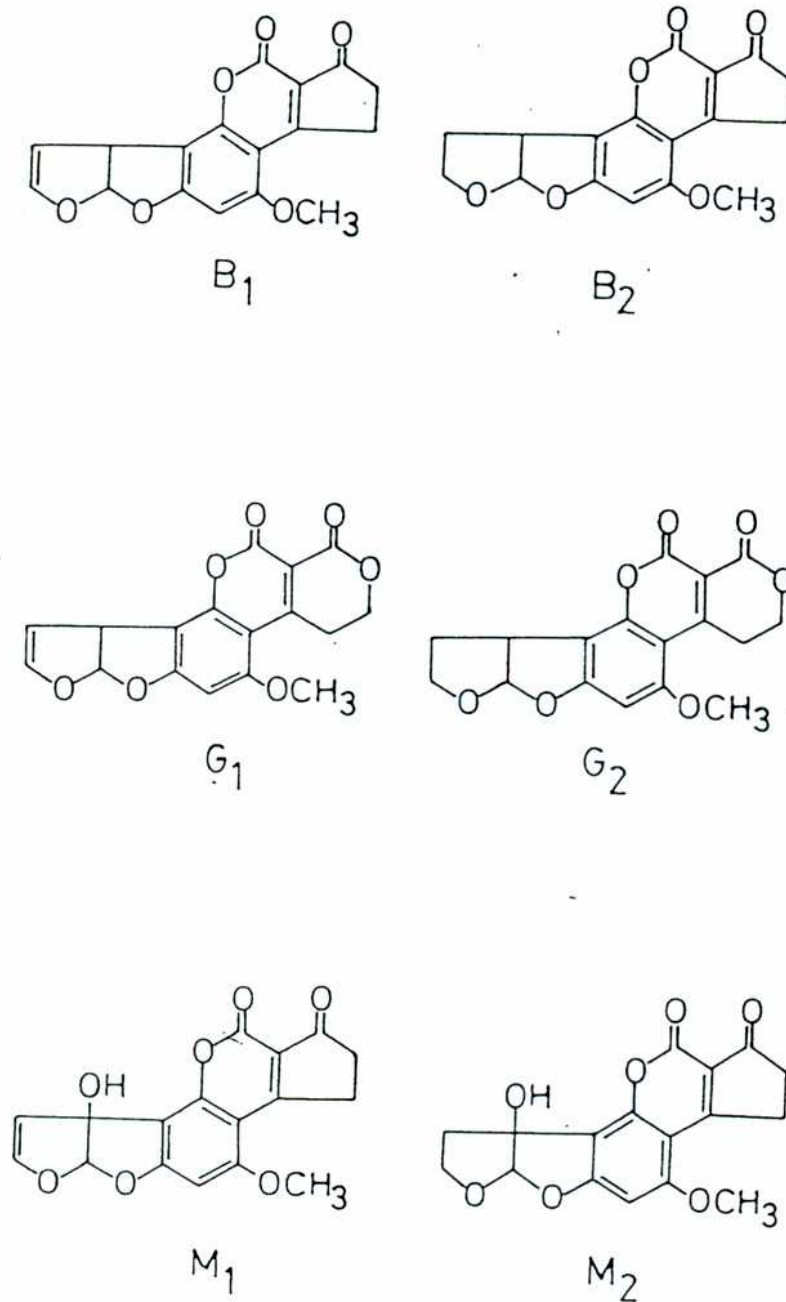


Figura I.6. Estructura química de las aflatoxinas

especies de *A. nomius* han sido identificadas más recientemente (Kurtzman y col., 1987), y no se tienen datos sobre su distribución en alimentos. (Pitt, 1983).

De 283 aislados de *A. flavus* de arroz en Tejas, 268 (84%) produjeron alguna aflatoxina cuando crecían en cultivo puro en el laboratorio, y 88 (33%) de ellos produjeron todas las aflatoxinas (Frisvad, 1991). En contraste, ninguna de las cepas de *A. flavus* aisladas de alimentos sospechosos de estar implicados en enfermedades del ganado en Minnesota, produjeron micotoxinas cuando crecían en cultivos puros en el laboratorio.

Por lo tanto la presencia del hongo en una muestra de alimento sospechoso no es evidencia de la presencia de la toxina. Se requieren condiciones especiales para que se produzcan cantidades apreciables de aflatoxinas:

1. Debe estar presente la cepa del hongo capaz de producirla
2. El hongo debe estar presente prácticamente como cultivo puro, no con una mezcla de cultivos
3. El contenido de humedad del sustrato debe ser tal que en el equilibrio tenga una actividad de agua (a_w) mínima de 0.85.
4. Una temperatura de entre 12 y 42°C.

Con respecto a la estabilidad, una vez que se formó un aflatoxina es extremadamente estable bajo las condiciones que se presentan en el almacenamiento, manipuleo y procesado de semillas u otras partes de la planta. Es resistente a las temperaturas normales de cocción y ebullición y no es destruida por cocción bajo presión e incluso por autoclavado a 121°C por tiempos relativamente prolongados (CAST, 1989).

El consumo diario de aflatoxinas podría ocasionar varios tipos de daños, dependiendo de la cantidad consumida, el tipo de animal, la edad del animal y la composición de la ración (animales con una dieta deficiente en proteínas

son más sensibles a los daños de las aflatoxinas que aquellos con una dieta bien balanceada).

El consumo de aflatoxinas por animales domésticos resulta en una variedad de signos y lesiones: disminución de peso, disminución de la eficiencia de la alimentación, hemorragia en los músculos y las cavidades corporales, y aumento a la susceptibilidad a la infección por microorganismos patógenos (Christensen, 1991).

En todos los animales hasta ahora estudiados, el principal órgano afectado es el hígado. El consumo continuo, aún en pequeñas cantidades puede resultar en tumores cancerígenos en el hígado. Aunque las aflatoxinas pueden considerarse entre los productos naturales más carcinogénicos conocidos para algunos animales, todavía no está claro si lo son también para el hombre. Algunos estudios epidemiológicos realizadas en diversas áreas geográficas donde existe una alta incidencia de cáncer de hígado (sudeste asiático y varios países africanos) han revelado que existe una correlación entre la ingestión dietaria de aflatoxinas y la frecuencia de dicha enfermedad. Si bien hay que tener en cuenta la posible incidencia de otros factores ambientales, como el virus de la hepatitis B, se considera a las aflatoxinas como un factor coadyuvante en la incidencia de cáncer hepático en la población humana de las regiones mencionadas (CAST, 1989; Kurata, 1990).

I.2.2.1. Factores que condicionan la producción de aflatoxinas en alimentos.

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

En el caso de las aflatoxinas actualmente es aceptado que los hongos productores pueden desarrollar en los granos tanto en el campo como luego de la cosecha. Inicialmente se consideró que la presencia de aflatoxinas en productos agrícolas era un problema del almacenamiento, dado que los requerimientos ecológicos de los hongos productores son tales que favorecen su adaptación a las condiciones ambientales post-cosecha. La detección de aflatoxinas en maní y maíz recién cosechado (Smith y Moss, 1985) demostró que, al menos para estos cultivos, la contaminación puede ocurrir en el campo. Este hecho está generalmente asociado a situaciones de estrés de las plantas, tales como condiciones de sequía, ataque por insectos y otras plagas (Fernández Pinto y Vaamonde, 1996). El control de los factores ambientales en el almacenamiento es más factible que en el campo. El medio ambiente en el cual *A. flavus* o *A. parasiticus* interactúan con el sustrato es crítico y determina si tendrá lugar la contaminación con aflatoxinas. Las investigaciones realizadas a nivel de laboratorio han señalado como principales factores que afectan la producción de aflatoxinas en el almacenamiento además de la cepa y el sustrato, al inóculo, la temperatura, y la a_w (actividad de agua o humedad relativa de equilibrio). Otro factor a considerar es el tiempo, ya que cuanto mayor sea la duración del almacenamiento mayor será la posibilidad de crear un medio ambiente con condiciones aptas para la proliferación de hongos toxicogénicos.

a) Especie fúngica: como ya se mencionó, las aflatoxinas son producidas por especies de hongos estrechamente relacionados entre sí, pertenecientes al género *Aspergillus*: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, y *A. nomius*. Estos mohos están ampliamente distribuidos en los suelos de todo el mundo y son contaminantes naturales de gran diversidad de productos vegetales. Los porcentajes de cepas toxicogénicas informados por diversos autores son

variables, pero indican que la mayoría de estos aislados son capaces de sintetizar uno o varios de estos metabolitos (Stoloff, 1977).

Fennel y col. (1973) observaron en poblaciones de *A. flavus* obtenidas de productos contaminados con toxinas que cuando se preparaban cultivos monospóricos, algunos carecían de la habilidad para producir toxina. En contraste las cepas de *A. parasiticus* excepcionalmente no fueron toxicogénicas. Una vez aislados en cultivos de laboratorio, las cepas de *A. flavus* pueden perder su capacidad de producir aflatoxinas, mientras que *A. parasiticus* es un productor más estable. Estas observaciones indican una profunda diferencia en los determinantes genéticos en la producción de toxina entre estas dos especies. Horn y col. (1996) encuentran diferencias incluso dentro del mismo grupo vegetativo de *A. flavus* o *A. parasiticus* en lo que respecta la cantidad y dimensiones de sus esclerocios, como así también, en la cantidad y tipo de aflatoxinas producidas.

Schmidt y col. (1983) demostraron la presencia de elementos extracromosomales incluyendo doble hélice de ARN, en una cepa no toxicogénica de *A. flavus*. Cuando se trató con cicloheximida o emetina, estas cepas se convirtieron en productoras de toxina. Por lo tanto, los elementos genéticos que inhiben la biosíntesis de aflatoxinas pueden estar presentes en la propia cepa de *A. flavus* y quizá no en un sustrato. Hace unos años se orientaron los esfuerzos hacia la transmisión de factores genéticos de inhibición a maíz, vía fusión de protoplastos, para lograr resistencia a la invasión fúngica y producción de toxinas. En la actualidad se sigue investigando desde la biología molecular los genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas por parte de *A. parasiticus* (Liang y col., 1996).

Desde el punto de vista taxonómico las tres especies productoras de aflatoxinas pertenecen a la sección *Flavi* del género *Aspergillus*. La diferenciación entre estas tres especies se basa en la morfología de los

conidios, de las esclerocias, y en la producción de micotoxinas. *A. flavus* (Fig. I.7.) y *A. parasiticus* se distinguen por su rápido crecimiento a 25°C, siendo sus conidios de color verde amarillento, generalmente más oscuros para *A. parasiticus*

b) Temperatura: numerosos autores estudiaron las condiciones de temperatura necesarias para el crecimiento y producción de toxinas por las especies reconocidas como productoras.

Sorenson y col. (1967) observaron el efecto de la temperatura en la producción de 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 de 28° a 32°C. A las temperaturas de 37° y 11°C sólo se detectaron bajas concentraciones de AFB1. A 28°C y temperaturas superiores se observa que la concentración de AFG1 decrece a medida que se incrementa el tiempo de incubación. La disminución en las concentraciones se atribuye en el trabajo a la posible degradación de las toxinas por enzimas fúngicas que se activan a temperaturas superiores.

Diener y Davis (1977) informaron un mínimo de temperatura para la producción en maní de 13°C después de 21 días, a una humedad relativa de 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.

Park y Bullerman (1981), estudiaron el efecto de temperaturas cíclicas (5°C durante 12 hs. y 25°C durante las restantes 12 hs.) comparado con temperaturas constantes de 15°C y 25°C sobre la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* NRRL 2999, en extracto de levadura-glucosa. Las temperaturas cíclicas resultaron ser más favorables que las constantes. Cuando se incubó a 25°C, se produjeron dos picos (a los 12 y 21 días)

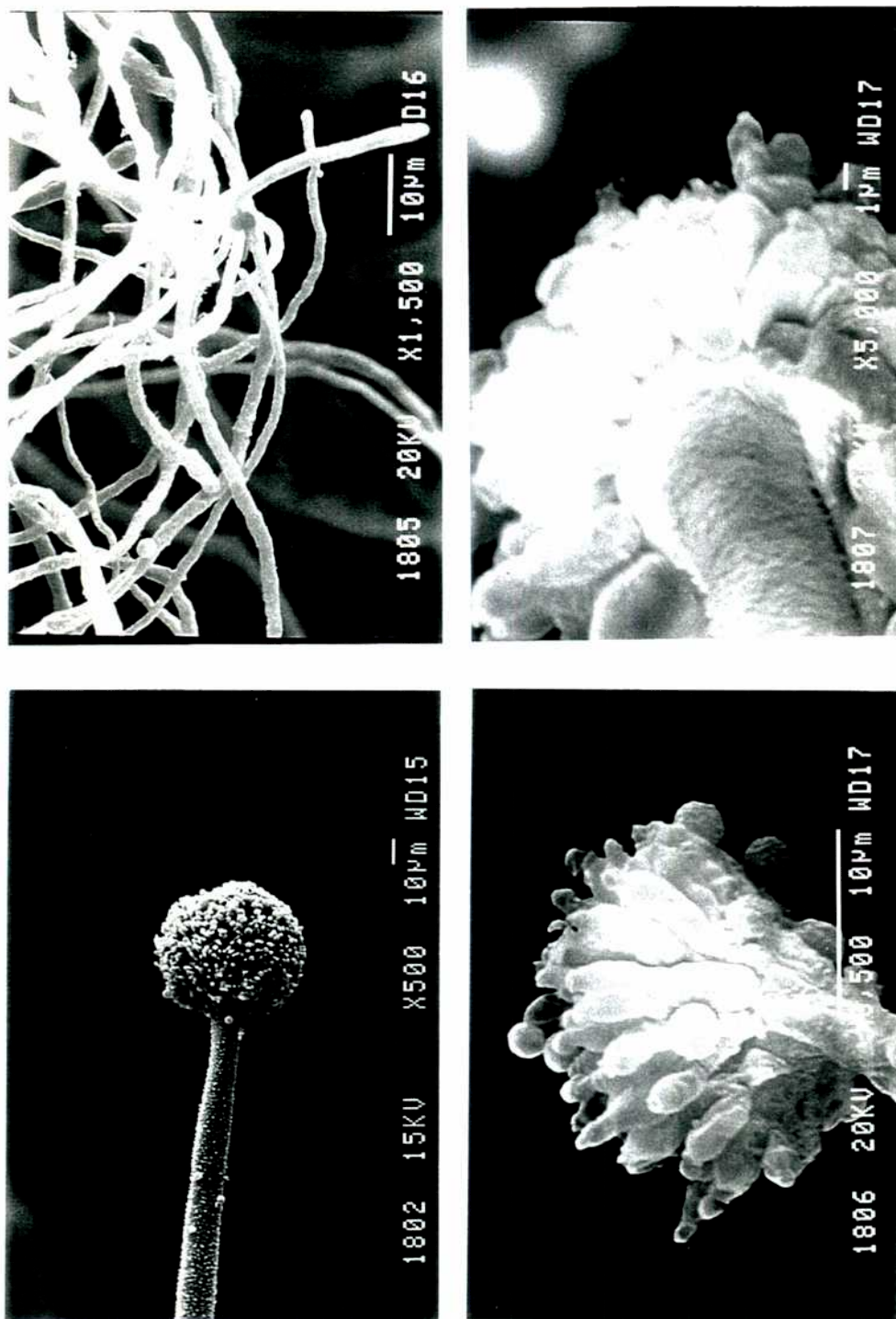


Figura I.7. Fotografías de cabezuelas de *A. flavus* obtenidas con Microscopía Electrónica de Barrido

seguido de una disminución en la concentración. Estas fluctuaciones pueden deberse a la degradación de aflatoxinas en distintas etapas del crecimiento. En todos los tratamientos se encontraron mayores concentraciones de AFG1 que de AFB1.

La temperatura de 25°C es la señalada por otros autores como la óptima para la producción de aflatoxinas en diferentes sustratos (Roy y Chourasia, 1989).

c) Actividad de agua: este parámetro se considera en la actualidad más adecuado que el contenido de humedad como índice de la disponibilidad de agua para el desarrollo de microorganismos y la producción de micotoxinas. Es difícil comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios, porque esos valores dependen de la cepa y del sustrato empleados, de las condiciones de cultivo (luz, O₂, pH, etc.) y también de los procedimientos analíticos.

Trenk y Hartman (1970) informaron que se requieren temperaturas de 24° y una humedad mayor de 17,5% para la producción de aflatoxinas en maíz.

Boller y Schroeder (1974) estudiaron la influencia de la humedad relativa 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 en distintos periodos de tiempo. En el arroz almacenado a todos los niveles de humedad relativa se detectaron aflatoxinas. 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.

Denizel y col. (1976), observaron que en pistacho no esterilizado una a_w 0.85 y 29°C fueron las condiciones mínimas a las cuales se desarrolló *A. flavus* y produjo toxina luego de 8 a 10 semanas de incubación.

Diener y Davis (1977) trabajando 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 alcanzó su valor máximo con una a_w entre 0.92 y 0.99, mientras que la a_w limitante estaría en el rango 0.82 a 0.84 según las condiciones de la semilla.

Niles y col. (1985) estudiaron la influencia de la actividad de agua del trigo y la cebada sobre la producción de aflatoxinas. A los 30 días de incubación, la óptima producción de aflatoxinas se observó a 25° 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.

d)Sustrato: la influencia del sustrato en relación a la contaminación con aflatoxinas ha sido señalada por diversos autores (Northolt y col. 1982; Beuchat y Lechowich, 1970; Trucksses y col., 1988). Casi todos los productos agrícolas pueden ser susceptibles de ataque fúngico en alguna etapa durante su producción, procesamiento, transporte y/o almacenamiento, si se presentan condiciones favorables.

Entre los factores propios del sustrato que pueden influir en la susceptibilidad a la contaminación se encuentran:

1-Las característica agronómicas: ubicación del fruto en la planta, mayor o menor contacto con el suelo, presencia de cubiertas protectoras, contenido de humedad al momento de la cosecha. Todos estos factores determinan que

algunos sustratos como por ejemplo la soja sean considerados de manejo más fácil que otros, como por ejemplo el maní, en relación a la posibilidad de contaminación tanto durante el cultivo como en la post-cosecha.

2-Las características de su composición relacionadas a la presencia de ciertos constituyentes químicos: por ejemplo la presencia de ácido fítico, complejante de cationes esenciales para la biosíntesis de aflatoxinas (como el Zn) ha sido señalada como otra de las causas posibles de la baja incidencia de contaminación en soja. En este mismo sustrato algunos autores también han demostrado que la relación C/N es particularmente importante para estimular ya sea el crecimiento del hongo como la producción de los metabolitos secundarios y han encontrado que la máxima producción de aflatoxinas depende de la presencia de ciertos carbohidratos (Abdollahi y Buchanan, 1981). También se han aislado, por ejemplo de maíz, proteínas de bajo peso molecular y algunos péptidos que pueden ejercer cierto control sobre el metabolismo fúngico (Nagarajan y Bhat, 1972). Ciertas aglutininas del germen de trigo, proteínas que se unen a azúcares, pueden inhibir el crecimiento de hongos incluido *A. flavus* (Lillehoj, 1983). Aparentemente, pueden existir en otros tipos de productos, tales como las especias, constituyentes inhibidores del crecimiento fúngico, componentes de las plantas que en muchos casos no han sido aún identificados (Mishra y Dubbey, 1994).

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 como trigo, avena, cebada, arroz y mijo presentarían menor riesgo de contaminación a menos que sean sometidos a manipulaciones inadecuadas, esta aseveración a veces se extiende como generalización a todos los granos de pequeño tamaño (Smith y Moss, 1985; CAST, 1989; FAO, 1982).

No existe mucha información bibliográfica acerca de la incidencia de aflatoxinas en trigo, triticale, o centeno probablemente porque las condiciones de manejo de cultivo y postcosecha de estos cereales no sean las adecuadas para el desarrollo y la producción de aflatoxinas. Muy pocos países en el mundo tienen regulaciones para el contenido de estas toxinas en estos cereales. Sólo Bosnia, Serbia, Macedonia, China y Francia fijan límites máximos permitidos para AFB1 en trigo; los mismos están comprendidos entre 1 y 10 ng/g de sustrato según el país (FAO, 1996).

1.3. Objetivos de la presente investigación

El triticale, al igual que otros cereales sintéticos derivados de cruzamiento de trigo con otras plantas, es un cultivo con promisorias características en cuanto a satisfacer las necesidades del hombre en materia de más y mejores alimentos.

Este cultivo parece combinar algunas de las mejores cualidades de sus antecesores. Junto con las aptitudes del trigo para la elaboración de diferentes tipos de alimentos, posee la capacidad que tiene el centeno para adaptarse a ambientes adversos, así como la resistencia a diversas plagas y enfermedades. Poco se sabe en relación a la contaminación de este cereal con micotoxinas. El objetivo principal del presente trabajo es evaluar el comportamiento del triticale como sustrato para la biosíntesis de aflatoxinas, en relación con los cultivos parentales.

Se analizarán los siguientes aspectos:

a) Puesta a punto de la metodología analítica para la detección de aflatoxinas en trigo, centeno y triticale.

- b) Obtención de las curvas de acumulación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ en función del tiempo para los tres sustratos en condiciones ambientales controladas.
- c) Análisis de parámetros cinéticos de acumulación de aflatoxinas en triticale, trigo y centeno. Comparación con otros granos.

II. Materiales y Métodos

II.1. *Sustratos*

Se dispuso de granos de trigo, tricale y centeno. Todas las muestras provinieron del oeste de la Provincia de Buenos Aires y fueron suministradas por el Ing. Agr. Juan Ramón López de la Estacion Experimental Agropecuaria del INTA Bordenave. La muestra de trigo correspondió a la variedad de trigo candeal Bonaerense Valverde, la de centeno fue Don Lisandro INTA y el híbrido de tricale suministrado fue Yagán INTA.

II.2. *Acondicionamiento de los granos*

Este proceso comprendió varias etapas que se describen a continuación:

II.2.a. *Desinfección*

La finalidad de la desinfección fue la eliminación de la micota natural contaminante. El material de los tres granos fue repartido en cuatro bolsas de polietileno conteniendo 1 kg de semillas cada una. Se agregó, además, una segunda bolsa para mayor seguridad en el mantenimiento de la esterilidad. Tratando de evitar tratamientos como el autoclavado que pudieran alterar la viabilidad de las semillas, las mismas fueron sometidas a radiación ionizante con una dosis de 6 KGrey. La irradiación de los granos se llevó a cabo en la Planta que la firma IONICS S.A. posee en la localidad de El Talar de Pacheco, Provincia de Buenos Aires; la fuente de Co^{60} presentaba las siguientes características: actividad = 230.000 Curies, velocidad de dosis = 180 seg/paso y la dosis media = 2,3 krad/min. Ensayos

previos habían demostrado que este tratamiento disminuye considerablemente la contaminación fúngica de los granos de trigo sin afectar la viabilidad de los mismos expresado a través del porcentaje de germinación (Comerio, R., comunicación personal; Cuero y col., 1986).

II.2.b. Humedecimiento

La finalidad del humedecimiento de las semillas fue llevarlas a una actividad de agua (a_w) controlada y compatible con una adecuada producción de aflatoxinas. La humedad inicial de los granos fue determinada en estufa de vacío a 100°C por un período de 24 hs. (Pollio y col., 1987). El material de partida presentaba una humedad promedio de: 7.61% para trigo; 8.49% para triticale y 8.84% para centeno. La etapa de humedecimiento se llevó a cabo en un equipo de flujo laminar estéril, en ambiente previamente desinfectado. El procedimiento con el trigo consistió en abrir las bolsas y agregarles agua estéril en la cantidad previamente calculada de acuerdo a los datos de isotermas de sorción de vapor existentes (Larumbe y col., 1994); en el caso de triticale y centeno como no se dispuso de isotermas de sorción se fueron agregando pequeños volúmenes de agua cada vez. El material se mezcló bien, las bolsas se cerraron y se colocaron en recipientes herméticos. Estos recipientes se guardaron en heladera durante una semana para medir posteriormente la actividad de agua (a_w) del material.

II.2.c. Determinación de la actividad de agua

Los valores de a_w se determinaron a 25°C utilizando un higrómetro eléctrico Vaisala Humicap HMI 31 (manufacturado por Vaisala Oy PL 26 SF00421, Helsinki, Finland) con sensor HMP 35. 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)
NaCl	0.752
Kcl	0.843
BaCl	0.902
KNO ₃	0.925
K ₂ SO ₄	0.974

Las mediciones se efectuaron en estufa a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Longhi Hnos. DBO 120). Se consideró que el material estaba equilibrado cuando las mediciones de a_w realizadas en tres días consecutivos no difirieron en más de 0.005 unidades. Los materiales fueron acondicionados a una a_w final de: 0.922 para el trigo, 0.923 para el triticale, y 0.926 para el centeno.

II.3. 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 durante 7 días a 30°C.

A fin de obtener la suspensión de esporas necesaria para inocular cada uno de los sustratos, se partió de tres tubos con el cultivo de la cepa en estudio, a cada uno de los cuales se agregaron 5 ml de solución de glicerol:agua con

una actividad acuosa controlada de 0.922, previamente esterilizada. Esta solución fue preparada según el método de Gonzalez et al (1984).

Con el fin de obtener un inóculo de partida de concentración uniforme de 10^7 esporas por mililitro, luego de agitar cada tubo durante un minuto en Vortex se recogió la suspensión de esporas en 85 ml de la misma solución estéril de glicerol:agua (a_w 0.922). La concentración de esporas se determinó haciendo recuento en cámara cuentaglóbulos de Thoma.

II.4. Inoculación

Los sustratos equilibrados se distribuyeron en cajas de Petri estériles en porciones de 25 g cada una. Luego cada caja fue sembrada con 1 ml de la suspensión de esporas, obtenida según la técnica descrita en II.3., con una pipeta automática provista de tip estéril. Cada caja así sembrada fue tapada y cuidadosamente agitada durante 30 segundos para favorecer la dispersión del inóculo. Toda esta operación se llevó a cabo en una cámara de siembra cerrada y desinfectada, en condiciones de esterilidad.

II.5. Incubación

Las cajas obtenidas según II.4 se dispusieron en bandejas metálicas. A fin de mantener constante la humedad relativa de la atmósfera que rodeaba los granos, en estas bandejas se colocó además recipientes conteniendo una solución saturada de KNO_3 que a $25^\circ C$ presenta una a_w de 0.925 (Chirife y col., 1983). Las bandejas se introdujeron en bolsas de polietileno de 40 micrones de espesor, y se incubaron en estufa a $25 \pm 0.5^\circ C$ (Longhi Hnos., DBO 120). Para el análisis de aflatoxinas se retiraron tres cajas de cada sustrato cada 7 días a lo largo de un período de 10 semanas.

II.6. Análisis de aflatoxinas

Al no disponer de un método oficial para la determinación de aflatoxinas en granos de trigo, se ensayó la técnica utilizada en el IASCAV (Gómez, M. comunicación personal) consistente en una modificación del Método BF propuesto por la AOAC para maní (AOAC, 1990-a). El método (denominado en este trabajo como Método 1) consiste en extraer 30 g de muestra con 150 ml de metanol:agua (90:10) durante 2 minutos en licuadora de alta velocidad. La mezcla se filtra a través de papel de filtro y se recoge en un erlenmeyer. Una alícuota de 50 ml se extrae en ampolla de decantación con 25 ml de hexano, agitando durante un minuto. La fase metanólica (capa inferior) se trasvasa a otra ampolla de decantación en la cual se agregan 20 ml de agua destilada y 50 ml de cloroformo. La mezcla se agita durante un minuto, y la fase clorofórmica (capa inferior) se recoge en un balón, filtrándola a través de sulfato de sodio anhidro. El procedimiento de extracción se repite una segunda vez con 30 ml de cloroformo reuniéndose los extractos en el mismo balón. El extracto se evapora en evaporador rotatorio (Büchi 011, Suiza) hasta sequedad. Las muestras se redisuelven en un volumen adecuado de benceno-acetonitrilo (98:2) en el momento de su cuantificación por cromatografía planar en capa delgada. Se utilizan placas de vidrio de sílica gel G60 de 0.25 mm de espesor (Merck N° 5721). A 2 cm del borde de la placa se siembran con jeringa Hamilton de 0.2 µl y 10 µl, distintas cantidades de solución patrón de AFB₁ de concentración 1,5 µg/ml y distintas cantidades de la muestra diluida en benceno-acetonitrilo a una distancia de 1 cm entre sí. Como solvente de desarrollo se emplea cloroformo:acetona, 9:1.

Se trabaja a temperatura ambiente en cuba sin saturar. La placa se desarrolla hasta que el frente de solvente llega a 10 cm de la línea de

siembra (aproximadamente 20 minutos). Las placas se examinan en un cuarto oscuro a una distancia aproximada de 30 cm de una lámpara ultravioleta (Desaga U.V. 131.000) a 366 nm. La concentración de AFB₁ en la muestra se determina por el método de comparación visual, y se calcula, expresándola en µg/kg, mediante la ecuación:

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

V_p: µl de solución patrón de aflatoxina que iguala el extracto de la muestra

C_p: concentración de la solución patrón de aflatoxina en µg/ml

M_d: Volúmen en µl de la solución final de la muestra

V_m: µl de muestra cuya fluorescencia coincide con la de V_p

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

El método descrito (Método 1) fue ensayado en muestras de los tres sustratos (trigo, triticale y centeno) fortificados con aflatoxina B₁ al nivel de 200 µg/kg. Estas muestras se prepararon agregando a 30 g de sustrato 4 ml de una solución patrón de AFB₁ cuya concentración era de 1,5 µg/ml. (Esta solución se preparó a partir de ampollas de solución patrón de AFB₁ de concentración 10 µg/ml enviada por H. P. van Egmond del Laboratorio de Análisis de Residuos, Instituto Nacional de Salud Pública y Protección del Medio Ambiente, Bilthoven, Holanda). Los ensayos, realizados por triplicado, mostraron baja recuperación del método, especialmente en el caso del centeno, probablemente debido a la formación de emulsiones durante la extracción. Por esta razón se decidió probar una nueva

modificación sugerida por Trucksess, M. (comunicación personal, II Simposio Latinoamericano de Micotoxicología, Maracay, Venezuela, julio de 1997) denominado en el presente trabajo como Método 2. La modificación consiste en reemplazar el agua por una solución de KCl (aq) al 4%, tanto en el solvente de extracción (que resulta ser metanol-KCl [aq]4%, 90:10) como en la etapa de extracción con cloroformo (agregando a la ampolla que contiene la fase metanólica, 20 ml de KCl [aq] 4% y 50 ml de cloroformo). Esta modificación se ensayó por triplicado en muestras de los tres cereales fortificados con AFB₁ al nivel de 200 µg/kg, comprobándose que facilitaba la extracción y la limpieza de los extractos al evitar la formación de emulsiones.

El Método 2 fue ensayado también a los niveles de 100 µg/kg y 50 µg/kg en muestras fortificadas con AFB₁ preparada agregando las correspondientes cantidades de solución patrón de AFB₁, en la forma indicada anteriormente. En el caso de trigo se trabajó por quintuplicado y en el caso del triticale y centeno por triplicado.

La evaluación de los datos se realizó por el Método de Cuadrados Mínimos y Análisis Estadístico de la Regresión (Statistix, Versión 4.1, Analytical Software). La relación lineal entre la concentración de aflatoxina hallada por el método y la realmente presente en las muestras se analiza por medio del coeficiente de Pearson. A partir de la pendiente de la recta de regresión se evaluó la recuperación y sus límites de confianza. El límite de detección se obtuvo de la recta de regresión lineal considerando la ordenada al origen más tres desvíos estandar (FAO, 1991).

La repetitividad a cada nivel de concentración se evaluó por medio del coeficiente de variación (CV) o desviación estandar relativa (RSDr).

III.Resultados y Discusión

III.1. Características de ejecución del método de análisis de aflatoxinas en trigo, centeno y triticale

En la Tabla III.1 se pueden observar los porcentajes de recuperación de los dos métodos evaluados en los ensayos preliminares. En todos los casos la recuperación es mayor en el Método 2 y, en particular para el centeno, es baja en el Método 1. Esto podría atribuirse a la eliminación de la formación de emulsiones en el Método 2 por el agregado de la sal en la fase acuosa de la mezcla de solventes.

Tabla III.1. Recuperación de los métodos de análisis de aflatoxinas en los tres sustratos al nivel de 200 ppb

Sustrato	Método 1		Método 2	
Trigo	72,5	$\bar{x} = 77,5$	75	$\bar{x} = 91,66$
	70		100	
	90		100	
Triticale	75	$\bar{x} = 78,3$	100	$\bar{x} = 91,66$
	75		75	
	85		100	
Centeno	75	$\bar{x} = 67,5$	100	$\bar{x} = 91,66$
	67,5		75	
	60		100	

La Tabla III.2 muestra los resultados del ensayo de recuperación realizado para el Método 2 a los tres niveles de fortificación en los tres cereales. En todos los casos la recuperación es adecuada, de acuerdo a los atributos de desempeño analítico requeridos para los métodos de análisis (FAO, 1991; AOAC, 1993). Los criterios numéricos son variables según el nivel de contaminación y, a su vez, ligeramente diferentes para iguales niveles de concentración, dependiendo de las diferentes organizaciones. Por ejemplo el Informe de la FAO indica que en la práctica de análisis de micotoxinas son corrientes las recuperaciones de 70-80 %, mientras que los niveles de recuperación exigidos por la AOAC Internacional son 80-110 % para 100 ppb ó 60-115 % para 10 ppb.

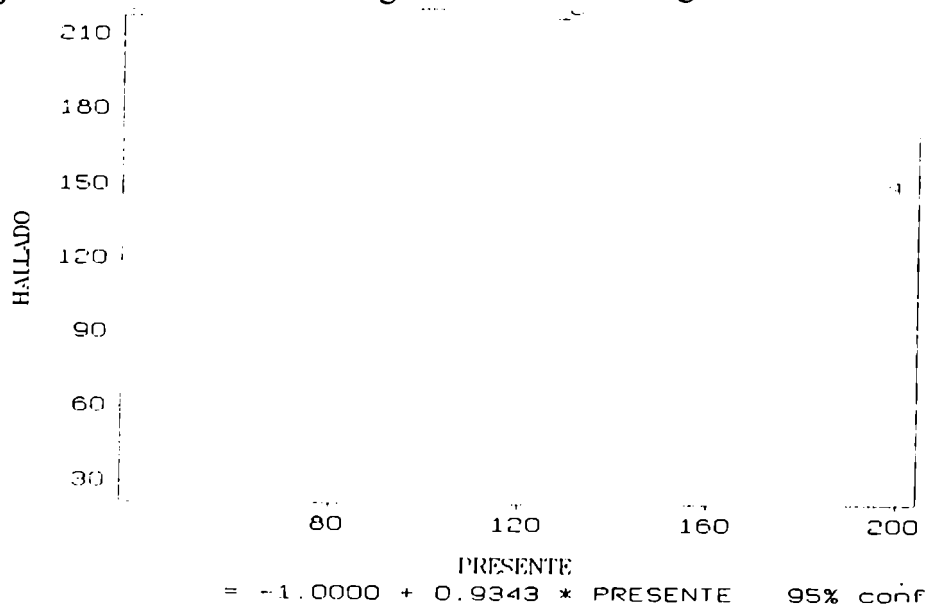
Tabla III.2. Recuperación del Método 2 para el análisis de aflatoxinas en trigo, triticale y centeno

Sustrato	Niveles de Fortificación					
	50 ppb		100 ppb		200 ppb	
Trigo	80		90		75	
	80		100		100	
	80	$\bar{x}=92$	80	$\bar{x}=92$	100	$\bar{x}=93$
	100		100		90	
	120		90		100	
Triticale	100		80		100	
	100	$\bar{x}=93.3$	80	$\bar{x}=86.6$	75	$\bar{x}=91.6$
	80		100		100	
Centeno	100		80		100	
	100	$\bar{x}=93.3$	80	$\bar{x}=86.6$	75	$\bar{x}=91.6$
	80		100		100	

La Tabla III.3 presenta los datos obtenidos para el Método 2 en los ensayos realizados por quintuplicado en el caso del trigo con muestras fortificadas a los tres niveles. En la figura III.1. se presenta el gráfico de regresión lineal de cuya pendiente se obtiene una recuperación total del método de 93 % y un límite de detección estadístico de 24 ppb

Tabla II.3. Desempeño analítico del Método 2 para trigo

Fortificado (ppb)	Hallado (ppb)	Promedio	Desv. St.	RSDr
50	40			
50	40			
50	60	46	8,9442	19,44%
50	50			
50	40			
100	90			
100	100			
100	80	92	8,3666	9,09%
100	100			
100	90			
200	150			
200	200			
200	200	186	21,9089	11,78%
200	180			
200	200			

Figura III.1. Análisis de Regresión Lineal en trigo

Ordenada:	-1,000 ppb ± 7,62
Pendiente:	0.9343 ± 0.05766
Coefficiente de Correlación (Pearson):	0.9761
Recuperación promedio:	93 %
Límite de detección:	24 ppb

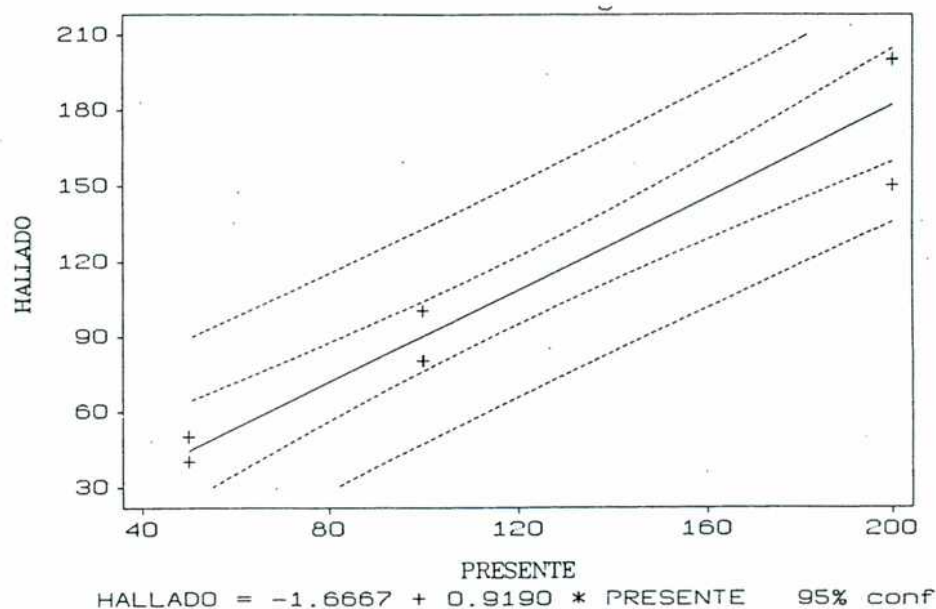
La precisión del método se evaluó a través de la desviación standard relativa RSDr (repetitividad), que varía entre 9.09 % y 19.44 % para los diferentes niveles de contaminación, valores que están dentro de los aceptados por la AOAC (1993): 15 % para 100 ppb y 21 % para 10 ppb.

Las Tablas III.4. y III.5. y los correspondientes gráficos (Figuras III.2. y III.3.) muestran los resultados obtenidos para triticale y centeno. Los valores obtenidos son iguales para ambos sustratos, y si bien en estos casos se trabajó por triplicado dichos valores también resultaron muy similares a los encontrados para el trigo. La recuperación (obtenida de la pendiente del gráfico) fue de 91 %, el límite de detección estadístico resultó ser 35 ppb y los valores de RSDr variaron entre 12.37 % y 15.74 % para los diferentes niveles de contaminación.

Estos resultados indican que el método en estudio resulta adecuado para el análisis de aflatoxinas en trigo, centeno y triticale a los fines del presente trabajo.

Tabla III.4. Desempeño analítico del Método 2 para triticale

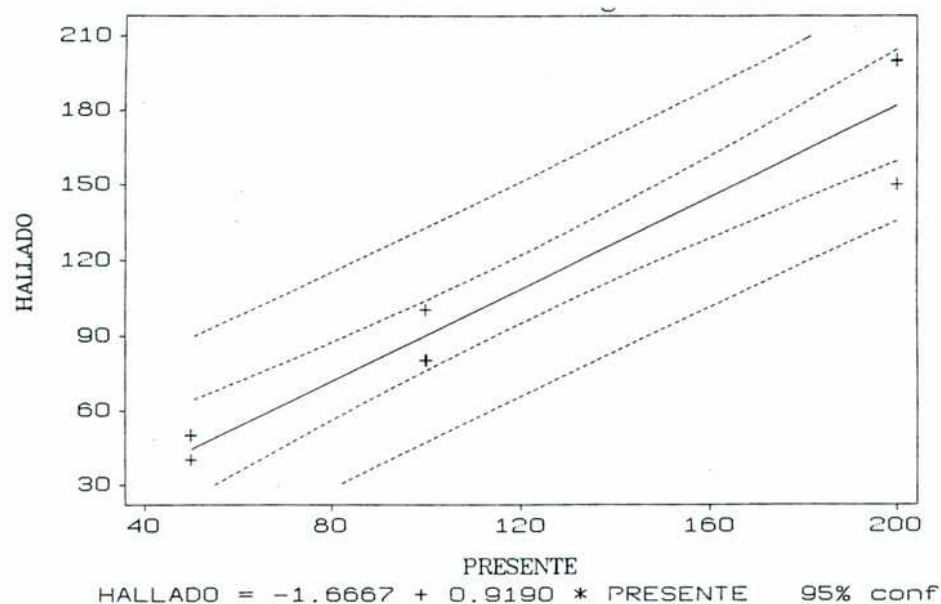
Fortificado (ppb)	Hallado (ppb)	Promedio	Desv. St.	RSDr
50	50			
50	50	46,66	5,7735	12,37%
50	40			
100	80			
100	80	86,66	11,47	13,23%
100	100			
200	200			
200	150	183,33	28,8675	15,74%
200	200			

Figura III.2. Análisis de Regresión Lineal en triticale

Ordenada:	-1.6667
Pendiente:	0.91905
Coefficiente de Correlación (Pearson):	0.9669
Recuperación Promedio:	92 %
Límite de detección:	35 ppb

Tabla III.5. Desempeño analítico del Método 2 para centeno

Fortificado (ppb)	Hallado (ppb)	Promedio	Desv. St.	RSDr
50	50			
50	50	46,66	5,7735	12,37%
50	40			
100	80			
100	80	86,66	11,47	13,23%
100	100			
200	200			
200	150	183,33	28,8675	15,74%
200	200			

Figura III.3. Análisis de Regresión Lineal en centeno

Ordenada:	-1.6667
Pendiente:	0.91905
Coefficiente de Correlación (Pearson):	0.9669
Recuperación Promedio:	92 %
Límite de Detección:	35 ppb

III.2. Curvas de acumulación de aflatoxinas en trigo, triticale y centeno

Las curvas de acumulación de AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂ se obtuvieron analizando la acumulación de estas cuatro aflatoxinas en función del tiempo en los granos inoculados con *A. parasiticus* NRRL 2999 e incubadas en condiciones ambientales controladas. Las determinaciones se hicieron por triplicado, cada 7 días, a lo largo de un período de 10 semanas. Para eliminar la flora contaminante de los granos, éstos fueron tratados con radiación gamma. Se trató de evitar la aplicación de tratamientos (como por ejemplo esterilización en autoclave) que afectan notoriamente a las semillas, ya que la idea es mantenerlas en un estado lo más parecido posible al natural, para permitir la manifestación de cualquier mecanismo de defensa del sustrato viable frente a la colonización por parte del hongo. Cuero y col. (1986) propusieron el tratamiento con radiaciones gamma luego de compararlo con otros (por ejemplo desinfecciones con hipoclorito de sodio), como el medio más eficaz para reducir la contaminación fúngica preservando la viabilidad de la semilla. Ensayos anteriores realizados en nuestro laboratorio permitieron comprobar que en el caso del trigo una dosis

de 6 kgy no afectaba la capacidad de germinación de los granos a la vez que reducía la contaminación inicialmente presente, a niveles aceptables a los fines del presente trabajo. Este tratamiento de desinfección se aplicó a los tres sustratos antes de su acondicionamiento e inoculación, y no se observaron problemas de contaminación con otros hongos durante el período de incubación. Cabe señalar que a ello también contribuyó el inóculo con un número relativamente elevado (aproximadamente 10^5 esporas/g de sustrato) del hongo productor de aflatoxinas (*A. Parasiticus* NRRL 2999).

Otro detalle experimental que requirió ser minuciosamente controlado fue el ajuste de la actividad de agua (a_w) de los sustratos a un mismo nivel. Esto se llevó a cabo agregando gradualmente las cantidades de agua estéril necesarias, permitiendo la equilibración y controlando con repetidas mediciones que el valor alcanzado en el equilibrio fuera el mismo para los tres granos. Este valor fue de 0.925 a la temperatura de 25°C, condiciones que según datos de literatura (Niles y col., 1985) son adecuados para una buena producción de aflatoxinas en cereales, incluyendo trigo (valores de a_w mayores resultaron excesivos para estos granos y dificultaron la manipulación del material). Por otra parte, a este nivel de a_w existen datos referidos a otros cereales y oleaginosas en trabajos realizados previamente (Montani, M., 1991) en idénticas condiciones experimentales, lo cual permitió realizar análisis comparativos del comportamiento de los diferentes sustratos.

La Figura III.4. muestra las curvas obtenidas para cada una de las aflatoxinas (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2) en trigo. Como es habitual cuando se obtiene este tipo de curvas, se observa un período de latencia durante el cual no se detecta la toxina y luego un aumento de la concentración hasta alcanzar valores máximos después del cual las cantidades detectadas disminuyen con el tiempo de incubación. Se ha sugerido que estas fluctuaciones pueden ser debidas a la degradación de la toxina por parte del micelio activo del hongo productor en determinadas fases del crecimiento (Park y Bullerman, 1981; Schindler y col., 1967; Yousef y Marth, 1984). Algunos de los factores que pueden contribuir a la degradación de la toxina presentes en cultivos de *A. flavus* o *A. parasiticus* son: la edad del micelio, el estado de fragmentación del mismo, el sustrato, la cepa (cuanto más productora de toxina presenta mayor capacidad de deagradaación), la temperatura y el pH, entre otros.

Es evidente que durante el crecimiento fúngico y la producción de aflatoxinas tienen lugar 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 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 a mayor velocidad por el mismo hongo que la produce y se presenta una fase de degradación. Esto se observa en la figura III.4. para la AFG₁ y AFB₁ que son las que se acumulan en mayor proporción. Las AFG₂ y AFB₂ se detectan en muy bajas cantidades (< 50 ppb) durante todo el período.

En la figura III.5 se presentan las curvas de acumulación de las cuatro aflatoxinas en centeno. Nuevamente las concentraciones de aflatoxinas G₂ y B₂ son detectables en menor medida (< 450 ppb) que AFG₁ y AFB₁ en todo el período. Las cantidades detectadas de AFG₁ y AFB₁ en este sustrato son mucho mayores que las encontradas en el trigo. La curva de AFG₁ presenta dos picos de acumulación (efecto también encontrado en algunos de los trabajos anteriormente mencionados). En el día 35 se detectan las mayores concentraciones de estas dos toxinas, que son las que se producen mayoritariamente durante todo el período analizado.

El triticale (Figura III.6.) presenta un comportamiento similar al del centeno en lo que respecta a la forma de las curvas, que en el caso de G₁, B₁, y G₂ presentan dos picos de acumulación (a los 14 días y a los 28 días) pero las cantidades detectadas se asemejan más a las de trigo que a las del centeno, siendo menores que las encontradas en este último.

Figura III.4. Curvas de acumulación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en trigo

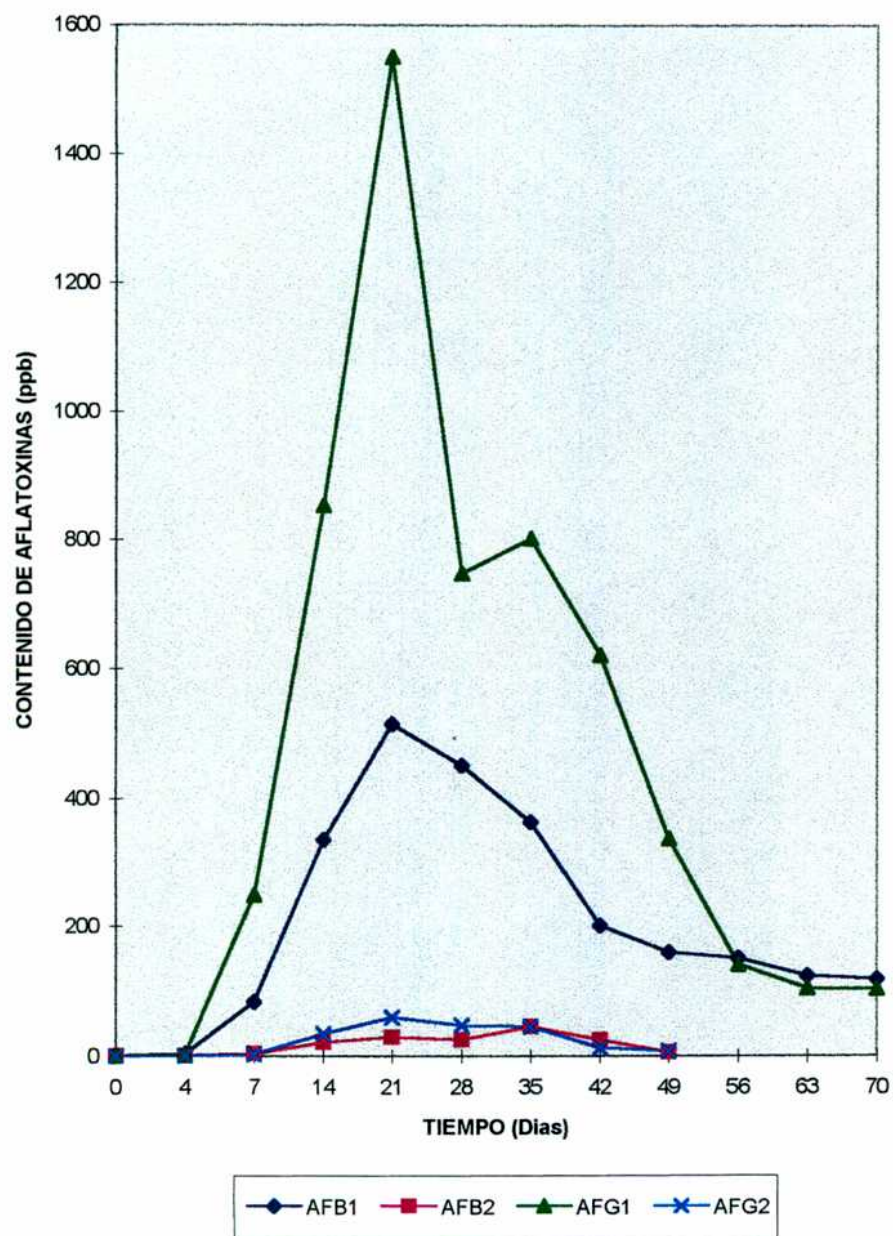


Figura III.5. Curvas de acumulación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en centeno

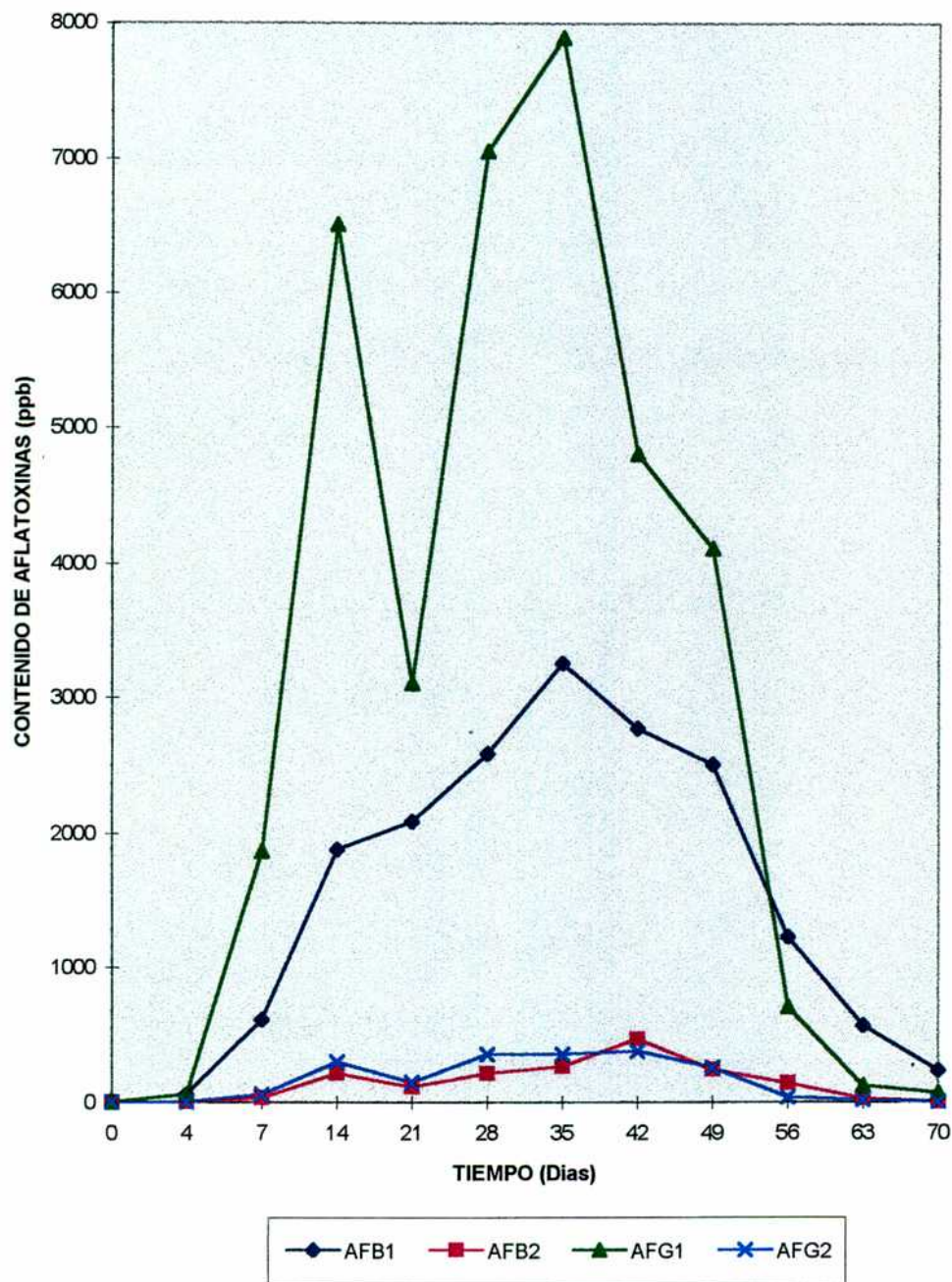
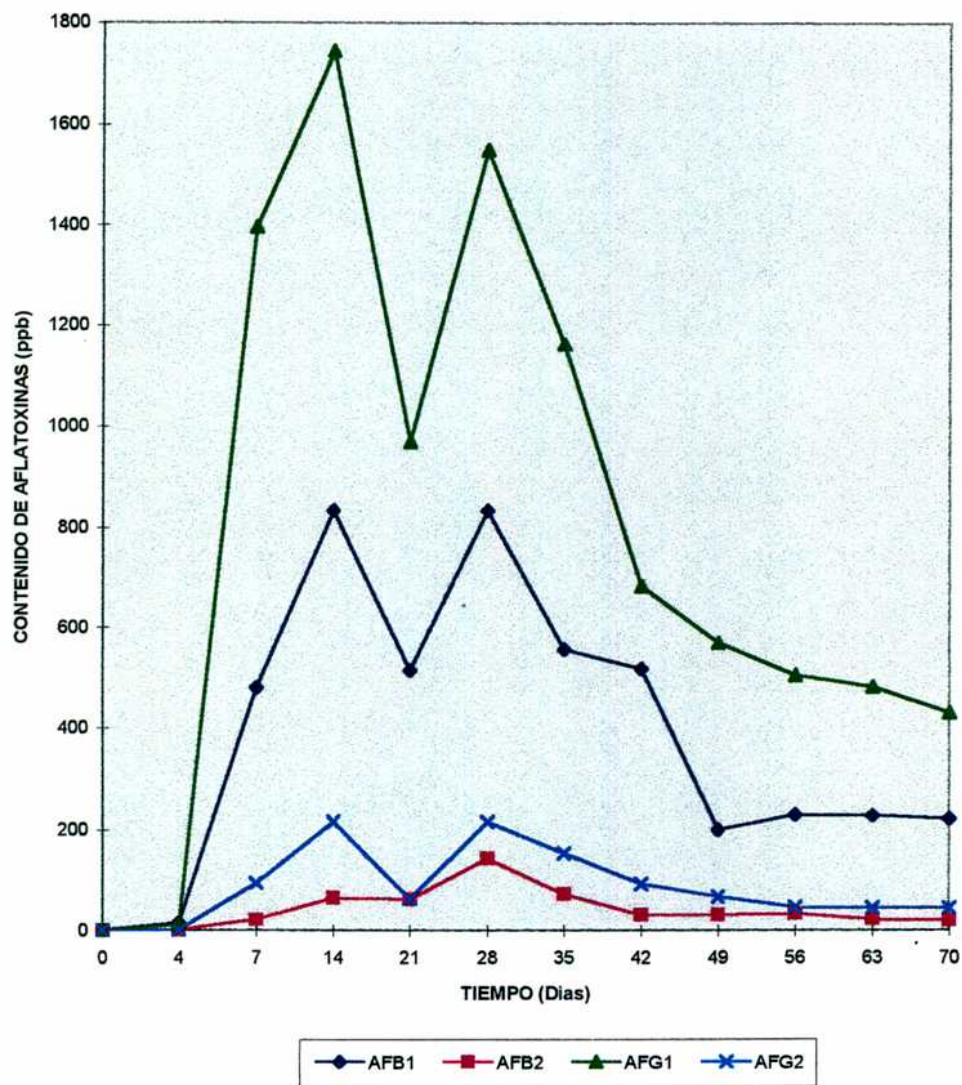


Figura III.6. Curvas de acumulación de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en triticale



De las curvas de acumulación se pueden obtener los parámetros que a continuación se definen:

- **Pi**: Período en el que se inicia la acumulación de cantidades detectables de aflatoxina. 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 que se detectó la toxina.
- **Tm** : Tiempo en el que se alcanza el valor máximo absoluto en el período de incubación.
- **Am**: Máximo valor de la concentración de aflatoxinas alcanzado en el período de incubación estudiado.

y se ejemplifican en la Figura III.7. con la acumulación de AFG₁ en trigo.

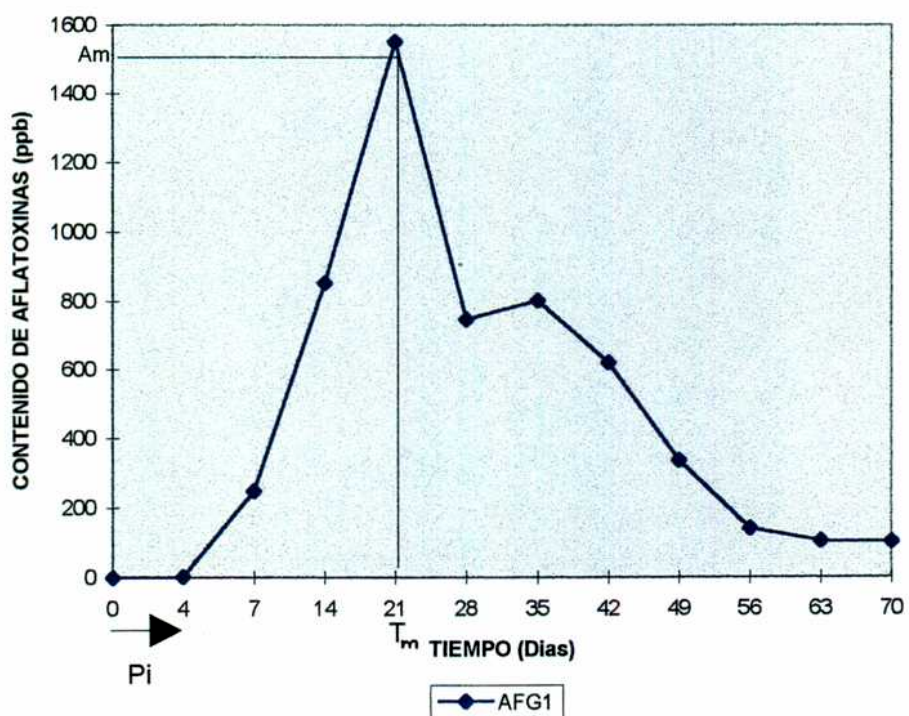


Figura III.7. Parámetros cinéticos en AFG₁ en trigo

Estos parámetros, al considerar tanto las cantidades producidas como los tiempos, dan idea de la velocidad de acumulación de las diferentes toxinas, por lo cual son útiles para analizar la cinética de acumulación en los diferentes sustratos. Las Tablas III.6., III.7., III.8., y III.9. presentan los parámetros cinéticos para las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂ en trigo, triticale y centeno.

Tabla III.6. Parámetros cinéticos de AFB₁ en trigo, triticale y centeno

Sustrato	P _i	T _m	A _m
Trigo	(0-4]	21	513
Triticale	(0-4]	14	833
Centeno	(0-4]	35	3250

Tabla III.7. Parámetros cinéticos de AFB₂ en trigo, triticale, y centeno

Sustrato	P _i	T _m	A _m
Trigo	(4-7]	35	44
Triticale	(4-7]	28	143
Centeno	(4-7]	42	462

Tabla III.8. Parámetros cinéticos de AFG₁ en trigo, triticale y centeno

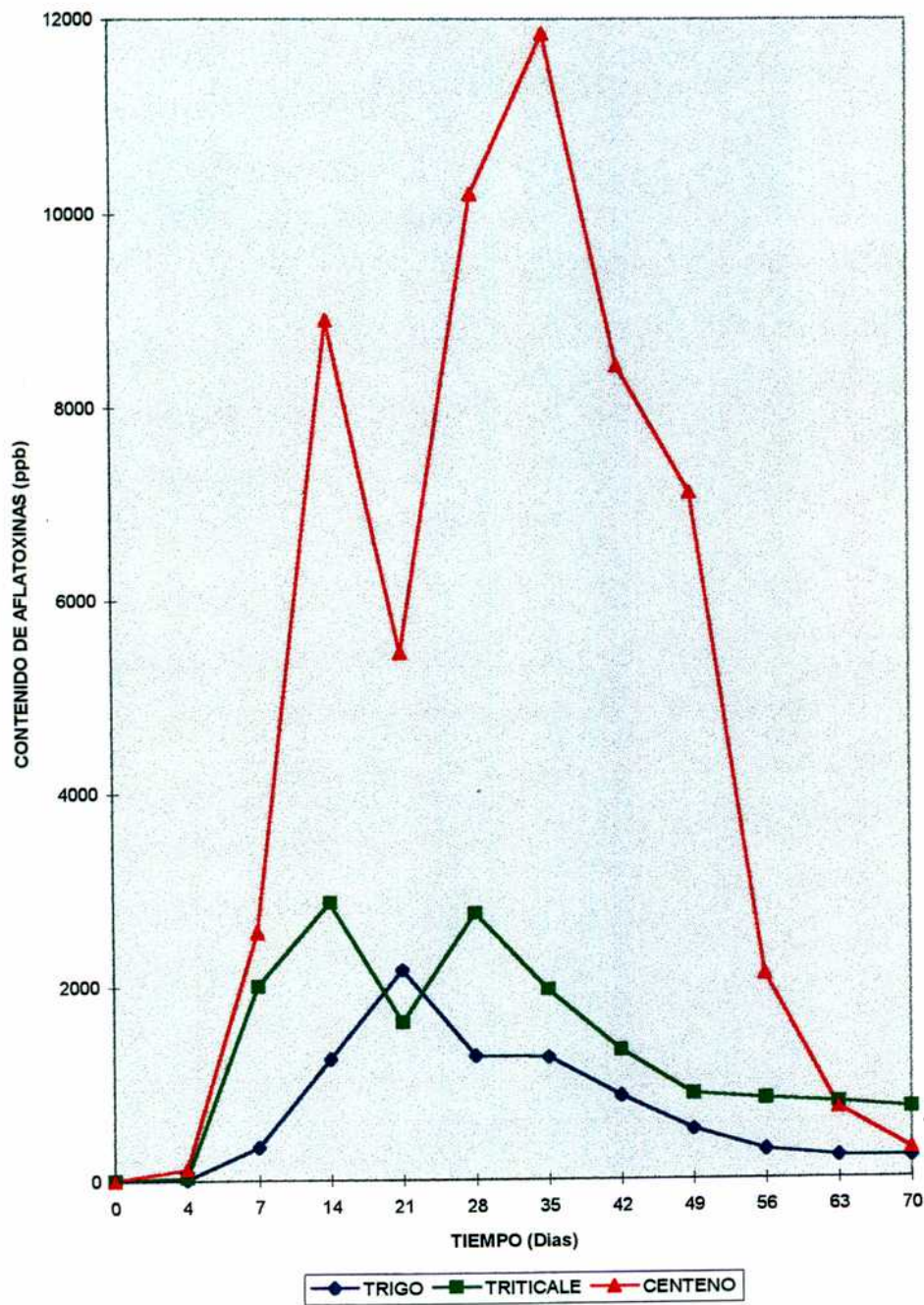
Sustrato	P _i	T _m	A _m
Trigo	(0-4]	21	1550
Triticale	(0-4]	14	1744
Centeno	(0-4]	35	7982

Tabla III.9. Parámetros cinéticos de AFG₂ en trigo, triticale y centeno

Sustrato	P _i	T _m	A _m
Trigo	(4-7]	21	58
Triticale	(4-7]	14	215
Centeno	(4-7]	42	372

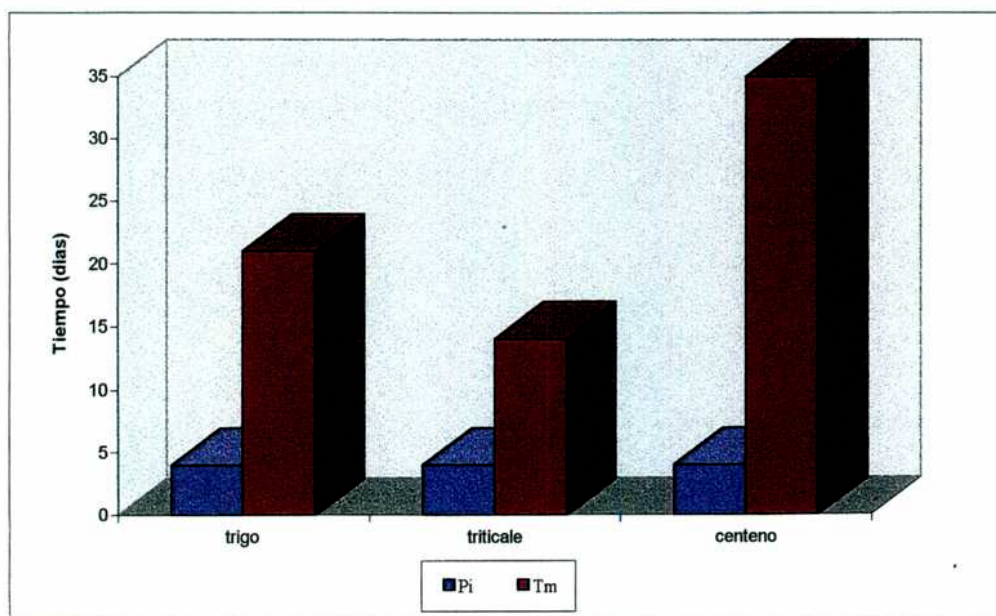
Se puede observar que las aflatoxinas B₂ y G₂ se encuentran retrasadas respecto de B₁ y G₁ tanto en su aparición como en el tiempo que tardan en llegar al valor de acumulación máxima. Este efecto ha sido observado también en otros sustratos (Montani, M., 1991; Bresler, G., 1994). En el triticale los picos se alcanzan más precozmente en todos los casos, en tanto que en el centeno los T_m son más dilatados. Las acumulaciones máximas son mayores en centeno. De los datos presentados en las tablas III.6. a III.9. se puede calcular que la relación de A_m (centeno)/ A_m (trigo) es aproximadamente 6 para AFB₁ y AFG₂, 5 para AFG₁ y 10 para AFB₂. Las cantidades detectadas en el triticale son intermedias pero en la mayoría de los casos más próximas a las de trigo. Estas relaciones se cumplen siguiendo el mismo patrón para todas las toxinas; se podría decir que hay un comportamiento característico de cada sustrato. Es así que las mismas observaciones pueden realizarse cuando se grafican las curvas de acumulación de aflatoxinas totales obtenidas en cada punto de la curva como la suma de las concentraciones de AFB₁, AFB₂, AFG₁, y AFG₂ (Figura III.8.). La forma de la curva para triticale es similar a la de centeno, pero las cantidades de aflatoxinas acumuladas son muy similares a las halladas en trigo. Las concentraciones de aflatoxinas detectadas en el centeno son mayores que las encontradas en trigo y triticale durante casi

Figura III.8. Curvas de acumulación de aflatoxinas totales en trigo, triticale y centeno

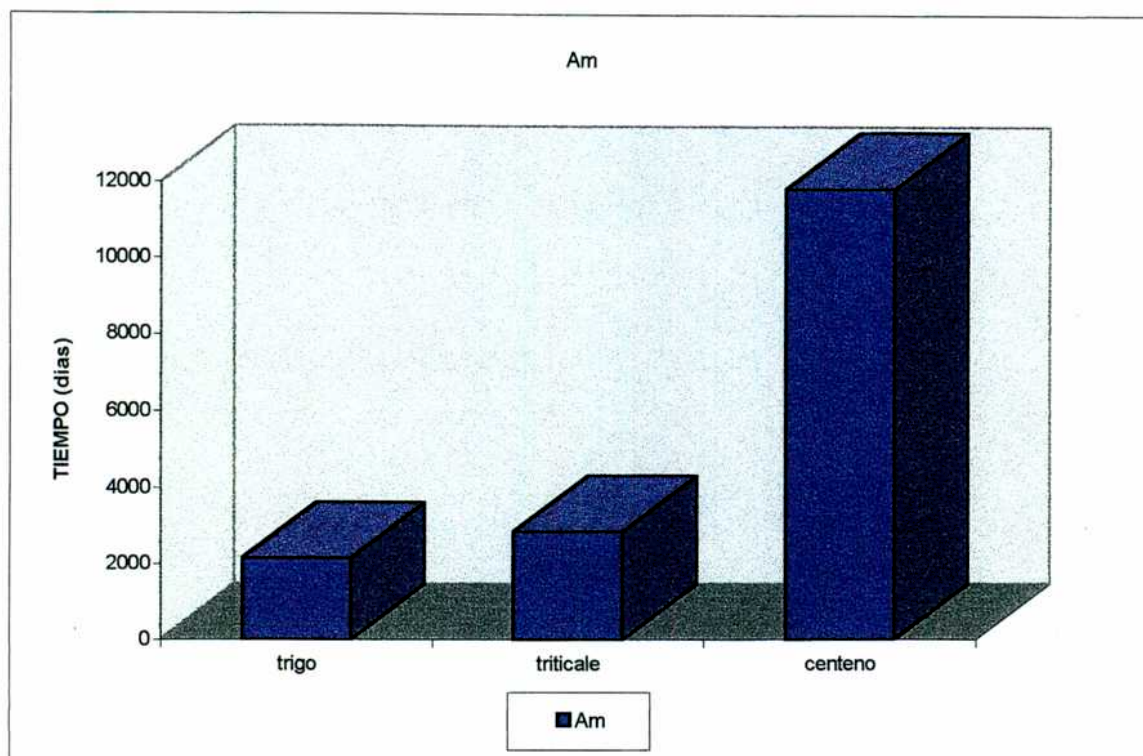


todo el período estudiado (a excepción de los dos últimos puntos de la curva en los cuales la degradación de la toxina a la que se hizo referencia anteriormente determina que las cantidades finales detectadas sean muy bajas en los tres sustratos). Los parámetros cinéticos referidos a las aflatoxinas totales para los tres sustratos (Figura III.9.) reflejan también esta tendencia.

Figura III.9. P_i y T_m de aflatoxinas totales en los tres sustratos



Am de aflatoxinas totales en los tres sustratos



En la Tabla III.10. se comparan los parámetros cinéticos de los cereales estudiados en el presente trabajo con los de maíz, sorgo, y girasol obtenidos por Montani (1991) en experiencias similares realizadas con la misma cepa productora de aflatoxinas y en las mismas condiciones experimentales ($a_w=0.925$ y $T=25^\circ\text{C}$). Los valores de P_i no difieren prácticamente para todos los sustratos (por lo que no se incluyeron en la Tabla III.10.) pero sí se pueden observar diferencias con la A_m y el T_m . Las A_m del trigo y triticale son del orden de las del sorgo, bastante menores que la de girasol y mucho menores que las de maíz. Esto confirma lo expresado en la literatura acerca de que los granso pequeños son menos susceptibles a la contaminación

(Smith y Moss, 1985; FAO, 11993). Sin embargo, en este sentido el centeno sería una excepción, ya que siendo de tamaño semejante al de trigo y

Tabla III.10. Comparación de diferentes sustratos en relación a los datos cinéticos de acumulación de aflatoxinas ($a_w=0.925$ y $T=25^\circ\text{C}$)

Sustrato	A_m (mg/kg)	T_m (dias)	Referencia
Maíz	30.76	35	(Montani, 1991)
Sorgo	2.26	35	
Girasol	15.72	56	
Trigo	2.15	21	Este trabajo
Centeno	11.84	35	
Triticale	2.85	14	

triticale, la A_m detectada indicaría una mayor propensión a la contaminación. En realidad, el resultado obtenido con el centeno ha sido en cierto modo sorprendente ya que, debido a las características de este cultivo, y a su capacidad de adaptación a condiciones adversas, se esperaba un comportamiento diferente para este cereal. En tal sentido podría señalarse también que el amranto, cuyas semillas son diminutas, ha mostrado una baja susceptibilidad a la producción de aflatoxinas (Bresler, G., 1994) datos que no pueden ser comparados con los del presente estudio porque han sido obtenidos a otros niveles de a_w . De todos modos, si bien la aseveración de que los granos pequeños son poco susceptibles a la contaminación con aflatoxinas se ha visto expresada en más de una oportunidad en la bibliografía, la relación entre el tamaño del grano y la propensión a la contaminación no ha sido lo suficientemente probada como para que se pueda tomar como regla general.

Conclusiones

- El método modificado propuesto para trigo, centeno y triticale presenta adecuados atributos de desempeño analítico en los tres sustratos estudiados. El método resultó satisfactorio tanto en lo que respecta a sus características científicas (exactitud, precisión) como a sus características prácticas (facilidad de ejecución, tiempo de análisis)
- El comportamiento de los cereales progenitores en relación a la colonización por *Aspergillus parasiticus* y a la acumulación de aflatoxinas fue marcadamente diferente, observándose concentraciones mayores en el centeno durante todo el período analizado. A pesar de que el centeno es considerado como un cultivo rústico y, en general, resistente a enfermedades a las cuales el trigo es mucho más susceptible, se demostró ser más propenso a la colonización por *A. parasiticus* y a la contaminación con aflatoxinas.
- Las curvas de acumulación de aflatoxinas en el triticale resultaron similares a las del centeno en cuanto a su forma pero las cantidades acumuladas fueron más bajas y parecidas a las halladas en trigo.
- Se comprobó la menor propensión del trigo y del triticale a la acumulación de aflatoxinas en relación a otros cereales, por ejemplo maíz. En el caso del trigo esta observación sería concordante con los datos de baja incidencia de contaminación natural registrada en muchas partes del mundo.
- De acuerdo a los datos obtenidos, las diferencias de comportamiento entre los distintos sustratos no estarían directamente relacionadas con el tamaño

del grano, dado que el centeno, cuyos granos son más pequeños que los del triticale, parece ser un sustrato mucho más propenso a la contaminación. Posiblemente, las diferencias deberían ser atribuidas a otros factores tales como ciertos constituyentes de la composición química que podrían tener influencia en la biosíntesis de las toxinas, podrían mencionarse los azúcares, ciertos metales, el ácido fólico, y las fitoalexinas.

Bibliografía

- Abdollahi, A.; Buchanan, R.L. (1981 a). Regulation of aflatoxin biosynthesis: induction of aflatoxin production by various carbohydrates. *J. Food Science*, 46: 143-146.
- ACTI. Advisory Committee on Tecnology Innovation. *Triticale, A promising Addition to the World's Cereal Grains*. 1989. Report of an ad-hoc panel of the ACTI. Board on Science an Technology for International Development. National Research Council. National Academic Press, Washington, D. C.
- Alcroft, R.; Carnaghan, R.B.A. (1963-a). Toxic products in groundnut: biological effect, *Chemistry and Industry* 2, 50-53.
- Alcroft, R.; Carnaghan, R.B.A.(1963-b).Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food producs from animal feed toxic groundnut meal, *Vet. Rec.* 75, 259-263.
- AOAC (1990) Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15° Edition, 1990. Cap. 49: Natural Poisons. Met. 970.45,p. 1190.
- AOAC (1993). AOAC Peer-verified methods program. Manual on Policies and Procedures. AOAC International, Maryland, USA.
- Bertoni, M.H.; Pereyra Gonzales, A.; Cattáneo, P.; Covas, G.(1995) Composición química de especies naturales y sintéticas de Triticeae (Gramineae) Tricepiros II - Harinas de extracción de cereales sintéticos. *Anales de la Asociación Química Argentina*-Vol. 83- N°3-4: 159-163.
- Beuchat, L.R.; Lechowich, R.V. (1970) Aflatoxin production on beans as affected by temperature and moisture content. *J. Milk Food Technol.* 33: 373-378.
- Boller, R.A.; Schroeder, H.W. (1974) Influence of relative humidity on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*. *Phytopathology* 64: 17-21.

- Bresler Fernandez, G.E. (1994) Hongos toxicogénicos y producción de micotoxinas en granos de *Amaranthus*. Tesis Doctor en Biología. Universidad Nacional del Sur.
- CAST (Council for Agriculture Science and Technology) 1989. Mycotoxins Economic and Health Risks, Task Force Report N°116, 37-42.
- Covas, G. (1983) Conferencia pronunciada en la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.
- Cuero, R.G.; Smith, J.E.; Lacey, J. (1986) The influence of gamma irradiation and sodium hypochloride sterilization on maiza seed microflora and germination. *Food Microbiology*, 3: 107-113.
- Chirife, J.; Favetto, G.; Ferro Fontán, C.; Resnik, S. (1983). The water activity of standard saturated salt solutions in the range of intermediate moisture foods. *Lebensmittel wiss.u. Technologie* 16, 36-38.
- Chourasia, H. (1995) Mycobiota and mycotoxins in herbal drugs of indian farmaceutical industries. *Mycol. Res.* 99 (6): 697-703.
- Christensen, C.M. (1991) Fungi and seed quality. In: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 3: Foods and Feeds. Marcel Dekker Inc. New York.
- Denizel, T.; Rolfe, E.J.; Jarvis, B. (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.; Davies, N.D. (1977). Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. Department of Research Information, Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, Alabama. Bulletin N°493.
- Doster, M.A.; Michailides, T.J.; Morgan, D.P. (1996) *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from California orchards. *Plant Disease*- 80 (5): 484-489.

- Etcheverry, M.; Chulze, S.; Dalcero, E.; Varsavsky, E.; Rodríguez, E.; Moschetti, E.; Ferrero, S. (1987) Aflatoxins in sunflower seeds. Influence of fungicides and insecticides. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 103-109.
- FAO (1982) Food and Nutrition Paper N°21. Mycotoxin surveillance. FAO and UNEP, Roma.
- FAO (1991) Estudio FAO. Alimentación y Nutrición 14/10. Capacitación en análisis de micotoxinas, FAO, Roma. p: 50-55
- FAO (1996) Worldwilde Regulations for Mycotoxins. Food and Nutrition Paper, Roma.
- Feil, B.; Fossati, D. (1997) Phytic acid in tritical grains as affected by cultivar and environment. *Crop Sci.*, 37: 916-921.
- Fennel, D.I.; Bothast, R.J.; Lillehoj, E.B.; Peterson, R.E. (1973). Bright greenish yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin. *Cereal Chemistry* 52: 314-321.
- Fernandez Pinto, V.; Vaamonde, G. (1996) Hongos productores de micotoxinas en alimentos. *Revista Argentina de Microbiología* - 28: 147-162
- Frisvad, J.C.; Samson, R.A. (1991) Filamentous Fungi in Foods and Feeds. En: *Handbook of Applied Mycology*. Vol. 3 Foods and Feeds, p. 41-67. D.K. Arora, K.G. Mukerji, E.H. Marth (eds) Marcel Dekker, New York.
- Gareis, M.; Bauer, J.; von Montgelas, A.; Gedek, B. (1984). Stimulation of aflatoxin B1 and T-2 toxin production by sorbic acid. *Appl. and Environ. Microbiol.* 47:416-418.
- Gonzalez, H.H.L. (1984) Estudio de la onfluencia de la temperatura y la actividad de agua en el crecimiento de hongos aislados de variedades nacionales de maíz. Tesis Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
- Horn, B.W.; Greene, R.L.; Soboley, V.S.; Dorner, J.W.; Powell, J.H. (1996) *Mycologia*, 88 (4): 574-587.

- Khorasani, G.R.; Jedel, P.E.; Helm, J.H.; Kennelly, J.J. (1997) Influence of stage of maturity on yield components and chemical composition of cereal grain silages. *Can. J. Anim. Sci.*, 77: 259-267.
- Kurata, H. (1990) Mycotoxins and Mycotoxicoses Overview. En: *Microbial toxins in Foods and Feeds*, p.249-259. Pohland, A.E., Dowell, V.R., Richard, J.L.(eds) Plenum Press, New York.
- Kurtzman, C.P.; Horn, B.W.; Hesseltine, C.W. (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin production species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaris*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147-158.
- Larumbe, A.; Gonzalez, H.H.L.; Pollio, M.L.; Martínez, E.; Boente, G.; Resnik, S.L.; Adrover, J.; Garibotti, G. (1994) Water sorption characteristics of argentine wheat: statistical methodology. *J. of Food Engineering*: 21, 291-304.
- Leon, A.E.; Rubiolo, A.; Añón, M.C. (1996) Use of triticale flours in cookies: quality factors. *Cereal Chem.* 73 (6): 779-784.
- Liang, S.; Skory, C.; Linz, J. (1996) Characterization of the function of the ver-1A and ver-1B genes, involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec. 1996 : 4568-4575.
- 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 N°279, 27-34.
- Lorenz, K.; Reuter, F.W.; Sizer, C. (1974) The mineral composition of triticales and triticale milling fractions by X-ray fluorescence and atomic absorption. *Cereal Chem.* 51: 534- 537.
- Michela, P.; Lorenz, K. (1976) The vitamins of triticale, wheat and rye. *Cereals Chem.* 53: 853-858.

- Mixon, A.C. (1977) Influence on 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. (1991) Influencia de la actividad acuosa y el tiempo de almacenamiento sobre la producción de aflatoxinas en maíz, sorgo, y girasol. Tesis Doctor en Ciencias Químicas. Universidad de Buenos Aires.
- Mishra, A.K.; Dubey, N.K. (1994) Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environmental Microbiol.*, 60: 1101-1105.
- Moss, M.O. (1984) Conditions and factors influencing mycotoxin formation in the field, *Chemistry and Industry* 15: 533-536.
- Moss, M.O.; Badii, F.(1982) Increased production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* spore in the presence of Rubratoxin B, *Appl. Environ. Microbiol.* 43:895-898.
- Nagarajan, V.; Bhat, R.V.; Tulpule, P.G. (1972) Aflatoxin production in some varieties of soybeans (*Glicine max L.*) *Experientia* 29: 1302-1303.
- Niles, E.V.; Norman, J.A.; Pimbley, D. (1985). Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in wheat and barley. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 84, 2, 259-266.
- Northolt, M.D.; Bullerman, L.B. (1982). Prevention of mold growth and toxin production through control of Environmental conditions. *Journal of Food Protection* 45, 6, 519-526.
- Park, K.Y.; Bullerman, L.B. (1981) Increased aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* under conditions of cycling temperatures, *J. Food Science* 46, 4 : 1147-1151.

- Peña, R.J.; Bates, L.S. (1982) Grain shriveling in secondary hexaploid triticales: I. Alpha-amylase activity and carbohydrate content of mature and developing grains. *Cereal Chem* 59:454-459.
- Pitt, J.I. (1993). Corrections to species names in physiological studies on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Protection*, Vol 56, 3:265-269.
- Pollio, M.L.; Gonzales, H.H.L.; Resnik, S.L. (1987) Estudio de diversos métodos de determinación de humedad para cereales y oleaginosas. *An. Asoc. Quim. Argent.* 75 (2): 135-154.
- Roy, A.K.; Chourasia, H.K.(1989) Effect of temperature on aflatoxin production in *Mucuna pruriens* seeds. *Applied and Environmental Microbiol.* 55, 2: 531-532.
- Royo, C.; Tribó, F. (1997) Triticale and barley for grain and for dual purpose (forage+grain) in a Mediterranean-type environment. I: Growth Analyses. *Aust. J. Agric. Res.*, 48, 411-421.
- Saini, H.S.; Henry, R.J. (1989) Fractionation and evaluation of triticale pentosans: Comparison with wheat and rye. *Cereal Chem.*, 66: 11-15.
- Schindler, A.F.; Palmer, J.G.; Eisenberg, W.V. (1967) Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl. Microbiol.* 15, 5: 1006-1009.
- Schmidt, F.R.; Davies, N.D.; Diener, U.L.; Lemke, P.A.(1983). Cycloheximide induction of aflatoxin synthesis in a nontoxic strain of *A. flavus*. *Biotechnology* 1: 794-795.
- Smith, J.E.; Moss, M.O. (1985). Mycotoxins. Formation, analysis and significance. John Wiley & Sons, Great Britain (pag. 83-87)..
- Sorenson, W.G.; Hesseltine, C.W.; Shotwell, O.L. (1967). Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 33: 49-55.
- 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.

- Trenk, H.L.; Hartman, P.A. (1970). Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Appl. Microbiol.* 19, 5, 781-784.
- Trucksess, M.W.; Stoloff, L.; Mislevic, P.B. (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.
- Vaamonde. G. (1995) Micotoxinas. En: *Toxicología de Alimentos*. A. Silvestre (ed) p. 153-193. Hemisferio Sur, Bs.As.
- Varughese, G.; Pfeiffer, W.H., Peña, R.J. (1996). Triticale: A successful alternative crop (Part 2). *Cereal Foods World*, Vol 41, N°7 : 635-645.
- Varughese, G.; Pfeiffer, W.H.; Peña, R.J. (1996). Triticale: A successful alternative crop (Part 1). *Cereal Foods World*, Vol. 41, N°6 : 474-482.
- Wang, S.; Thomas, K.C.; Ingledew, W.M.; Sosulski, K.; Sosulski, F.W. (1997) Rye and triticale as feedstock for fuel ethanol production. *Cereal Chem.* 74 (5): 621-625.
- Yousef, A.E.; Marth, E.H. (1984) Kinetic of growth and accumulation of aflatoxin B₁ by *Aspergillus parasiticus* in the presence of butylated hydroxyanisole isoprothiolane and nystatin. *Bioeng.* 26: 006-011.

Tablas de datos
Determinación de aflatoxinas en trigo

AFLATOXINA B₁

Dias	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	4,00	4,00	2,00	3,33
7	50,00	100,00	100,00	83,33
14	250,00	250,00	500,00	333,33
21	416,66	500,00	625,00	513,88
28	350,00	583,33	416,66	450,00
35	87,50	500,00	500,00	362,50
42	250,00	250,00	100,00	200,00
49	166,66	160,00	150,00	158,88
56	250,00	100,00	100,00	150,00
63	166,66	100,00	100,00	122,22
70	120,00	120,00	112,50	117,50

AFLATOXINA B₂

Dias	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2,45	2,45	4,90	3,26
14	12,25	24,50	24,50	20,41
21	24,50	30,62	30,62	28,58
28	21,43	21,43	30,62	24,49
35	34,30	49,00	49,00	44,10
42	12,25	49,00	12,25	24,50
49	14,70	0,00	0,00	4,90
56	0,00	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

AFLATOXINA G₁

Dias	Determinaciones			
	x ₁	x ₂	x ₃	Promedio
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	1,86	2,79	1,86	2,17
7	186,00	372,00	186,00	248,00
14	930,00	930,00	697,50	852,50
21	1.550,00	775,00	2.325,00	1.550,00
28	651,00	813,75	775,00	746,58
35	542,50	930,00	930,00	800,80
42	697,50	697,50	465,00	620,00
49	697,50	155,00	155,00	335,83
56	232,50	93,00	93,00	139,50
63	232,50	77,50	0,00	103,33
70	109,50	104,60	93,00	102,36

AFLATOXINA G₂

Dias	Determinaciones			
	x ₁	x ₂	x ₃	Promedio
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2,50	2,50	2,50	2,50
14	25,00	25,00	50,00	33,33
21	50,00	62,50	62,50	58,33
28	21,87	87,50	31,25	46,87
35	35,00	50,00	50,00	45,00
42	12,50	12,50	12,50	12,50
49	20,00	0,00	0,00	6,66
56	0,00	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

Determinación de aflatoxinas en triticale

AFLATOXINA B₁

Dias	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	8,57	15,00	20,00	14,52
7	500,00	562,50	375,00	479,16
14	937,50	625,00	937,50	833,33
21	500,00	625,00	416,66	513,88
28	625,00	625,00	1.250,00	833,33
35	416,66	625,00	625,00	555,55
42	100,00	1.000,00	650,00	516,66
49	200,00	200,00	200,00	200,00
56	375,00	166,66	150,00	230,00
63	333,33	200,00	150,00	227,77
70	125,00	125,00	416,66	222,22

AFLATOXINA B₂

Dias	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2,45	2,45	4,90	3,26
14	12,25	24,50	24,50	20,41
21	24,50	30,62	30,62	28,58
28	21,43	21,43	30,62	24,49
35	34,30	49,00	49,00	44,10
42	12,25	49,00	12,25	24,50
49	14,70	0,00	0,00	4,90
56	0,00	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

AFLATOXINA G₁

Dias	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	1,86	2,79	1,86	2,17
7	186,00	372,00	186,00	248,00
14	930,00	930,00	697,50	852,50
21	1.550,00	775,00	2.325,00	1.550,00
28	651,00	813,75	775,00	746,58
35	542,50	930,00	930,00	800,80
42	697,50	697,50	465,00	620,00
49	697,50	155,00	155,00	335,83
56	232,50	93,00	93,00	139,50
63	232,50	77,50	0,00	103,33
70	109,50	104,60	93,00	102,36

AFLATOXINA G₂

Dias	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
7	2,50	2,50	2,50	2,50
14	25,00	25,00	50,00	33,33
21	50,00	62,50	62,50	58,33
28	21,87	87,50	31,25	46,87
35	35,00	50,00	50,00	45,00
42	12,50	12,50	12,50	12,50
49	20,00	0,00	0,00	6,66
56	0,00	0,00	0,00	0,00
63	0,00	0,00	0,00	0,00
70	0,00	0,00	0,00	0,00

Determinación de aflatoxinas enceneno

AFLATOXINA B₁

Días	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0	0	0	0
4	80	47	57	59
7	500	750	562,5	604,16
14	2500	1875	1250	1875
21	2500	1875	1875	2083,33
28	2500	2625	2625	2583,33
35	3500	3750	2500	3250
42	2800	2000	3500	2767
49	1250	2500	3750	2500
56	1000	2000	666,66	1222,22
63	1125	300	262,5	562,5
70	225	266,66	200	230,55

AFLATOXINA B₂

Días	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0	0	0	0
4	0	0	0	0
7	24,5	24,5	36,75	28,58
14	183,75	229,68	214,37	209,26
21	81,66	122,5	122,5	108,88
28	163,33	171,5	285,83	206,88
35	285,83	245	245	258,61
42	612,5	490	285,33	462,61
49	204,16	306,25	204,16	238,19
56	98	245	65,3	136,11
63	73,5	0	0	24,5
70	0	0	0	0

AFLATOXINA G₁

Días	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0	0	0	0
4	74,4	37,2	53	54,86
7	2325	1860	1395	1860
14	6510	6510	6510	6510
21	4.650,00	2325	2.325,00	3.100,00
28	8137,5	6510	6510	7052,5
35	6510	9300	8137,5	7982,5
42	4650	2325	7440	4805
49	3720	3720	4882,5	4107
56	465	1395	248	702,66
63	232,5	93	32,55	119,35
70	93	37,2	62	64,1

AFLATOXINA G₂

Días	Determinaciones			Promedio
	x ₁	x ₂	x ₃	
0	0	0	0	0
4	0	0	0	0
7	50	50	56,25	52,08
14	375	280,3	218,75	291,35
21	83,33	93,75	250	142,36
28	416,66	350	291,66	352,77
35	291,66	416,66	350	352,77
42	625	200	291,66	372,22
49	312,5	312,5	125	250
56	100	0	0	33,33
63	37,5	0	0	12,5
70	0	0	0	0