

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**CUANTIFICACION DE MICOTOXINAS MAS FRECUENTES EN GRANOS DE
MAIZ COMERCIALIZADOS PARA EL CONSUMO HUMANO EN LOS
MERCADOS: CENTRAL DE SAN SALVADOR, MEJICANOS Y SAN
MIGUELITO**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
CLAUDIA VERONICA VEGA JIMENEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

NOVIEMBRE DE 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA DE AMAYA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: TOXICOLOGIA Y QUIMICA LEGAL

Licda. María Luisa Ortíz de López

ASESORA DE AREA DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGICO:

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTES DIRECTORES

MSc. Eliseo Ernesto Ayala Mejía

Dr. José Antonio Recinos Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODO PODEROSO por ser el creador de todo este infinito universo para investigar y por darme la bendición de la vida y no permitir que me diera por vencida.

A MIS DOCENTES DIRECTORES MSc. Eliseo Ernesto Ayala y Dr. José Antonio Recinos por su paciencia, dedicación y esmero ya que sin ellos tampoco hubiera sido posible la realización de mi trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORAS DE AREA:

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, Licda. María Luisa Ortiz de López, MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez por sus observaciones y recomendaciones las cuales ayudaron a la realización de un buen trabajo de investigación.

A LABORATORIOS BIOLÓGICOS VETERINARIOS por permitirme realizar en sus instalaciones la etapa experimental de este trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente colaboraron en la realización de este trabajo de graduación.

DEDICATORIA

DIOS:

Por las bendiciones recibidas a lo largo de toda mi vida y por ser la luz, la fuerza, esperanza que me impulsa y me ayuda a superar todos los obstáculos.

LA SANTISIMA VIRGEN MARIA:

Por ser mi protección y mi refugio en los momentos más difíciles.

MIS PADRES: René Mauricio Vega y María Eugenia Jiménez porque con su amor, sacrificio y ejemplo me ayudaron a ser la persona que soy, motivándome a no rendirme nunca.

MIS HERMANOS, ABUELOS Y DEMAS FAMILIA

Por apoyarme y darme fuerzas para no rendirme.

MI HIJA: Sofía Eugenia Vega porque con su sonrisa me llena de energías y deseo de superación.

MIS AMIGOS Y AMIGAS: Que aunque no mencione uno a uno sabrán perfectamente quienes son, por ayudarme, aconsejarme y apoyarme en los momentos de duda.

Claudia Vega

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xvi
Capítulo II	
2.0 Objetivos	19
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	21
3.1 Generalidades sobre hongos productores de micotoxinas	21
3.1.1 Estructura de los Hongos	23
3.1.2 Taxonomía y Clasificación de los hongos	24
3.2 Condiciones de crecimiento de hongos en relación a la Producción de micotoxinas	25
3.3 Micotoxinas	28
3.3.1 Definición	28
3.4 Aflatoxinas	29
3.4.1 Características Del Compuesto	29
3.4.2 Mecanismo de Acción	32
3.4.3 Toxicología	34
3.4.3.1 Toxicidad Aguda	34
3.4.3.2 Toxicidad Crónica	36

3.5	Ocratoxina	40
3.5.1	Características del Compuesto	40
3.5.2	Toxicología	41
3.5.2.1	Toxicocinética	41
3.5.2.2	Toxicidad Aguda y Crónica	42
3.5.2.3	Mecanismo de Toxicidad	44
3.6	Vomitoxina (DON)	44
3.6.1	Características del Compuesto	44
3.6.2	Toxicología	48
3.6.2.1	Toxicocinética	48
3.6.2.2	Toxicidad Aguda y Subaguda	49
3.6.2.3	Mecanismo de Toxicidad	51
3.7	Toxina T-2	53
3.7.1	Características del Compuesto	53
3.7.2	Toxicología	55
3.8	Método Analítico para la cuantificación de Micotoxinas	58
3.8.1	Método de ELISA	58
3.8.1.1	ELISA Directo	59
3.8.1.2	ELISA Indirecto	59
Capítulo IV		
4.0	Diseño Metodológico	63
4.1	Tipo de estudio	63

4.2 Metodología	63
4.2.1 Investigación Bibliográfica	63
4.2.2 Investigación de Campo	63
4.2.3 Recolección de Muestra	64
4.3 Parte Experimental	64
4.3.1 Toma de Muestra	64
4.3.2 Cuantificación de Aflatoxina	65
4.3.3 Cuantificación de Ocratoxina	66
4.3.4 Cuantificación de Vomitoxinas (DON)	67
4.3.5 Cuantificación de T-2 toxina	68
Capítulo V	
5.0 Discusión e Interpretación de Resultados	72
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	80
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	83
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE TABLAS

TABLA Nº		Pág.
1	Toma de muestra por mercado según establecimiento	64
2	Contenido de Aflatoxinas en Muestras Analizadas por Mercado	71
3	Contenido de Ocratoxinas en Muestras Analizadas por Mercado	73
4	Contenido de Vomitoxinas en Muestras Analizadas por Mercado	74
5	Contenido de T-2 toxinas en Muestras Analizadas por Mercado	75
6	Comparación de concentraciones de Micotoxinas por mercado	76

INDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº.		Pág
1	Estructura de las Aflatoxinas	31
2	Mecanismo de Acción de Aflatoxinas	33
3	Estructura Química de Ocratoxinas	40
4	Estructura Química de Vomitoxinas	46
5	Metabolismo de Vomitoxinas (DON)	49
6	Método de ELISA Indirecto	61
7	Método de ELISA directa	61
8	Procedimiento para la cuantificación de micotoxinas	70
8	Concentración Promedio de Aflatoxina por mercado	73
9	Concentración de T-2 toxina por mercado	77

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Lista de material, equipo y reactivos
2. Preparación de reactivos
3. Tiempos de Extracción, Conjugado y sustrato para cada micotoxina
4. Proceso de Cuantificación de Micotoxinas

ABREVIATURAS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos
AFB	Aflatoxina B
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
DON	Deoxinilvalenol (Vomitoxina)
L	Litros
ml	Mililitros
OT	Ocratoxina
OTA	Ocratoxina A
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón

RESUMEN

El presente trabajo de investigación trata sobre la determinación cuantitativa de micotoxinas más comunes en granos de maíz comercializados para el consumo humano en los mercados Central de San Salvador, Mejicanos y San Miguelito por el método de ELISA.

Se realizó una investigación donde se estudiaron los conceptos referentes al análisis cuantitativo de micotoxinas, el efecto que estas presentan sobre la salud y los límites y condiciones requeridas para su cuantificación, así como el fundamento de las pruebas de inmunoensayo por ELISA.

Teniendo claros los conceptos se inició con la investigación de campo, determinando la metodología a utilizar en el laboratorio, así como los reactivos utilizados para cada una de las determinaciones de las diferentes micotoxinas a analizar.

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Diagnóstico de Laboratorios Biológicos Veterinarios, analizando dieciséis (16) muestras de granos de maíz obtenidas de los establecimientos que comercializan este producto en cada mercado.

Los resultados obtenidos en la parte práctica fueron comparados con los límites de detección establecidos por la FAO/FDA, donde se encontraron en la mayoría de las muestras valores muy por debajo de los niveles establecidos.

Por lo anterior se demostró que las muestras de maíz para consumo humano investigadas, son aptas para el consumo humano y que los inmunoensayos por el método ELISA para cuantificación de micotoxinas, reflejan resultados rápidos, confiables y versátiles para la determinación de estos contaminantes.

Pese a encontrarse en este estudio concentraciones por debajo de los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA para estos contaminantes, es importante no perder de vista los efectos que los mismos tienen sobre los organismos vivos y su capacidad aditiva la cual provoca un detrimento en la salud tanto animal como humana y realizar periódicamente monitoreos de los granos de maíz que se comercializan en el país a fin de establecer la prevalencia de micotoxinas y establecer los propios límites de tolerancia como las normativas pertinentes a través de las autoridades competentes para evitar en un futuro posibles intoxicaciones en la población.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Durante su crecimiento, los cultivos para granos y forrajes están expuestos a innumerables peligros, algunos de los cuales son fácilmente discernibles, como la sequia o las inundaciones, las plagas de insectos, roedores y aves; mientras que otros son menos visibles y, por consiguiente, de alguna manera, más difíciles de definir y controlar.

Los alimentos pueden infectarse con diferentes hongos productores de micotoxinas (metabolitos secundarios), pudiendo al momento de la cosecha estar contaminados con tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, ácido tenuazónico, alternariol, aflatoxinas, ocratoxinas entre otros.

Los productos agrícolas en las etapas sucesivas de cultivo, cosecha y almacenamiento ofrecen sustratos favorables al desarrollo de los hongos que producen las micotoxinas. En la mayoría de países en desarrollo las condiciones meteorológicas permiten almacenar productos agrícolas durante todo el año, pero estos son ideales también para fomentar el desarrollo de microorganismos que causan la destrucción de grandes cantidades de alimentos.

En el presente trabajo de investigación se pretendió cuantificar la presencia de micotoxinas en granos de maíz comercializados para consumo humano en Los mercados central de San Salvador, Mejicanos y San Miguelito, aplicando para esto el método ELISA de inmunoensayo para Aflatoxinas, Ocratoxinas, T-2

Toxinas y Vomitoxinas (DON) y comparar los resultados obtenidos con los límites de tolerancia establecidos por la FDA y la FAO. Las muestras tomadas de cada mercado dependieron del número de establecimientos en los cuales se comercializan granos de maíz, para lo cual, se realizó una visita previa de observación de la cual se obtuvo el número total de puestos a muestrear, haciendo un total de dieciséis muestras; los análisis de las muestras recolectadas se realizaron en el laboratorio de diagnóstico de Laboratorios Biológicos Veterinarios S.A de C.V. (LBV). La toma de muestras y sus respectivos análisis se llevaron a cabo durante el año 2010.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Cuantificar micotoxinas más frecuentes en granos de maíz comercializados para el consumo humano en los mercados: Central de San Salvador, Mejicanos y San Miguelito.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Recolectar muestras de maíz comercializado en los mercados: Central de San Salvador, Mejicanos y San Miguelito.
- 2.2.2 Cuantificar el contenido de Aflatoxina, Ocratoxina, T-2 toxina y Vomitoxina por el método de ELISA en las muestras de maíz recolectadas.
- 2.2.3 Comparar los resultados obtenidos en cuanto al contenido de micotoxinas con los límites establecidos por el FDA y la FAO.
- 2.2.4 Elaborar con los resultados obtenidos una tabla de comparación para futuras investigaciones de micotoxinas.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades sobre hongos productores de micotoxinas

En el deterioro de los alimentos están generalmente implicados tres tipos de microorganismos: bacterias, levaduras y hongos. Cada microorganismo tiene para su crecimiento condiciones ambientales específicas en cuanto a oxígeno, acidez, humedad, nutrientes y temperatura. Por esta razón, tanto la clase de alimento como las condiciones externas determinan los tipos de microorganismos que van a prevalecer.

Cuando se habla del reino de los hongos, se hace referencia a un grupo de organismos los cuales pueden clasificarse en levaduras y hongos filamentosos (mohos). Estos últimos son organismos eucariotas, multicelulares y filamentosos, constituidos por micelios verdaderos. Carecen de Clorofila y están formados por una serie de células alineadas, llamadas hifas, el micelio es el conjunto de hifas ramificadas y resulta visible sobre el alimento ya sea en la superficie o en el interior mediante un aspecto y color característico.

Los hongos constituyen un gran problema como contaminantes en los alimentos, tanto a nivel económico como a nivel de salud. Son prácticamente omnipresentes en el ambiente y la variedad es enorme.⁽⁷⁾

Todos los hongos son aerobios, es decir que necesitan oxígeno para vivir y multiplicarse, se reproducen mediante esporas que son muy resistentes a condiciones adversas como frío, calor, sequedad y falta de nutrientes. Las

esporas pueden sobrevivir meses o aun años en el mismo lugar, o ser transportadas por el aire u otros vectores a otras partes. Cuando encuentran condiciones favorables comienzan a reproducirse nuevamente.⁽⁹⁾

Muchos de los hongos se desarrollan en los alimentos produciendo metabolitos tóxicos, llamados micotoxinas. Dichas sustancias son capaces de inducir lo que se conoce con el nombre de micotoxicosis, enfermedades que afectan a los animales y al hombre. Los hongos principales implicados en casos de micotoxicosis pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, pero existen también especies productoras de micotoxinas en otros géneros.

Se han identificado centenas de micotoxinas pero no todas tienen implicaciones en la salud. Con base en los conocimientos actuales, existen evidencia de exposición humana a Aflatoxina, Ocratoxina, Zearalenona y Tricotecenos (T-2), no incluyendo la posibilidad de que el estado de las micotoxinas presentes en el medio ambiente, puedan también presentar riesgos para la salud humana y animal.⁽⁵⁾

Un mismo hongo puede producir simultáneamente diferentes tipos de micotoxinas, así que es muy posible que la dieta esté contaminada con varias micotoxinas. Esto es importante, ya que pueden presentarse efectos sinérgicos, como lo son el caso de la Aflatoxina B1, con la micotoxina T- 2, así como de micotoxina T-2 con Ocratoxina A.⁽³⁾

Cuando varios hongos invaden un mismo alimento, existe competencia entre ellos en cuanto a crecimiento y producción de micotoxinas. Cepas productoras

de micotoxinas pueden reducir o parar completamente la producción cuando hay presencia de otros hongos.

Todos los hongos son heterótrofos, por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada, la que utilizan como fuente de energía y carbono.

Son células eucariotas, es decir presentan un núcleo diferenciado con una membrana bien organizada.

Tienen pared celular, esta pared es rígida, por lo que no pueden comer alimentos sino que absorben nutrientes simples y solubles que obtienen al desintegrar polímeros mediante enzimas extracelulares llamadas despolimerasas.

La estructura de los hongos puede ser de un micelio, que está formado por múltiples filamentos llamados hifas o por estructuras unicelulares llamadas levaduras, estas últimas se reproducen por gemación. El micelio de los hongos está formado por 2 partes:

Micelio vegetativo: asegura el desarrollo, nutrición y fijación.

Micelio reproductor: donde se forman los órganos de reproducción.

3.1.1 Estructura de los hongos.

Los hongos están formados por una estructura celular, donde el núcleo tiene membrana doble y nucléolos; los organelos citoplásmicos incluyen, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas, ribosomas y aparato de golgi relacionado con la producción de vesículas secretoras, cuerpos lipídicos,

inclusiones cristalinas y microcuerpos; también puede haber hileras de microtúbulos y glucógeno.

El citoplasma y la pared celular se pueden desintegrar por autólisis y se desarrolla una pared secundaria bastante gruesa; esto da lugar a la formación de células de resistencia que sobreviven a condiciones adversas y permanecen en estado de latencia.

3.1.2 Taxonomía y clasificación de los hongos.

La taxonomía de los hongos se basa principalmente en criterios morfológicos y en las características de las estructuras de reproducción. Los hongos se dividen en hongos inferiores y superiores: Los inferiores se caracterizan por presentar filamentos gruesos no tabicados, reproducción asexual por esporas endógenas y reproducción sexual por oosporas o cigosporas.

Los hongos superiores presentan filamentos tabicados y reproducción asexual por esporas externas o conidios aislados o en cadenas o dispuestas en donidioforos, la reproducción sexual ocurre por fusión de 2 esporas de sexos diferentes con formación de una fase binucleada. Donde los núcleos del filamento binucleado se fusionan y dan lugar a la formación de un huevo. El Dimorfismo es la capacidad de algunas especies de hongos de desarrollar dos formas, según las condiciones ambientales:

1. Como Micelio, cuando crecen a una temperatura de 25°C a 30°C y
2. Como Levadura, cuando crecen a una temperatura de 35 a 37 grados centígrados.

Ejemplo: el *Aspergillus Flavus* y el *Aspergillus fumigatus* crecen a temperatura ambiente, formando una estructura micelial, pero también crecen a 37 grados centígrados, con una estructura de levaduriforme; por lo tanto son hongos dimórficos.

3.2 Condiciones de crecimiento de hongos en relación a la producción de micotoxinas.

Para crecer y multiplicarse los diferentes hongos tienen requerimientos específicos en cuanto a nutrientes y condiciones externas.

La fuente de carbono (tipo de azúcar, ácido graso, etc.) es importante así como la fuente de nitrógeno, el pH y la presencia de iones metálicos, lo anterior explica porque determinado hongo crece mejor en un alimento que en otro, aun cuando las condiciones anteriores como luz, temperatura y humedad sean iguales. Se puede mencionar que el maíz, trigo y maní son especialmente susceptibles a la contaminación por hongos productores de Aflatoxina y Zearalenona, por poseer estos una composición ideal de nutrientes. El maíz tierno es más susceptible que el maíz sazón.

No todas las cepas de las especies de hongos conocidos como productoras de micotoxina son capaces de producirlas. Únicamente una fracción de las cepas que se encuentran en la naturaleza son productoras de micotoxinas, fenómeno que se debe a diferencia genética entre cepas. Por tanto, la presencia de hongos en un alimento no implica necesariamente la presencia de micotoxinas,

así como el hecho de que la cantidad de hongos sea muy baja, pero la micotoxina se encuentre en concentración alta.(2)

La capacidad productora de un hongo, así como la cantidad de micotoxina producida, depende de la composición del alimento y varía de un producto a otro. Algunos genotipos de cultivos son resistentes, tienen características físicas que impiden la penetración de hongos o de humedad o contienen compuestos que inhiben los sistemas enzimáticos vitales para el proceso de producción de micotoxinas. Es importante reconocer que las condiciones óptimas para la producción de micotoxinas no necesariamente son idénticas a las óptimas para el crecimiento de hongos. Sin embargo, si logramos controlar el crecimiento de hongos, controlamos indirectamente la producción de micotoxinas.

Los alimentos pueden contaminarse cuando los hongos se desarrollan en los cultivos en el campo, durante la cosecha, en el almacenamiento o durante el procesamiento de los alimentos.

Las cosechas contaminadas frecuentemente incluyen: maíz, sorgo, cebada, trigo, centeno, arroz, maní, nueces de árboles, y semilla de algodón. Los alimentos son deteriorados por Hongos cuando sufren cambios inaceptables en su apariencia, textura, olor y gusto o cuando están contaminados con niveles potencialmente peligrosos de una o más micotoxinas.

Los hongos que invaden los granos pueden clasificarse en dos grupos diferentes:

- **Hongos de campo:** invaden los granos antes de la cosecha o tras la siega (siempre previo a la trilladora). Incluye distintas especies que requieren altos niveles de humedad en el grano (20-22%). Son típicos los géneros *Alternaria* y *Fusarium*.

- **Hongos de almacenaje:** invaden el grano a contenidos inferiores de humedad. Ejemplo de estos hongos son los géneros como *Aspergillus* y *Penicillium*.

Muchos hongos no son productores de micotoxinas incluso pudiendo invadir el grano, por lo que un grano enmohecido no tiene por qué ser necesariamente tóxico. Del mismo modo, puede detectarse una micotoxina sin la presencia del hongo productor, ya que éste puede haber sido inactivado por procesos químicos o por alteración de los factores ambientales mientras las micotoxinas permanecen en el sustrato.

Hasta el momento, se han identificado más de 200 tipos de micotoxinas. Sin embargo, las que pueden encontrarse con mayor frecuencia como contaminantes naturales en los alimentos para animales o humanos son las siguientes: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 M1), ocratoxinas, zearalenona, tricotecenas (vomitoxina, T-2, nivalenol, DON), citrinina, patulina y fumosinas (B1 y B2).

3.3 Micotoxinas

3.3.1 Definición⁽⁸⁾

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, estos pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos principalmente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro. Dentro de este grupo, se encuentran los antibióticos y las micotoxinas. Las micotoxinas suelen formarse al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento del moho. Las micotoxinas, que derivan de las palabras griegas *mikes* y *toxina*, que significan hongo y veneno respectivamente, son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria. Son moléculas relativamente pequeñas ($P_m < 700$). La mayor parte de estos metabolitos secundarios se originan en la ruta policetónica. Las micotoxinas son un grupo heterogéneo de sustancias químicas que tienen efectos negativos agudos y/o crónicos sobre la salud de los seres humanos y de los animales.

Las micotoxinas son extremadamente tóxicas y mantienen esta toxicidad durante un tiempo prolongado, son químicamente diversas y de poca solubilidad en agua, la mayoría tiene una estructura de anillos aromáticos y son muy resistentes a la inactivación por métodos físicos, químicos y biológicos.

Esta contaminación de granos alimenticios por micotoxinas, no solo constituye daño a la salud sino que representa otro obstáculo para el comercio internacional de los productos de países en desarrollo y ello ocasiona la destrucción de los cargamentos y a menudo la pérdida de mercados enteros y de valiosas divisas. En muchos países el logro de la inocuidad de los alimentos ofrecidos a los consumidores es un desafío, porque son varios los factores ambientales que pueden ser causa de contaminación directa e indirecta de compuestos como las micotoxinas.⁽¹⁾

Los hongos pueden cambiar textura, color, sabor y calidad de los productos alimenticios ya que son capaces de darles olores y sabores desagradables, descomponiéndolos, tornándolos indeseables y con efectos tóxicos. Enfermedades y muertes de animales en granjas, ocasionadas por la ingestión de alimentos mohosos, han demostrado en investigaciones posteriores que estos contenían determinadas micotoxinas que han sido luego identificadas; de este modo se ha podido establecer una correlación directa entre las micotoxinas y un síndrome morbozo en los animales y/o en el hombre denominado Micotoxicosis.⁽¹⁰⁾

3.4 Aflatoxinas⁽⁸⁾

3.4.1 Características del compuesto

El nombre de las aflatoxinas hace referencia al hecho de ser biosintetizadas por el hongo *Aspergillus flavus* y fue propuesto en 1962 por sus descubridores. La primera letra, la A, hace referencia al género *Aspergillus*, las tres siguientes,

FLA, proceden de la especie *flavus* y el término TOXINA se refiere a su efecto tóxico. En cuanto a las aflatoxinas B y G, se las denomina así por el color de la fluorescencia que emiten bajo la luz UV: azul (Blue) y verde (Green), respectivamente. La estructura de las aflatoxinas fue deducida alrededor de 1962 por el grupo de Asoa.

Las aflatoxinas son sustancias biogénicas y están estructuralmente relacionadas. Químicamente son cumarinas sustituidas, conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona, comunes a todas ellas. Todas ellas son muy fluorescentes. Habiéndose aprovechado esta propiedad como base de sus procedimientos analíticos. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 g/mol, y la mayoría son poco solubles en agua, pudiéndose extraer con disolventes orgánicos moderadamente polares tales como el cloroformo o el metanol. Las

aflatoxinas purificadas en forma cristalina son bastante termo resistentes, estables en un rango de pH entre 3 y 10, y sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C. Actualmente, se han identificado 18 tipos de aflatoxinas, de las cuales sólo seis tienen significación como contaminantes de los alimentos: las aflatoxinas del grupo B (B₁, y B₂), G (G₁, y G₂) y M (M₁ Y M₂). La numeración 1 y 2 dentro de cada grupo hace referencia a su movilidad cromatográfica relativa. Las aflatoxinas del grupo M son derivados hidroxilados de los dos grupos anteriores. La aflatoxina B₁ (AFB₁), al igual que la G₁ (AFG₁), es resultado del metabolismo de los hongos micotoxigénicos. Las aflatoxinas B_{2a} G_{2a} son

obtenidas a partir de B₁ y G₁ respectivamente, en medios fuertemente ácidos. El aflatoxicol se obtiene del metabolismo *In vivo* e *in vitro* de la AFB₁ mediante las reductasas NADPH dependientes de las fracciones hepáticas submitocondriales en humanos y algunos animales (aves, conejos y truchas). La aflatoxina P₁, es el principal metabolito urinario en *Macacus rhesus* después de la inyección intraperitoneal de la AFB₁ mientras que la AFQ₁ es el metabolito hidroxilado de la AFB₁, siendo un producto metabólico en las preparaciones microsomales hepáticas de monos, ratas y en seres humanos. Además es 18 veces menos tóxica que la AFB₁.

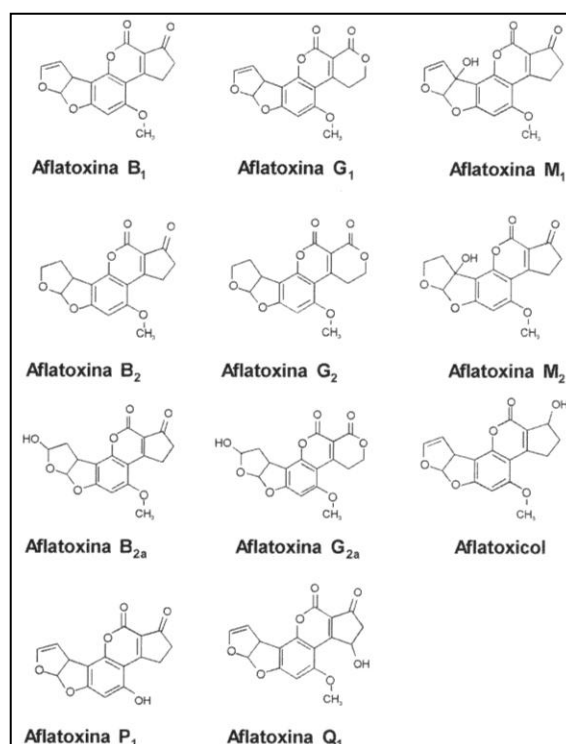


Fig N^o. 1 Estructura de las Aflatoxinas

Las aflatoxinas del grupo B (B₁ y B₂) y G (G₁ y G₂) son un grupo de toxinas producidas por cepas de varias especies del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A.*

parasiticus, *A. nomius* y *A. tamarii*). El crecimiento de estos hongos y la producción de toxinas dependen de muchos factores como puede ser el alimento, el grado de acidez, la temperatura o humedad ambientales y la presencia de microflora competidora. Aunque en general las condiciones óptimas de crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* son unas temperaturas entre los 25 y los 35 °C, una humedad relativa entre 88 y 95% y una actividad del agua alta, se ha visto que *A. flavus* puede proliferar a temperaturas de 10 a 43 °C, con una actividad del agua de alrededor de 0.99 y que la temperatura óptima para que produzca toxinas oscila entre los 20 y 30°C. Las pautas de comportamiento de *A. parasiticus* son similares aunque la actividad de agua óptima para su crecimiento es de 0.83 y para la producción de toxinas es de 0.87, con unas temperaturas entre 28 y 30 °C. El pH óptimo para el crecimiento de estos hongos oscila entre 3.5 y 5.5. Otro factor que influye en el crecimiento de los hongos micotoxigénicos y en la síntesis de aflatoxinas es la composición gaseosa ambiental en la que crece el hongo y la luz. Al ser hongos aerobios, su crecimiento es bueno a concentraciones de CO₂ del 20% mientras que concentraciones superiores al 10% detienen la producción de las aflatoxinas.

3.4.2 Mecanismo de acción

La aflatoxina B₁ (AFB₁) se considera la más importante de toda la serie, normalmente aparece con mayor frecuencia y a mayor concentración que las restantes aflatoxinas, aunque las concentraciones relativas entre ellas y la frecuencia de su aparición puede variar entre márgenes muy amplios

dependiendo de la cepa fúngica, del sustrato de crecimiento y de las condiciones ambientales. La AFB₁ es absorbida en el intestino delgado y transportada por los glóbulos rojos y las proteínas plasmáticas hasta el hígado, mayoritariamente por vía portal. La toxina entra en la célula y es metabolizada en el retículo endoplasmático para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos tales como las aflatoxinas P₁, M₁ y Q₁ principalmente. También puede dar lugar a la formación de la aflatoxina B₁-8,9-epóxido; este compuesto puede ser detoxificado por la acción de una transferasa inducible para dar un conjugado con el glutatión en su forma tiónica (GSH), alternativamente, el epóxido también presenta afinidad por diversas macromoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas a las que se une covalentemente y por ello puede dar lugar a disrupciones en la transcripción y en la traducción, respectivamente.

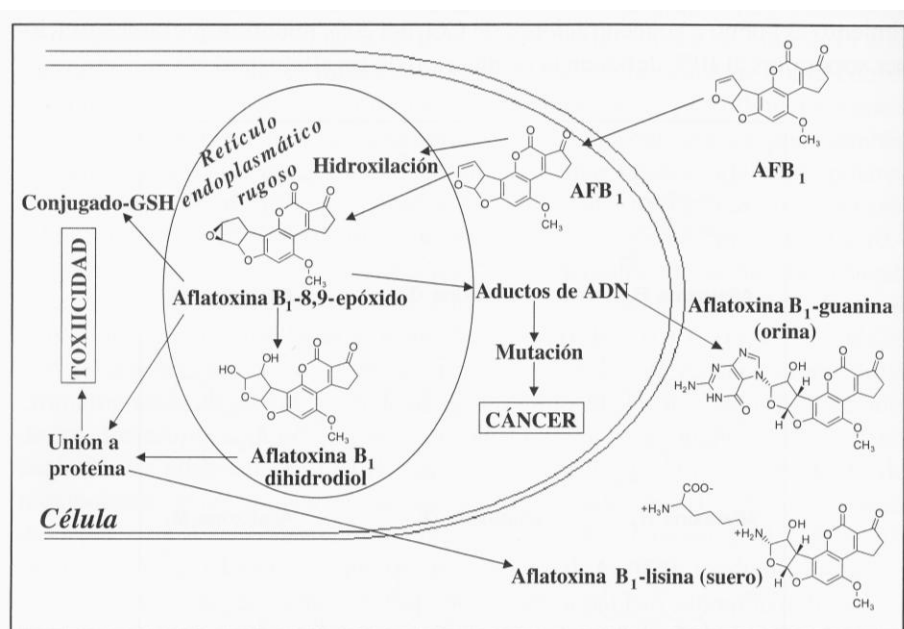


Fig No. 2 Mecanismo de acción de las aflatoxinas

El aducto de ADN formado, aflatoxina B₁-guanina, es eliminado por orina usándose como biomarcador. La unión del epóxido a las proteínas es responsable de su toxicidad y origina la eliminación de un aducto, aflatoxina B₁-lisina, que se emplea como biomarcador en suero.

3.4.3 Toxicología

El Comité Científico de la Alimentación Humana de la Unión Europea ha señalado que la AFB₁ es un agente cancerígeno genotóxico que contribuye al riesgo de padecer cáncer hepático, incluso a dosis sumamente bajas. La IARC también ha clasificado a la AFB₁ dentro de la categoría de sustancias del tipo L en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre, tanto aisladamente como en mezclas naturales con las otras aflatoxinas. La misma Agencia clasificó a la aflatoxina M₁ en la categoría 2B como corresponde a un agente posiblemente carcinogénico para el hombre basándose en los estudios realizados con animales de experimentación, aunque con evidencias insuficientes por el momento para el ser humano. Las AFB₂ y AFG₂ han sido estudiadas sólo en animales, resultando que las pruebas para AFG₂ fueron insuficientes y las de AFB₂ fueron limitadas como para ser clasificadas como cancerígenas.

3.4.3.1. Toxicidad aguda

Los síntomas de la intoxicación aguda tienen lugar cuando se ingieren grandes cantidades de aflatoxinas, las cuales, como se ha mencionado anteriormente, son absorbidas en el intestino delgado llegando hasta el hígado. La presencia

de las aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que originará necrosis y/o muerte celular hepática. En el hígado las enzimas oxidasas las biotransforman en una serie de metabolitos, algunos altamente reactivos, que tienen la capacidad de unirse covalentemente con el ADN, ARN y proteínas. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas celulares, lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición del metabolismo de carbohidratos y de lípidos. Paralelamente, se observa falta de apetito (anorexia), depresión, ictericia, diarrea y fotosensibilización, llegando a la muerte, en el caso de animales, en un periodo que puede variar entre 12 y 27 días tras el consumo del alimento contaminado. También exhibe efectos citotóxicos debidos a que induce la peroxidación lipídica en el hígado produciendo un daño oxidativo en los hepatocitos. Además, la AFB₁ puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótida cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales.

Uno de los casos más importantes de aflatoxicosis tuvo lugar en el noroeste de la India en 1974, donde alrededor de 150 poblaciones de los estados de Gujarat y Rajastán se vieron afectadas por un brote epidémico que cursaba bajo una forma poco corriente de hepatitis. La tasa de mortalidad sobrepasó el 25%, con 108 fallecimientos de un total de 397 personas intoxicadas. La población rural afectada padecía en general un nivel de nutrición deficiente, siendo el maíz su alimento básico. En octubre de 1974 tuvieron lugar una serie de lluvias fuera de temporada que afectaron severamente la cosecha de maíz.

En este maíz, pobremente almacenado en muchos casos, se encontró posteriormente la presencia de aflatoxinas en un rango entre 6.250 a 15.600 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron a las pocas semanas de la cosecha y hasta algunos perros de las aldeas murieron con los mismos síntomas que los humanos. Se estimó que la ingesta de aflatoxina B₁ pudo ser como mínimo de 55 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal durante un número indeterminado de días. En un estudio de seguimiento llevado a cabo diez años más tarde, pudo comprobarse la total recuperación de los supervivientes no detectándose ningún tipo de secuelas.

Estos incidentes no deben ser considerados como cuestiones de un pasado ya superado, así todavía es objeto de estudio el reciente incidente de aflatoxicosis que ha afectado a los distritos de Makueni y Kitui en Kenia entre enero y julio de 2004. En esta ocasión, se produjeron 125 fallecimientos de un total de 317 casos registrados, con lo que la tasa de mortalidad se sitúa en el 39%, admitiéndose que la magnitud del incidente debe ser mucho mayor debido a las dificultades de acceso y comunicación de casos entre las zonas rurales más apartadas y las instalaciones hospitalarias. De nuevo, parece que el origen de la intoxicación debe atribuirse al consumo de maíz enmohecido, en donde se llegaron a detectar niveles de aflatoxinas entre 20 y 8,000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

3.4.3.2. Toxicidad crónica

La intoxicación crónica, que es la forma más frecuente, se debe al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas y/o

meses. Los síntomas en animales no son muy específicos: reducción en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución de la producción de huevos y leche y mayor susceptibilidad frente a diversas enfermedades infecciosas. Este último síntoma se debe a los efectos inmunosupresores ocasionados por la reactividad de las aflatoxinas con las células T y por la disminución en la actividad fagocitaria de los macrófagos. En general, las aves son más sensibles a las aflatoxinas que los mamíferos. El orden de susceptibilidad en aves es: patos < pavos < pollos; y en mamíferos el orden es el siguiente: perros < cerdos < terneros < ovejas < ganado bovino. Una explicación de por qué es menos susceptible el último grupo reside en que las enzimas bacterianas presentes en el rumen tienen la capacidad de degradar a las aflatoxinas haciéndolas perder su toxicidad.

El comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECEA) evaluó las aflatoxinas, y en términos generales consideró que el riesgo de intoxicación aguda es entre moderado y bajo. Pero el riesgo se incrementa, según la clasificación de la FAO, cuando se habla de efectos crónicos.

Los efectos tóxicos dependen de las dosis y de la duración de la ingestión, de la edad, la especie, el sexo y sobre todo del estado de nutrición de la persona o del animal. Varias investigaciones llevadas a cabo en China y países de África han mostrado una alta incidencia de hepatitis B donde la exposición en la dieta de aflatoxinas es prevalente. Investigaciones posteriores probaron que las aflatoxinas y el virus de la hepatitis B actúan sinérgicamente en la etiología del

cáncer de hígado. De hecho, Harris llegó a la evidencia de que existe una relación dependiente de la dosis entre la ingesta diaria de AFB₁ y la mutación en el codón p53 249 en los casos de carcinoma hepático.

Las principales aflatoxicosis producidas en humanos se han dado en países como la India, China, Tailandia y países de África. África, Asia y algunas regiones de Sudamérica son los lugares con las condiciones más favorables para la contaminación por aflatoxinas, por lo que la exposición humana también será alta. Esto es aún más importante cuando es la población infantil la que se encuentra también expuesta a esta contaminación, pues su desarrollo y crecimiento son críticos a esas edades y corren mayor riesgo de sufrir sus efectos negativos. En la población infantil se ha relacionado epidemiológicamente la presencia de aflatoxinas con determinados signos y síntomas clínicos, como son:

- La ictericia neonatal se puede ver favorecida por la presencia de estas micotoxinas y de un déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
- La encefalopatía y degeneración grasa visceral, similar al síndrome de Reye, y que cursa con degeneración grasa, palidez y aumento de tamaño del hígado y los riñones, unidos a edema cerebral grave, sobre todo en países de clima cálido y húmedo. Sin embargo la etiología de este síndrome es muy problemática y su relación directa con la AFB₁ no está suficientemente esclarecida, puesto que se especula que el

tratamiento con aspirina o fenotiacinas pudiera estar involucrado en la etiología de la enfermedad.

El kwashiorkor (palabra originaria de Ghana que significa (la enfermedad del niño desplazado) se trata de una malnutrición proteica que aparece cuando el niño es destetado debido a la llegada de un nuevo bebé y que además aparece tras una infección aguda, como el sarampión (que precede al kwashiorkor en un 25% de los casos) o una gastroenteritis situaciones en las que se incrementa la demanda de proteínas. Algunos autores proponen la teoría de que la causa del kwashiorkor podría estar en la ingestión de aflatoxinas sobre todo porque la prevalencia geográfica y estacional entre esta enfermedad y la presencia de estas micotoxinas es similar. Además se han encontrado aflatoxinas en el cerebro y los pulmones de niños fallecidos por kwashiorkor. Esto puede reflejar un desequilibrio metabólico o el fracaso de los mecanismos excretores en los niños con enfermedades como el sarampión, insuficiencia renal, estenosis pilórica o gastroenteritis, y a una menor depuración de las aflatoxinas en las neuropatías.

3.5 Ocratoxina⁽⁸⁾

3.5.1 Características del compuesto

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La ocratoxina A (OTA) es la más tóxica de ellas y está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina (Phe) mediante un enlace amida. Existen diversos compuestos análogos de la ocratoxina A (OTA), como la ocratoxina B (que difiere de la OTA en estructura por falta del átomo de cloro) y la ocratoxina C entre otras. La OTA α y la OTA β son productos de la hidrólisis de la ocratoxina A y B, respectivamente, y al no poseer la molécula de fenilalanina no son tóxicos.

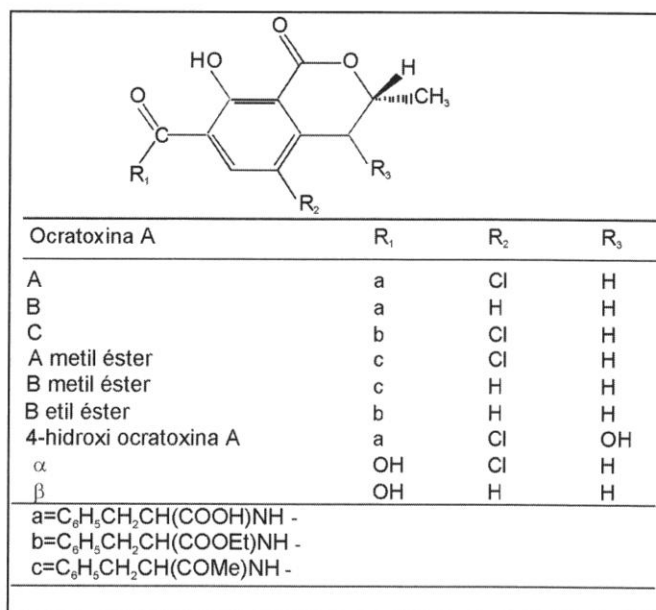


Fig N° 3 Estructura Química de las Ocratoxinas

La OTA es producida por dos especies de *Penicillium* (*P. verrucosum* y *P. nordicum*) y por algunos miembros del grupo *Aspergillus ochraceus*, así como algunas especies aisladas de *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. terreus*. El *P. verrucosum* está especialmente asociado con cereales almacenados y es muy común en países del norte de Europa y Canadá, por el contrario el *A. ochraceus* es un hongo de clima cálido y tropical. Es conocido que los valores mínimos de la actividad de agua para la producción de OTA por *A. ochraceus* y *P. verrucosum* están en el intervalo de 0.83 a 0.90. Y que a 24 °C el valor óptimo es de 0.95 a 0.99. Y para un valor óptimo de actividad de agua, el intervalo de temperatura para la producción de OTA por *A. ochraceus* es de 12 a 37 °C, mientras que para *P. verrucosum* es de 4 a 31 °C.

3.5.2. Toxicología

3.5.2.1. Toxicocinética

En todas las especies animales estudiadas la OTA se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y se elimina lentamente. Su biodisponibilidad en las especies de mamíferos es superior al 50%. La OTA presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, siendo la fracción de toxina libre en plasma <0.270 en todas las especies estudiadas, incluido el hombre. Se excreta en heces y orina; el principal metabolito es la OT- α que resulta de la hidrólisis del enlace amida, reacción catalizada por carboxipeptidasa y otras enzimas bacterianas. La OT- α experimenta una circulación entero-hepática que explica su presencia en orina.

3.5.2.2. Toxicidad aguda y toxicidad crónica

La toxicidad aguda de la ocratoxina A es relativamente baja y muestra variaciones interespecíficas. La DL_{50} por vía oral se encuentra en un intervalo entre aproximadamente 20 y 50 mg/kg en ratas y ratones, y hasta 0.2-1 mg/kg en perros, cerdos, y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de la intoxicación aguda consisten en hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática y en el tejido linfoide. Existe descrito únicamente un caso de intoxicación aguda en el ser humano. No obstante, lo que más preocupa respecto de la ocratoxina A son sus efectos crónicos; está demostrado que el consumo crónico de OTA produce una nefropatía intersticial en los animales de granja como pollos y cerdos, que puede causar importantes pérdidas económicas. A pesar de las diferencias en cuanto a la toxicocinética en diversas especies, las lesiones renales en cerdos, aves y roedores son muy similares.

En el ser humano se ha relacionado con la etiología de una nefropatía que es endémica en la zona de los Balcanes debido a que presenta una gran semejanza histopatológica con la que se produce en los animales y a que la exposición a OTA parece ser muy alta en esa zona geográfica comparada con otras. Es esta una enfermedad renal crónica y progresiva que representa actualmente el 17% de todas las enfermedades primarias diagnosticadas en la antigua Yugoslavia, se caracteriza por una neuropatía túbulo-intersticial

progresiva, que deriva en una atrofia tubular y fibrosis periglomerular, entre otros síntomas. Esta enfermedad se acompaña a veces de tumores malignos del tracto urinario superior que resultan muy agresivos. Algunos estudios indican una incidencia ligeramente más elevada de esta enfermedad en las mujeres. Si bien la hipótesis no está comprobada, algunos estudios realizados en Francia, Túnez y Egipto indican una relación entre la ingesta de OTA a través de la dieta y el desarrollo de tumores renales y uroteliales.

La OTA es también teratogénica, hepatotóxica, neurotóxica e inmunotóxica, la ocratoxina A está clasificada como posible carcinógeno humano clase 2B ya que produce tumores renales en animales de experimentación; en cuanto a sus efectos genotóxicos, aunque los estudios de mutagenicidad con bacterias eran negativos, algunos autores, utilizando la técnica de post-marcaje con ^{32}P , observaron que esta micotoxina incrementaba la formación de aductos en el ADN de manera dosis dependiente, tanto in vitro como in vivo. Además, la formación de aductos estaba correlacionada con la aparición de tumores. Sin embargo, en otros trabajos recientes utilizando ocratoxina A marcada con ^3H , no se han encontrado evidencias experimentales de que esta o alguno de sus metabolitos dieran lugar a aductos en el ADN; no obstante, se han presentado nuevos datos que apoyan la idea de que el radical fenoxilo de la ocratoxina A daría lugar a la formación de aductos. Por lo tanto, no está claro si la OTA reacciona directamente con el ADN o su actividad genotóxica se deriva de un efecto citotóxico que genera especies reactivas capaces de lesionar el ADN.

3.5.2.3. Mecanismos de toxicidad

En cuanto a los mecanismos de toxicidad, debido a la analogía estructural con el aminoácido fenilalanina, la toxina inhibe de manera competitiva la RNA transferasa (tRNA) fenilalanina (Phe) sintetasa (Phe-tRNA sintetasa) y, como consecuencia de ello, se interrumpe la síntesis de proteínas. A pesar de que la afinidad de la OTA por la Phe-tRNA sintetasa es mucho menor que la que presenta la propia Phe, la OTA es probablemente muy efectiva cuando se acumula en las células, ya que la concentración intracelular de Phe es pequeña. Por otra parte, los efectos genotóxicos y carcinogénicos, que son los que más preocupan desde el punto de vista de la salud humana, se piensa que son consecuencia de la capacidad de la OTA para producir aductos y roturas sencillas en el ADN directamente, o indirectamente por la generación de especies reactivas. El papel que la bioactivación juega en la aparición de metabolitos con efecto genotóxico y carcinogénico no está resuelto ya que, si bien algunos autores han observado efectos genotóxicos en sistemas celulares en presencia de ciertas isoformas del citocromo P450 (CYP450), otros en cambio sugieren que la OTA es escasamente metabolizada por CYP 450.

3.6 Vomitoxina (DON)⁽⁸⁾

3.6.1 Características del compuesto

En la década del 50 el akababi o envenenamiento fúngico rojo (Red mold poisoning) se registró en algunas áreas rurales de Japón y en el sur de Corea,

permitiendo el inicio de la investigación sobre la causa de la enfermedad. La micotoxina responsable, deoxinivalenol (DON), se aisló por primera vez por Morooka en 1973 denominándola toxina roja (red toxin). Yoshizawa, en 1973, dilucidó la estructura química y lo red denominó 4-deoxinivalenol; en el mismo año, Vesonder et al. aislaron el mismo compuesto como una sustancia emética presente en el maíz contaminado con *F. graminearum*. Esta sustancia había causado rechazo del alimento y vómitos en cerdos, por lo que la denominó vomitoxina.

Entre los años 1980 y 1982, en el noreste de EE UU y en el este de Canadá se detectó trigo altamente contaminado con DON, este hallazgo llamó la atención de los investigadores hacia las micotoxinas de las especies del género *Fusarium*. En la misma década se detectó un brote importante en el Valle de Cachemira (India) por el consumo de trigo contaminado con esta micotoxina, y realizando un estudio retrospectivo se observó que al menos 7.818 personas habían consumido este cereal contaminado, sin que haya sido encontrada documentación de fallecimientos.

Los tricotecenos son una familia de sesquiterpenoides, la mayoría posee un núcleo tetra cíclico con doble ligadura en el C-9,10 y un anillo epoxi en C-12,13. Los tricotecenos están divididos en cuatro grupos (A-D) de acuerdo a los grupos sustituyentes funcionales. El tipo B, al cual pertenece DON, tiene una función carbonilo en la posición C-8. Además, posee tres grupos OH y un grupo ceto insaturado en posición α , β . Por lo tanto, el nombre químico es 12,13-epoxi-

3 α ,7 β ,15-trihidroxi tricotec-9-ene-8-ona. Su peso molecular es de 296.3 g mol⁻¹, y corresponde a la fórmula molecular C₁₅H₂₀O₆. El DON cristaliza como agujas sin color con un punto de fusión de 151-153 °C, su rotación específica está determinada como $[\alpha]_D^{20}$: +6.35. El espectro UV no es muy característico, aunque la molécula posee una absorción a longitud UV de 254 nm (onda corta) debido a la función ceto insaturada en posición α , β .

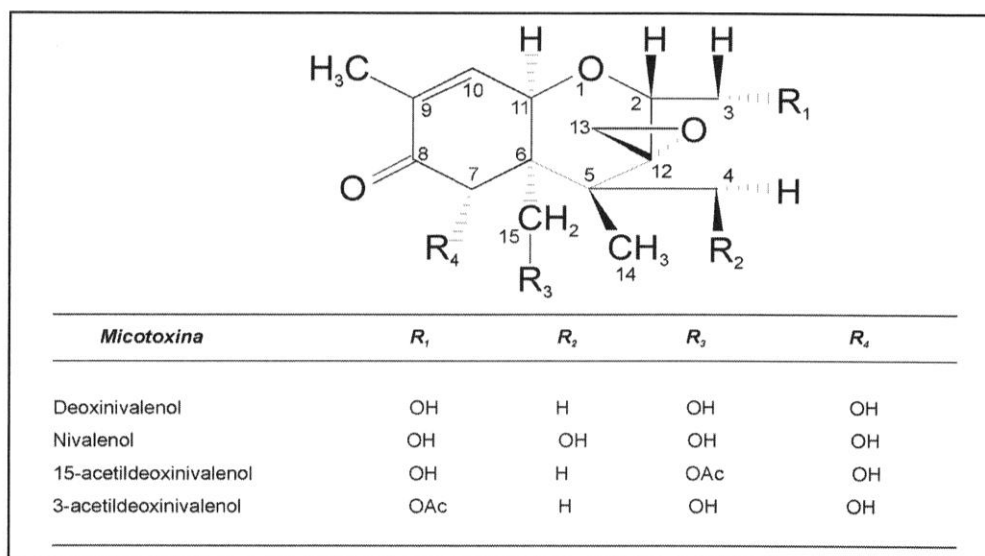


Fig. N^o. 4 Estructura química de Vomitoxinas

El DON es relativamente soluble en agua y altamente soluble en solventes polares acuosos como metanol, acetonitrilo y acetato de etilo. En forma de polvo (cristales) o en solución es estable al aire, a la luz o a ambos. Esta micotoxina es estable a 121 °C, por 15 min a 1 atm (autoclavado) y moderadamente estable a 180 °C; se logra una completa inactivación a 370 °C por 10 min o a 205 °C por 30 min. Se mantiene estable bajo condiciones medianamente ácidas y la inactivación química del DON se logra con una

solución de hipoclorito de sodio al 3-5%. El DON es una micotoxina perteneciente a un grupo de micotoxinas sesquiterpenoides, con actividad citotóxica, fitotóxica y antifúngica, denominado tricotecenos e incluido dentro del grupo B, estando ampliamente distribuida en todo el mundo. Dentro de este grupo se encuentran otras micotoxinas como diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2 y nivalenol (NIV), que fueron las primeras sustancias en ser estudiadas debido a que son fuertemente tóxicas y provocaron cuadros graves de toxicidad aguda. Sin embargo, en la actualidad, la micotoxina más relevante del grupo es el DON ya que se encuentra naturalmente en elevadas concentraciones y/o como contaminante de una gran variedad de substratos en el mundo. Se ha detectado principalmente como contaminante de trigo, cebada, avena, centeno y maíz, que conforman las 2/3 partes de la producción mundial de cereales, y con menor frecuencia se encuentra contaminando arroz, sorgo y triticale. La presencia de DON está asociada con la especie micotoxigénica *Fusarium graminearum*, estado teleomórfico *Gibberella zea* en las áreas templadas y húmedas de cultivo (América del Norte, del Sur y China) y con, *F. culmorum*, en aquellas áreas donde prevalecen las condiciones ambientales frías (Finlandia, Francia, Polonia y Países Bajos). Las diferencias ecológicas podrían contribuir a la distribución de quimiotipos y por lo tanto a la caracterización regional de la contaminación de los granos. Estas especies son los agentes etiológicos de la enfermedad denominada “tizón de la espiga” o “fusariosis de la espiga de trigo”

(fusarium head blight, FHB) y de la "podredumbre de la espiga de maíz" (gibberella ear rot).

Existe una correlación directa entre la incidencia del FHB y la contaminación de trigo con DON. Asimismo, la presencia de esta enfermedad en los cultivos está fuertemente relacionada con la humedad existente durante el periodo de floración (anthesis) y con la duración del periodo de lluvias. La distribución geográfica de ambos agentes etiológicos depende de la temperatura: *F. graminearum* crece a una temperatura óptima de 25 °C y *F. culmorum* crece a una temperatura óptima de 21 °C.

3.6.2. Toxicología

3.6.2.1. Toxocinética

La absorción, distribución y eliminación del DON es rápida si es vía oral o parenteral, no existiendo evidencia de su acumulación en tejidos o su transmisión a los huevos o a la leche. El DON por una vía metabólica que involucra la pérdida de la función epoxi-O (de-epoxidación) da origen a un derivado denominado de-epoxi-deoxinivalenol. Este metabolito predomina en heces, orina y plasma de seres humanos y animales. También se ha detectado DON y/o sus metabolitos en carne, leche y huevos de animales de granja en niveles bajos. Por ejemplo, en cerdos se observó una rápida distribución en todos los tejidos después de una inyección intravenosa de DON equivalente a 1 mg/kg de peso corporal; en riñones e hígado se detectaron concentraciones de la micotoxina que correspondían con las encontradas en orina y bilis. La vida

media fue estimada en 3.9 horas aunque DON pudo ser detectado después de 24 horas de administrada la micotoxina. Se ha visto que la presencia de DON en la dieta de ratones altera la absorción intestinal de nutrientes como por ejemplo azúcares y minerales cuando se administra la toxina en bajas dosis y por tiempo prolongado (exposición subcrónica).

3.6.2.2. Toxicidad aguda y subaguda

El DON produce exclusivamente toxicidad aguda y no se acumula en el organismo, los valores de DL_{50} oral son de aproximadamente 78 a 46 mg/Kg de peso corporal en ratones. Los síntomas de toxicidad aguda y subaguda de DON se caracterizan principalmente por vómitos (en cerdos ratas y ratones), rechazo de la comida (Síndrome Anoréxico), pérdida de peso y diarreas.

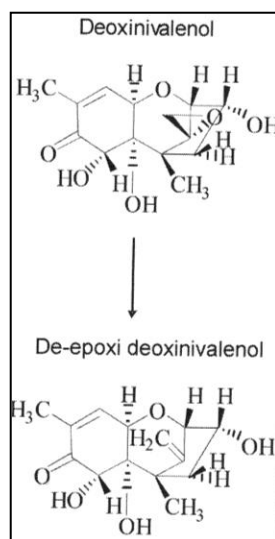


Fig N°. 5 Metabolismo de DON

En cerdos la dosis mínima de toxina que produce vómitos o emésis es de 0.05-0.2 mg/Kg de peso corporal, mientras que dosis de 1 – 2 mg/Kg provocan

anorexia. En ratas y ratones dosis orales de 0,05-1 mg/Kg de peso corporal provocan emésis y el grado de vaciamiento gástrico está relacionado directamente con la concentración. El rechazo total de comida se ha observado con dosis de 1 mg/Kg de peso corporal.

La intoxicación con altas concentraciones de DON puede producir necrosis en tejidos tales como los del tracto gastrointestinal, médula ósea y tejidos linfoides. La presencia de importantes micotoxicosis en humanos relacionadas con la contaminación de alimentos con DON, ha sido citada en Japón y en otras partes del mundo. En China, en 1984-1985 y en la India en 1987 se produjeron dos brotes de micotoxicosis en seres humanos relacionados con tricotecenos. El primero, con 463 casos, fue debido al consumo de productos elaborados a partir de maíz y trigo enmohecidos. Entre los 5 - 30 minutos después de la ingesta, los afectados presentaron los siguientes síntomas: náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, malestar general y dolores de cabeza. El DON fue detectado en un rango de 0.34 a 98.8 mg/Kg junto con Zearalenona en una concentración de 0.004 -0.587 mg/kg. También se vieron afectados animales de granja como cerdos y pollos. En el segundo brote, que tuvo lugar en el valle de Cachemira (India), como consecuencia del consumo de pan elaborado con harina de trigo enmohecido, el 43.37% de los individuos afectados sufrieron dolor abdominal, irritación de garganta, diarrea, rectorragia (sangre en las heces) y vómitos. El periodo de incubación fue de 15 a 60 minutos después del

consumo. Las micotoxinas involucradas en este brote fueron DON (0.35-8.38 mg/Kg), T-2 (0.55-0.8 mg/Kg).

3.6.2.3. Mecanismo de toxicidad

Los tricotecenos son las sustancias naturales más potentes conocidas que inhiben la síntesis de las proteínas. Los tejidos más afectados son las gónadas (división celular), los intestinos, la médula ósea y el tejido linfoide. Poseen toxicidad directa adjudicada a la presencia del grupo epoxi en su fórmula. En los estudios biológicos que se han realizado no se ha detectado que sean precursores de cáncer.

En general, el DON inhibe la síntesis del ADN y ARN y la síntesis de proteínas a nivel ribosómico. La micotoxina tiene un efecto hemolítico sobre los eritrocitos. En dosis agudas puede inducir vómitos (emésis) en cerdos mientras que en bajas concentraciones reduce el crecimiento y el consumo de alimento (anorexia). Ambos efectos, similares a los otros tricotecenos, pueden deberse a que afectan la actividad serotoninérgica en el sistema nervioso central o por la acción periférica sobre los receptores de serotonina. Se ha demostrado que el grupo B de tricotecenos produce daño físico en las membranas celulares provocando la lisis de los glóbulos rojos por efecto de exceso de micotoxina circulante y que el metabolismo de los tricotecenos se produce dentro de estas células. La cantidad de toxina para producir lisis depende de la especie animal, siendo los cerdos los más susceptibles. Los tricotecenos son reconocidos por inducir desórdenes hematológicos tales como neutropenia, trombopenia y

anemia aplásica en humanos y animales. El DON sólo produce tales efectos en dosis muy elevadas.

El DON altera el funcionamiento del sistema inmunológico tanto en animales como en seres humanos. Se ha demostrado que aumenta la susceptibilidad a patógenos facultativos como *Listeria*. Se comprobó en estudios experimentales con animales de laboratorio el aumento de Inmunoglobulina A (IgA), tanto sérica como la de las células mesangiales, que provocan hematuria. La enfermedad de Berger, que implica una desregulación de IgA en seres humanos, sólo se ha logrado reproducir en animales experimentales a través de la administración de DON, además, tiene la capacidad de alterar transitoriamente la expresión de citoquinas, las que son importantes para la regulación normal de muchas funciones inmunológicas.

El síndrome anoréxico en cerdos se produce por el efecto neurotóxico del DON. Con una dosis única de 0.25 mg/kg, por vía intravenosa, después de ocho días, se alteró la concentración de los neurotransmisores en el hipotálamo, en la corteza frontal y en el cerebelo. La presencia de DON incrementa significativamente la concentración de serotonina (102-180% más que el control) pero no produce cambios significativos en la concentración de noradrenalina y dopamina. En resumen el DON influye en el metabolismo de las aminas biogénicas en el cerebro y podrían existir diferencias significativas intra especies. Basado en datos de exposición humana versus emesis, los seres humanos son probablemente más sensibles al DON que los cerdos.

3.7 Toxina T-2⁽⁸⁾

3.7.1 Características del compuesto

Los hongos pertenecientes al género *Fusarium* son contaminantes frecuentes en las regiones frías y prevalente en cereales cultivados en las templadas de América, Europa y Asia. Las especies pertenecientes a este género, que también se encuentran como contaminantes frecuentes en los suelos, son capaces de producir micotoxinas con disposiciones químicas muy diferentes, entre ellas se encuentran un grupo de compuestos que no presentan nitrógeno en su composición y que están estructuralmente muy relacionados. A este grupo de micotoxinas se les denomina tricotecenos y reciben este nombre por poseer en su molécula el esqueleto tetracíclico, 12,13-epoxitricotec-9-eno. La historia de los tricotecenos se inicia, prácticamente, con la descripción de la enfermedad denominada ATA (Alimentary Toxic Aleukia), que causó numerosas muertes en la Unión Soviética en la década de 1940, afectando hasta el 10% de la población en algunas comarcas, siendo devastadora en el distrito de Orenburgo. Por ese entonces, la población, forzada por el hambre durante la Segunda Guerra Mundial, utilizó para elaborar el pan cereales abandonados en los campos sin cosechar; estos estaban contaminados por hongos del género *Fusarium*. A causa de la ingestión de este pan contaminado, muchas personas murieron y al principio se pensó que se debía a un agente infeccioso. Posteriormente, se comprobó que los extractos alcohólicos de los cultivos de *Fusarium* aislados de granos fúngicos podían reproducir muchos de los

síntomas de la ATA en animales de experimentación, incluyendo aquellos que afectaban a la piel, la garganta y el tracto gastrointestinal.

Después de veinte años de almacenamiento de estos granos contaminados, se identificaron las especies de *F. poae* y *F. sporotrichioides*, posteriormente se verificó la capacidad de producir tricotecenos, siendo la producción de toxina T-2 prevalente para ambas especies, seguidas por la toxina HT-2, neosolaniol y T-2 tetraol. Una lista definitiva de especies productoras de estas micotoxinas es muy difícil debido a los problemas de identificación. Las más conocidas son *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* y *F. acuminatum*. Las toxinas T-2 y HT-2 fueron aisladas por primera vez en cultivos de *F. tricinctum*. Sin embargo, Marasas et al. Reexaminaron esas cepas y las identificaron como *F. sporotrichioides*, estos autores, también revisaron otras cepas de *F. tricinctum* y de *F. poae*, señaladas como productoras de T-2 y HT-2, que resultaron ser *F. sporotrichioides*; además, se reclasificaron como *F. sporotrichioides* a cepas de *F. solani* que habían sido mencionadas como productoras de ambas toxinas. Al reexaminar cepas de *F. heterosporum* y *F. sambucinum* que habían sido mencionadas como productoras de esta micotoxina, concluyeron que eran cepas de *F. acuminatum*). Estos autores reidentificaron también en la sección Dicolor, una cepa de *F. culmorum*, productora de toxina HT-2, que resultó ser *F. graminearum*, al igual que una cepa que había sido identificada como *F. tricinctum* en Japón.

Una especie recientemente descrita es, *F. langsethiae*, que produce lesiones en la espiga de trigo similares a las causadas por *F. poae*, especie que sigue citándose como productor de toxina T-2 y HT-2.

Estos hongos comúnmente colonizan los granos y pueden crecer a temperaturas levemente superiores al punto de congelamiento, producen las toxinas T-2 y HT-2 generalmente en un rango de temperatura entre 7 a 25 °C. Estas micotoxinas pueden sintetizarse a mayores temperaturas, pero lo que ocurre en la naturaleza es que a bajas temperaturas no compiten con hongos de otros géneros.

Las toxinas T-2 y HT-2 presentan un anillo sesquiterpeno y pertenecen a los tricotecenos del grupo A por presentar en el C-8 un grupo diferente a carbonilo. La toxina T-2 posee un peso molecular de 466.57; fórmula molecular: $C_{24}H_{34}O_9$. La toxina T-2 (4 β ,15-diacetoxi-3 α -hidroxi-8 α -(3-metilbutiriloxi)-12,13-epoxitricotec-9-eno; 12,13-epoxitricotec-9-eno-3,4,8,15-tetrol-4,15-diacetato-8-isovalerato) se la ha denominado también como T2 fusarium toxina, insariotoxina; T2 toxina; T-2 toxina o T-2 tricoteceno, es, junto al deoxinivalenol (DON), uno de los más importantes tricotecenos encontrados como contaminante natural en productos agrícolas.

3.7.2. Toxicología

Los efectos más destacados de la toxina T-2, al igual que los de la mayoría de los tricotecenos, en el entorno bioquímico y celular son:

- Una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas por que se unen a los ribosomas.
- El efecto inhibitorio de la síntesis de ARN y ADN.
- El efecto tóxico sobre la membrana de las células.
- La inducción de apoptosis particularmente en tejidos linfáticos y hematopoyéticos.

La toxina T-2 se absorbe y metaboliza rápidamente después de la ingestión en todas las especies animales estudiadas y en el hombre. Se distribuye en el organismo sin acumularse en ningún órgano específico. La toxina T-2 tiene una alta toxicidad aguda, con valores de DL_{50} para ingesta oral en roedores que se encuentran en el rango de 5-10 mg/Kg de peso corporal. La ingesta de estas toxinas produce, entre otros efectos, lesiones orales y lenguas negras en aves (por la necrosis de tejidos), disminución en el consumo de alimentos, disminución en la ganancia de peso y hemorragias intestinales. En las aves la toxina T-2, además de lo mencionado, se puede observar una disminución en la producción de huevos y deficiencias en la calidad de la cáscara con una significativa cantidad de huevos blandos.

La toxina T-2 es metabolizada en el rumen a HT-2 y acetyl HT-2. Estos derivados parecen ser menos tóxicos que la T-2, pero son aún potentes micotoxinas. Residuos de T-2 y sus derivados han sido encontrados en leche vacuna, pero tienen una baja tasa de transferencia del alimento a la leche (del 0.05 al 2% de

las toxinas ingeridas). El efecto más importante de la toxina T-2 (así como de la mayoría los tricotecenos) es su actividad inmunosupresora, demostrada claramente en animales de experimentación.

Como la micotoxina T-2 se metaboliza rápidamente a HT-2 y es el mayor metabolito, se considera razonable evaluar el riesgo de estas toxinas conjuntamente. En la reunión del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint FAO/WHO Expert Comité on Food Additives, JECFA), se decidió establecer 0.06 µg/Kg/peso corporal/día como la ingesta diaria admisible de estas micotoxinas como un grupo.

La ATA, primer episodio epidemiológico registrado en relación con estas micotoxinas, ha sido descrita como una enfermedad que se desarrolla en cuatro fases:

1. La primera es una sensación de quemazón en boca y faringe, que comienza pocas horas después del consumo de granos tóxicos; esta sensación sigue por el esófago hasta el estómago. De uno a tres días después del consumo, se desarrolla una gastroenteritis aguda acompañada de diarrea, náuseas y vómitos. La gastroenteritis cesa tras aproximadamente nueve días.
2. La segunda fase se produce cuando la persona libre de gastroenteritis entra en esta fase y puede estar sin síntomas de dos semanas a dos meses, se caracteriza por la destrucción progresiva de la médula ósea, originando una falta de leucocitos en sangre.

3. El tercer período dura entre cinco y veinte días y los síntomas reflejan una total atrofia de la médula ósea, y por la inmunosupresión consecuente se produce sepsis y temperaturas de 38-40 °C. Aparecen hemorragias locales subcutáneas, seguidas de necrosis en piel y músculos.

4. El cuadro finaliza generalmente con una neumonía bronquial, que puede ocasionar hemorragias en los pulmones y finalmente se produce la muerte.

Algunos síntomas de ATA se reprodujeron en gatos cuando se les administró la toxina T-2 por vía oral. Se ha confirmado también que esta toxina fue el agente causal de brotes de enfermedad hemorrágica en animales y está relacionada con la formación de lesiones bucales y efectos neurotóxicos en aves de corral.

3.8 Método analítico para la cuantificación de micotoxinas

3.8.1 Método de ELISA⁽¹¹⁾

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- Anticuerpos marcados:
 - ELISA Directo
 - ELISA Indirecto
 - ELISA sándwich
 - Doble (DAS)
 - Heterólogo (HADAS)
- Antígeno marcado
 - ELISA competitivo

3.8.1.1 ELISA Directo⁽¹¹⁾

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

3.8.1.2 ELISA Indirecto⁽¹¹⁾

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas y cada una de las etapas.

Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras y necesitar una elevada repetibilidad de resultados.



Fig. N°. 6 Método de Elisa Indirecto



Fig. N°. 7 Método de Elisa Directo

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio

Experimental: Las muestras de Maíz recolectadas se analizaron en el laboratorio utilizando métodos analíticos y comparando los resultados con los valores recomendados vigentes.

Transversal: Interesó conocer la concentración de los contaminantes en el Maíz durante el año 2010. Además fue un trabajo comparativo y conclusivo ya que los resultados obtenidos del estudio de cada una de las muestras fueron comparados entre sí y de las diferencias surgidas entre los datos se desarrollaron las conclusiones respectivas.

4.2 Metodología

- Investigación bibliográfica

Realizada a través de consultas en las siguientes bibliotecas:

- Benjamín Oroscó, Facultad de Química y Farmacia Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central Universidad de El Salvador.
- Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.
- Internet

- Investigación de Campo

- **Universo:** Maíz comercializado para consumo humano en los mercados de San Salvador

- **Muestra:** Muestras de granos de Maíz de 200 gramos cada una comercializadas en los mercados Central de San Salvador, Mejicanos y San Miguelito.

- **Muestreo:** Se recolectaron granos de maíz comercializados para el consumo humano, en las condiciones en que los mismos son distribuidos en el mercado, para emplear el análisis y cuantificación de las micotoxinas Aflatoxina, Ocratoxina, T-2 toxina y vomitoxina, el muestreo fue dirigido y puntual en los siguientes mercados:

- Central de San Salvador
- Mejicanos
- San Miguelito

El tipo de muestreo aplicado para la toma de las muestras fue aleatorio simple, este se realizó en las zonas especificadas previamente, donde se verificó el número de establecimientos que se dedican a la comercialización de granos de maíz por medio de una visita de campo donde se observó y se determinó el total de establecimientos a muestrear, en total se identificaron dieciséis establecimientos en donde se comercializaban granos de maíz, haciendo un total de dieciséis muestras, obteniendo las muestras dependiendo de la cantidad de establecimientos que se encontraron por mercado, tomando una muestra por establecimiento asignado. Cada muestra tuvo un peso de 200 gramos.

Tabla N° 1: Toma de Muestra ´por mercado según establecimientos observados

MERCADO	ESTABLECIMIENTOS DE VENTAS DE MAIZ	ESTABLECIMIENTOS A MUESTREAR
Central	8	8
Mejicanos	4	4
San Miguelito	4	4

4.3 Parte Experimental:

4.3.1 Toma de Muestra:

Las muestras consistentes en granos de Maíz se tomaron aplicando el Muestreo Aleatorio, en este muestreo, que es simple y al azar, todos los miembros de una población delimitada, tuvieron las mismas o por lo menos una característica para ser incluidos en la muestra, es decir, de ser seleccionados.

Las muestras fueron obtenidas en las mismas condiciones que se comercializan, es decir que fueron despachadas por el comerciante encargado y se identificaron con la fecha y el lugar donde fueron tomadas. Dependiendo del número de establecimientos existentes por mercado así fue el número de muestras del mismo.⁽¹⁴⁾ Una vez recibida la muestra, se mezcló uniformemente y se tomó del centro 50 gramos; se identificó con nombre, lugar de procedencia, tipo de muestra y micotoxinas a ser analizadas.

4.3.2. Cuantificación de Aflatoxina por el método de Inmunoensayo

(ELISA)⁽⁴⁾

Límite de detección del Kit Idexx para Aflatoxinas: 1.4 ppb

1. Tomar 50 gramos de muestra y moler finamente.
2. Pesar del total de 50 gramos de muestra, 5 gramos de la misma y colocar en un frasco para muestra
3. Agregar 25 mL de metanol al 70%
4. Agitar durante 3 minutos
5. Filtrar con papel filtro # 1
6. Ambientar los reactivos a temperatura de 18-30 °C
7. Tomar un pocito marcado con rojo para cada muestra y 4 para los estándares (0, 5, 15 y 50 ppb [Partes Por Billón])
8. Remover igual cantidad de pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
9. Guardar el resto de pocitos a no ser utilizados

10. Mezclar cada bote con reactivo antes de usar
11. Colocar 100 μ L de conjugado en los pocitos marcados con rojo
12. Agregar 100 μ L de muestra y estándares a los pocitos marcados con rojo
13. Mezclar con pipeta multicanal 3 veces
14. Transferir 100 μ L de la mezcla a los pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
15. Mezclar por 10 a 20 segundos con rotación circular
16. Incubar durante 2 minutos a temperatura entre 18-30 °C
17. Descartar los pocitos marcados con rojo
18. Pasado el tiempo de incubación descartar el contenido de los pocitos con anticuerpo
19. Lavar con agua destilada 5 veces
20. Secar completamente golpeando firmemente la gradilla plástica sobre un material absorbente (papel toalla)
21. Agregar 100 μ L de sustrato, mezclar durante 10 a 20 segundos e incubar durante 3 minutos
22. Agregar 100 μ L de solución stop y mezclar
23. Leer usando un espectrofotómetro conteniendo un filtro de 650 nanómetros dentro de los siguientes 20 minutos.
24. Calcular el resultado de la lectura con el software Veratox Neogen Versión 2.0.15, e imprimir.

4.3.3. Cuantificación de Ocratoxinas por el método de Inmunoensayo (ELISA)⁽⁴⁾

Límite de detección del Kit Idexx para Ocratoxinas: 1 ppb

1. Pesar del total de 50 gramos de muestra, 10 gramos de la misma y colocar en un frasco para muestra
2. Agregar 40 mL de metanol al 50%
3. Agitar durante 5 minutos

4. Filtrar con papel filtro # 1
5. Ambientar los reactivos a temperatura de 18-30 °C
6. Tomar un pocito marcado con rojo para cada muestra y 5 para los estándares (0, 2, 5, 10 y 25 ppb [Partes Por Billón])
7. Remover igual cantidad de pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
8. Guardar el resto de pocitos a no ser utilizados
9. Mezclar cada bote con reactivo antes de usar
10. Colocar 100 µL de conjugado en los pocitos marcados con rojo
11. Agregar 100 µL de muestra y estándares a los pocitos marcados con rojo
12. Mezclar con pipeta multicanal 3 veces
13. Transferir 100 µL de la mezcla a los pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
14. Mezclar por 10 a 20 segundos con rotación circular
15. Incubar durante 10 minutos a temperatura entre 18-30 °C
16. Descartar los pocitos marcados con rojo
17. Pasado el tiempo de incubación descartar el contenido de los pocitos con anticuerpo
18. Lavar con agua destilada 5 veces
19. Secar completamente golpeando firmemente la gradilla plástica sobre un material absorbente (papel toalla)
20. Agregar 100 µL de sustrato, mezclar durante 10 a 20 segundos e incubar durante 10 minutos
21. Agregar 100 µL de solución stop y mezclar
22. Leer usando un espectrofotómetro con filtro de 650 nanómetros dentro de los siguientes 20 minutos
23. Calcular el resultado de la lectura con el software Veratox Neogen Versión 2.0.15, e imprimir.

4.3.4. Cuantificación de Vomitoxinas (DON) por el método de inmuno ensayo (ELISA)⁽⁴⁾

Límite de detección del Kit Idexx para Vomitoxina: 0.1 ppm

1. Pesar del total de 50 gramos de muestra, 10 gramos de la misma y colocar en un frasco para muestra
2. Agregar 100 mL de agua destilada
3. Agitar durante 3 minutos
4. Filtrar con papel filtro # 1
5. Ambientar los reactivos a temperatura de 18-30 °C
6. Tomar un pocito marcado con rojo para cada muestra y 5 para los estándares (0, 0.25, 0.5, 1 y 3 ppm [Partes Por Millón])
7. Remover igual cantidad de pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
8. Guardar el resto de pocitos a no ser utilizados
9. Mezclar cada bote con reactivo antes de usar
10. Colocar 100 µL de conjugado en los pocitos marcados con rojo
11. Agregar 100 µL de muestra y estándares a los pocitos marcados con rojo
12. Mezclar con pipeta multicanal 3 veces
13. Transferir 100 µL de la mezcla a los pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
14. Mezclar por 10 a 20 segundos con rotación circular
15. Incubar durante 5 minutos a temperatura entre 18-30 °C
16. Descartar los pocitos marcados con rojo
17. Pasado el tiempo de incubación descartar el contenido de los pocitos con Anticuerpo.
18. Lavar con agua destilada 5 veces
19. Secar completamente golpeando firmemente la gradilla plástica sobre un material absorbente (papel toalla)
20. Agregar 100 µL de sustrato, mezclar durante 10 a 20 segundos e incubar durante 5 minutos

21. Agregar 100 μ L de solución stop y mezclar
22. Leer usando espectrofotómetro con filtro de 650 nanómetros dentro de los siguientes 20 minutos
23. Calcular el resultado de la lectura con el software Veratox Neogen Versión 2.0.15, e imprimir.

4.3.5. Cuantificación de T-2 toxinas por método de Inmunoensayo (ELISA)⁽⁴⁾

Límite de detección del Kit Idexx para T-2 toxinas: 10 ppb

1. Pesar del total de 50 gramos de muestra, 5 gramos de la misma y colocar en un frasco para muestra
2. Agregar 25 mL de metanol al 50%
3. Agitar durante 3 minutos
4. Filtrar con papel filtro # 1
5. Ambientar los reactivos a temperatura de 18-30 °C
6. Tomar un pocito marcado con rojo para cada muestra y 5 para los estándares (0, 25, 50, 100 y 250 ppb [Partes Por Billón])
7. Remover igual cantidad de pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
8. Guardar el resto de pocitos a no ser utilizados
9. Mezclar cada bote con reactivo antes de usar
10. Colocar 100 μ L de conjugado en los pocitos marcados con rojo
11. Agregar 100 μ L de muestra y estándares a los pocitos marcados con rojo
12. Mezclar con pipeta multicanal 3 veces
13. Transferir 100 μ L de la mezcla a los pocitos con anticuerpo (marcados de azul)
14. Mezclar por 10 a 20 segundos con rotación
15. Incubar durante 5 minutos a temperatura entre 18-30 °C
16. Descartar los pocitos marcados con rojo
17. Pasado el tiempo de incubación descartar el contenido de los pocitos con

anticuerpo

18. Lavar con agua destilada 5 veces
19. Secar completamente golpeando firmemente la gradilla plástica sobre un material absorbente (papel toalla)
20. Agregar 100 μ L de sustrato, mezclar durante 10 a 20 segundos e incubar durante 5 minutos
21. Agregar 100 μ L de solución stop y mezclar
22. Leer usando un espectrofotómetro con filtro de 650 nanómetros dentro de los siguientes 20 minutos
23. Calcular el resultado de la lectura con el software Veratox Neogen Versión 2.0.15, e imprimir.

Una vez realizadas las lecturas de densidad óptica de las muestras y los respectivos estándares, las densidades ópticas se introducen en el software, el cual calcula el logaritmo de la desviación óptica de las soluciones patrón y traza la curva de desviación estándar, luego se interpolan sobre esta curva los logaritmos de la densidad óptica de cada muestra para calcular la concentración de micotoxinas en la misma.

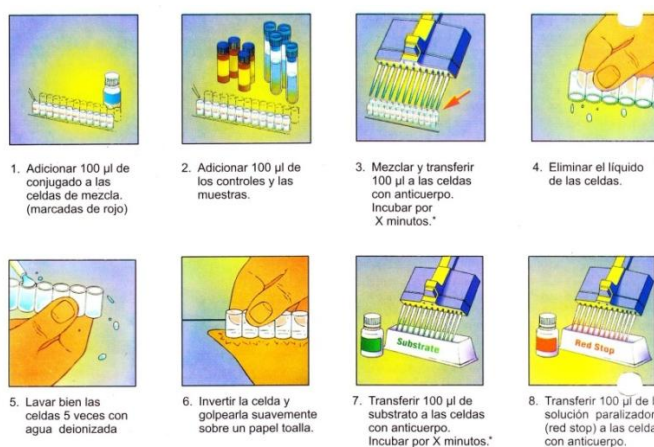


Fig. N° 8 Procedimiento para la cuantificación de micotoxinas

CAPITULO V

DISCUSION E INTERPRETACION DE RESULTADOS

5.0 DISCUSION E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Tabla N°2: Contenido de Aflatoxina en muestras de maíz analizadas por mercado

Mercado	Código de Muestra	Lectura 1 ppb	Lectura 2 ppb	Promedio ppb	Nivel máximo de tolerancia FAO/FDA ppb
Central	mc1	0.1	0.1	0.10	20
	mc2	0.3	0.3	0.30	
	mc3	0.1	0.1	0.10	
	mc4	0.4	0.4	0.40	
	mc5	2.2	2.4	2.30	
	mc6	3.2	3.1	3.15	
	mc7	61.9	64	62.95	
	mc8	1.6	1.6	1.60	
San Miguelito	msm1	1.0	0.9	0.95	
	msm2	0.2	0.2	0.20	
	msm3	0.1	0.1	0.10	
	msm4	0.0	0.2	0.10	
Mejicanos	mm1	0.4	0.3	0.35	
	mm2	0.2	0.3	0.25	
	mm3	0.3	0.4	0.35	
	mm4	0.4	0.5	0.45	

En La tabla N°2, se presentan las lecturas de cada muestra y su respectiva réplica, ambas lecturas se promediaron y se reflejan los resultados obtenidos de Aflatoxina en cada una de las muestras de maíz recolectadas de los mercados y observemos que la mayoría de las muestras analizadas se encuentran por debajo de los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA, a excepción de una muestra del mercado central codificada como mc7; la cual presenta una concentración promedio de 62.95 ppb, dicha muestra fue reanalizada obteniéndose los mismos resultados que en el primer análisis,

pudiendo deberse este resultado a la humedad que poseía dicha muestra desde su obtención, ya que la humedad excesiva en las muestras, además de favorecer la proliferación de hongos y por ende la formación de Aflatoxina y otras micotoxinas también propicia reacciones cruzadas indeseadas en el análisis lo que conlleva a un aumento en la concentración de aflatoxina cuantificada.

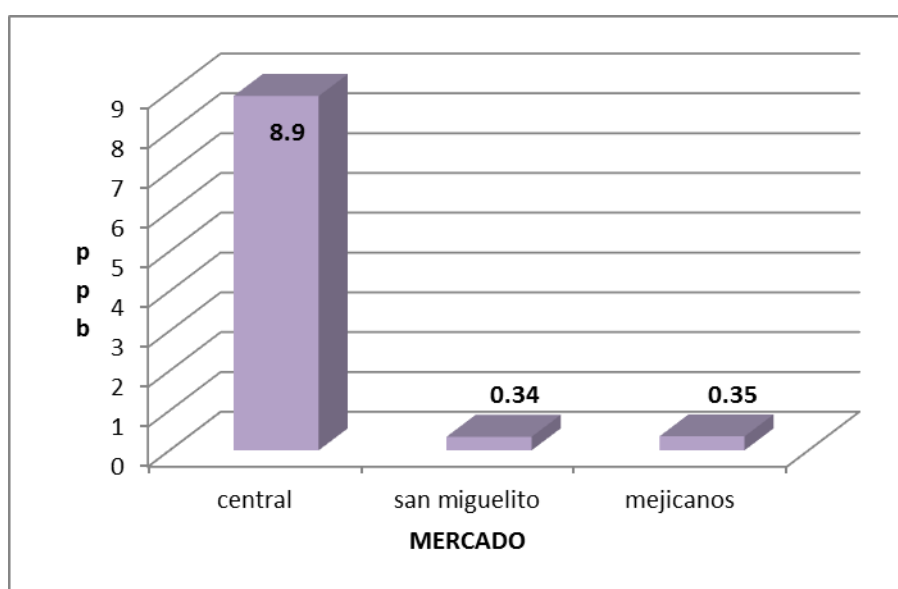


Fig. No. 9 Concentración promedio de Aflatoxina por Mercado

En la figura No. 9, se observa que las muestras de granos de maíz que se comercializan para el consumo humano, recolectadas en el mercado Central, presentan el mayor índice de Aflatoxinas (8.9 ppb), seguido del mercado de Mejicanos (0.35 ppb); siendo el mercado San Miguelito el que presenta el índice más bajo de este contaminante en las muestras (0.34 ppb). Debiéndose en gran medida el mayor promedio de la concentración de aflatoxina en las muestras del mercado central a la elevada concentración de esta toxina en una de las muestras (mc7).

Tabla No. 3: Contenido de Ocratoxina en muestras de maíz analizadas por cada mercado

Mercado	Código de Muestra	Lectura 1 ppb	Lectura 2 ppb	Promedio ppb	Nivel máximo de tolerancia FAO/FDA ppb
Central	mc1	0.10	0.20	0.15	10
	mc2	0.00	0.00	0.00	
	mc3	0.00	0.00	0.00	
	mc4	0.00	0.00	0.00	
	mc5	0.00	0.10	0.00	
	mc6	0.00	0.00	0.00	
	mc7	0.00	0.00	0.00	
	mc8	0.00	0.00	0.00	
San Miguelito	mms1	0.00	0.10	0.05	
	mms2	0.00	0.00	0.00	
	mms3	0.00	0.00	0.00	
	mms4	0.00	0.10	0.05	
Mejicanos	mm1	0.00	0.00	0.00	
	mm2	0.00	0.00	0.00	
	mm3	0.00	0.00	0.00	
	mm4	0.20	0.30	0.25	

En la tabla N°3, se muestran los resultados obtenidos de Ocratoxina para cada una de las muestras de granos de maíz obtenidas de los mercados en los que se comercializan, observando, que las muestras analizadas se encuentran por debajo de los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA para este contaminante (10 ppb), siendo el valor máximo obtenido de 0.25 ppb en una muestra extraída del mercado de Mejicanos.

Tabla N°4: Contenido de Vomitoxina (DON) en muestras analizadas por mercado

Mercado	Código de Muestra	Lectura 1 ppm	Lectura 2 ppm	Promedio ppm	Nivel máximo de tolerancia FAO/FDA ppm
Central	mc1	0.0	0.0	0.0	1.00
	mc2	0.0	0.0	0.0	
	mc3	0.0	0.0	0.0	
	mc4	0.1	0.1	0.1	
	mc5	0.0	0.0	0.0	
	mc6	0.0	0.0	0.0	
	mc7	0.0	0.0	0.0	
	mc8	0.0	0.0	0.0	
San Miguelito	mms1	0.0	0.0	0.0	
	mms2	0.0	0.0	0.0	
	mms3	0.0	0.0	0.0	
	mms4	0.0	0.0	0.0	
Mejicanos	mm1	0.0	0.0	0.0	
	mm2	0.0	0.0	0.0	
	mm3	0.0	0.0	0.0	
	mm4	0.1	0.1	0.1	

Se observa en la tabla No. 4 que la mayoría de las muestras presentan ausencia de vomitoxinas al momento de su análisis, del total de muestras analizadas, únicamente dos muestras presentan un valor de 0.1 ppm de vomitoxina, siendo este valor muy inferior al límite de tolerancia establecido por la FAO y el FDA.

Para estos resultados, de la concentración de Ocratoxina y DON no se elabora gráfico comparativo de los promedios de las concentraciones obtenidas ya que la cantidad de estas micotoxinas en las muestras es tan bajo que las únicas

muestras que presentan una concentración diferente a 0.0 ppm no son representativas para elaborar un grafico con ellas.

Tabla N° 5: Contenido de T-2 toxina en muestras analizadas por mercado

Mercado	Código de Muestra	Lectura 1 ppb	Lectura 2 ppb	Promedio ppb	Nivel máximo de tolerancia FAO/FDA ppb
Central	mc1	10.7	10.9	10.80	100
	mc2	18.7	18.4	18.55	
	mc3	15.8	15.7	15.75	
	mc4	25.3	25	25.15	
	mc5	19.2	19.4	19.30	
	mc6	17.9	17.9	17.90	
	mc7	12.9	13.2	13.05	
	mc8	21.3	21.2	21.25	
San Miguelito	msm1	15.5	15.7	15.60	
	msm2	16	16	16.00	
	msm3	20.4	20.6	20.50	
	msm4	20.5	20.5	20.50	
Mejicanos	mm1	22.7	22.8	22.75	
	mm2	24.9	25.2	25.05	
	mm3	20.9	20.9	20.90	
	mm4	20.8	21.1	20.95	

En La tabla N°5, se observan los resultados de T-2 toxina obtenidos en cada lectura de las muestras analizadas y sus respectivos promedios, de los cuales, ninguno sobrepasa los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA para dicho contaminante en granos de maíz para consumo humano; siendo el valor más alto obtenido en el análisis de 25.15 ppb en una muestra del mercado Central y el más bajo de 10.80 ppb del mismo mercado.

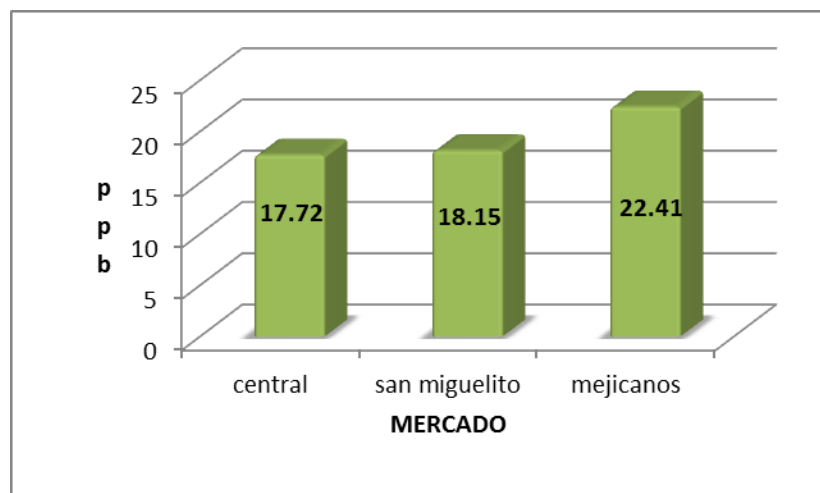


Fig. No. 10 Concentración promedio de T-2 toxina en muestras recolectadas de cada Mercado

Como se observa en la figura No. 10, las muestras que presentan una mayor concentración media de T-2 toxina fueron las obtenidas del mercado de Mejicanos con 22.41 ppb, mientras que en el Mercado Central y el mercado San Miguelito se obtuvieron concentraciones muy cercanas, siendo estas de 17.72 y 18.15 ppb respectivamente, pese a obtenerse altos valores de este contaminante en las muestras, ninguno sobrepasa los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA.

Tabla No. 6: Comparación de concentración promedio de micotoxinas por mercado

MICOTOXINA	MERCADO CENTRAL	MERCADO SAN MIGUELITO	MERCADO MEJICANOS	LIMITE DE TOLERANCIA FAO/FDA
AFLATOXINA	8.9 ppb	0.34 ppb	0.35 ppb	20 ppb
OCRATOXINA	0.02 ppb	0.02 ppb	0.06 ppb	10 ppb
T-2 TOXINA	17.72 ppb	18.15 ppb	22.41 ppb	100 ppb
VOMITOXINA (DON)	0.01 ppm	0.0 ppm	0.02 ppm	1 ppm

En la tabla número 6, se exponen los valores promedio de las concentraciones de cada micotoxina analizada, estos promedios fueron calculados para el grupo

de muestras recolectadas para cada punto de muestreo (mercado), a partir de las muestras de granos de maíz comercializados para consumo humano, a su vez, se hace una comparación con los valores límites establecidos por la FAO y el FDA para cada uno de estos contaminantes, así pues, en el caso de Aflatoxina, podemos observar que el límite de tolerancia es de 20 ppb y que el mayor promedio lo presentan las muestras del mercado central (8.9 ppb) y que ninguno de los puntos de muestreo (mercados) en los cuales se realizó el estudio y de los cuales se obtuvieron las muestras, sobrepasa los límites de tolerancia establecidos para cada una de las micotoxinas.

La formación de micotoxinas en los granos, se ve afectada o beneficiada en gran medida por factores que intervienen en el crecimiento del hongo productor; así, si durante la cosecha y el tiempo de recolección del grano, éste presenta un alto contenido de humedad y la humedad relativa del lugar de almacenamiento es excesiva, esto permitirá la proliferación de hongos productores de Aflatoxinas. Si en el lugar de almacenamiento de los granos, posterior a la cosecha, no existen condiciones adecuadas de ventilación, control de la humedad relativa del ambiente, y se presentan altas temperaturas en la zona de almacenamiento, esto favorecerá a la producción de otras micotoxinas tales como Ocratoxinas y DON. Si aunado a las malas condiciones de almacenamiento se observan en el ambiente roedores e insectos y la manipulación de los granos provoca fraccionamiento de los mismos, esto conducirá al desarrollo de hongos productores de T-2 toxina y su metabolito HT-2 toxina.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De las muestras recolectadas en los mercados estudiados, dos de ellas, presentaron condiciones de almacenamiento inadecuadas tales como excesiva humedad y temperatura lo cual podría favorecer que se encontraran niveles altos de aflatoxina en una de las muestras codificada (mc7), procedente del mercado central, sobrepasando los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA, el resto de las muestras, pese a contener aflatoxina, no sobrepasan los límites lo cual indica que fueron obtenidas en condiciones adecuadas de almacenamiento tales como humedad y temperatura.
2. No se encontró Ocratoxina y Vomitoxina en ninguna de las muestras, lo cual indica que las muestras recolectadas, no han permanecido durante un tiempo excesivo en almacenamiento y transporte de los granos de maíz en los mercados estudiados son aceptables, Se encontraron niveles de T-2 toxina en las muestras analizadas pero ninguna sobrepasa los límites de tolerancia establecidos por la FAO y el FDA esto debido a que existe una buena manipulación de los granos previo a su comercialización y durante la misma.
3. Las muestras estudiadas se consideran aptas para el consumo humano, ya que en su mayoría, se encontraron muy por debajo de los niveles de tolerancia establecidos para micotoxinas, a excepción de una muestra del mercado central, la cual por su grado de humedad presento un alto contenido de Aflatoxina. Pese a encontrarse concentraciones por debajo de los niveles, las muestras se consideran aptas para su consumo humano posterior a la realización de procesos de destoxificación tales

como la nixtamalización, la cocción o incluso la molienda de los granos ya que esto reduce considerablemente los niveles de micotoxinas presentes.

4. Al comparar las concentraciones promedio de cada micotoxina para las muestras recolectadas por cada mercado, con los parámetros establecidos como límites máximos de tolerancia por la FAO y el FDA, ninguno de los mercados en donde se realizó el estudio, presentan niveles de micotoxinas por encima de estos límites de tolerancia.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Eliminar cualquier tipo de interferencia existente tales como el manejo excesivo de las muestras y posibles contaminantes en los instrumentos a utilizar para obtención de la muestra, ya sea en la zona de muestreo como en la preparación, almacenamiento y procesamiento de las muestras para garantizar la veracidad e integridad de los resultados que se obtienen.
2. Realizar un monitoreo continuo del maíz para consumo humano comercializado en los mercados, ya que pese a que en este estudio las concentraciones de las micotoxinas en las muestras analizadas, no sobrepasan los niveles de tolerancia máximos establecidos por la FAO y el FDA, se deben desarrollar investigaciones futuras para establecer la prevalencia o no de micotoxinas en los granos y así evitar posibles intoxicaciones, a su vez, se deben revisar las condiciones en las cuales se almacenan y comercializan los granos para evitar posibles contaminaciones con hongos lo cual conllevará a una posterior producción de micotoxinas, ya que presentan efectos aditivos y pueden interactuar entre ellas aun a bajas concentraciones produciendo un efecto toxico para el consumidor.
3. Realizar el muestreo de granos de maíz comercializado para el consumo humano en los mercados, para su posterior análisis, en tres etapas del día para mayor homogeneidad de la muestra a ensayar.
4. Desarrollar proyectos o futuros trabajos enfocados a la concientización de los riesgos que conlleva la contaminación de granos con micotoxinas y la importancia de su monitoreo y así evitar intoxicaciones alimentarias

en la población; ya que estos contaminantes presentan un efecto aditivo y aun en bajas concentraciones el efecto de estas es sinérgico.

5. Elaborar en conjunto con todas las entidades competentes una normativa que regule y establezca los límites de tolerancia máximos permisibles para micotoxinas en granos de maíz y en otros alimentos para el consumo humano en nuestro país y a su vez que estas entidades y la población en general velen por el fiel cumplimiento de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carrillo L., Los Hongos de los alimentos y Forrajes, Capitulo 1, Mohos y Micotoxinas; <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/01htextomohos.pdf>
2. Carrillo L., Microbiologia Agrícola, Capítulo 6, Micotoxinas; 2003 <http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap6.pdf>
3. Cosenza H., Laboratorios Agrobiotec, Tegucigalpa, Honduras, 2002.
4. Cultek, Fundamentos y tipos de ELISA; soluciones ELISA <http://www.cultek.com>
5. FAO, OPS Boletín, 1990
6. Hesseltine, Boletín, 1979
7. Jaramillo M.; Interacciones Micotoxinas – Nutrientes, Hallazgos Relevantes; Venezuela. <http://www.micotoxinas.com.br/boletin30.pdf>
8. Neogen Corporation, Instructivos de realización y lectura de test de para micotoxinas, 2009.
9. Nelson, Toussoun and Cook, Primera edición, 1981.

10. Recinos M., Determinación y cuantificación de micotoxinas (Aflatoxinas, Ocratoxinas, T-2 y Vomitoxinas) en producto terminado para el consumo de aves de corral en El Salvador. San Salvador, 2004
11. Santos O.; Importancia y Efectos de la Aflatoxina en los seres humanos
<http://www.cepis.ops-oms.org/bvstox/e/fulltext/aflatoxi/aflatoxi.pdf>
12. Solis J., 1980; FAO and Nutrition, Boletín, 1972
13. Soriano J., Micotoxinas en alimentos, editorial Diaz de Santos, España 2007
14. Viñuela E., Consultora Internacional FAO; Aspectos Generales de las Micotoxinas, evaluación según el Codex Alimentarius
<http://www.rlc.fao.org/es/nutricion/codex/pdf/toxinas.pdf>
15. WHO, Boletín Científico, primera edición, 1981.
16. <http://www.fao.org/es/esn/mycoto/mycoto-s.htm>
17. <http://investigacion.uagro.mx/3coloquio/bio/19.pdf>.

GLOSARIO (1, 3, 4, 7, 16)

- **Apoptosis:** Muerte celular, autodestrucción de las células de forma programada, codificada genéticamente que puede ser inducida por diversos factores químicos y físicos.
- **Citotóxica:** Agente o sustancia que daña o mata las células o tejidos.
- **Encefalopatía:** Nombre dado a un conjunto de trastornos cerebrales que complican a veces ciertas infecciones, ciertas alteraciones del estado general o ciertas intoxicaciones y que corresponden con alteraciones anatómicas graves y variadas, tóxicas, anóxicas o vasomotoras en las que no predomina el elemento inflamatorio.
- **Estenosis:** Trastorno caracterizado por una constricción o estrechamiento de un orificio o conducto de una estructura corporal.
- **Hepatocitos:** Célula del hígado de forma poliédrica y núcleo voluminoso que se dispone alrededor de un vaso venoso. Sus funciones son la metabolización de las sustancias nutritivas, transformación de la glucosa en glucógeno (forma de reserva energética), fabricación de proteínas, degradación de las sustancias tóxicas presentes en la sangre y segregación de la bilis.
- **Ictericia:** se identifica como la coloración amarillenta de la piel y de las mucosas debido a un incremento de bilirrubina que se acumula en estos tejidos.

- **Macrófago:** Célula fagocitaria del sistema retículo endotelial, que se encuentra presente en diferentes órganos. Célula que procesa y presenta el antígeno al sistema inmune.
- **Necrosis:** Degeneración de un tejido por muerte de sus células.
- **Nefrosis:** Enfermedad degenerativa que afecta al epitelio de los túbulos renales. Suele tener un origen en intoxicaciones de arsénico, fósforo, tetracloruro de carbono, hongos venenosos, sulfamidas, etc.
- **Neuropatía:** Deterioro de la función de la fibra nerviosa. Enfermedad que afecta a uno (mononeuropatía) o a varios nervios (polineuropatía). Sus síntomas dependen de la localización y el tipo de nervio comprometido, pudiendo ser motores (debilidad muscular,) o sensitivos (disminución de la sensibilidad, dolor). Entre sus causas figuran ciertos tóxicos, trastornos metabólicos, infecciones, enfermedades degenerativas, etc.

ANEXOS

ANEXO N° 1

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS⁽⁸⁾

Material

- Test ó estuche de diagnostico para cada tipo de micotoxinas ha ser estudiada que contenga:
 - Pocitos con anticuerpo
 - Pocitos marcados de rojo para mezcla
 - Estándares
 - Frasco con Solución de Conjugado.
 - Frasco con Solución de Sustrato.
 - Frasco con Solución Stop.
- Espátula de acero inoxidable.
- Frascos de polietileno rígido de 100 mL

Equipo

- Balanzas analíticas con capacidad de 0-140 gramos
- Cronómetro
- Pipeta multicanal con capacidad de 50 a 300 μ L
- Espectrofotómetro para microplacas ELx800 (Rango de longitud de onda 400-750 nm)
- Balón volumétrico de 1000.0 mL
- Beaker de 50 y 100 mL

- Probetas de 10, 25 y 100 mL
- Tubos de Ensayo de 10 mL
- Embudos plásticos

Reactivos

- Metanol grado Reactivo
- Metanol al 50%
- Metanol al 70%
- Agua destilada

ANEXO N° 2

PREPARACIÓN DE REACTIVOS⁽⁸⁾

Solución de Metanol al 70%: medir exactamente 71.43 mL de metanol ACS (98% de pureza), colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL, aforara a volumen con agua destilada.

Solución de Metanol al 50%: medir exactamente 51.03 mL de metanol ACS (98% de pureza), colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL, aforara a volumen con agua destilada.

Cálculos:

Partiendo de metanol ACS con una pureza del 98%(C1) para preparar 100.0 mL (V2) de Metanol al 70% (C2):

$$C1V1=C2V2$$

$$V1=C2V2/C1$$

$$V1= (70%*100.0ml)/98%$$

$$V1= 71.428 \text{ mL}$$

Partiendo de metanol ACS con una pureza del 98%(C1) para preparar 100.0 mL (V2) de Metanol al 50% (C2):

$$C1V1=C2V2$$

$$V1=C2V2/C1$$

$$V1= (50%*100.0ml)/98%$$

$$V1= 51.03 \text{ mL}$$

ANEXO N° 3

Cuadro N° 7: Tiempos de extracción, conjugado y sustrato para cada micotoxina

MICOTOXINA	SOLVENTE	TIEMPO DE EXTRACCION	CONJUGADO	SUSTRATO
AFLATOXINA	METOH 70%	3 MIN	2 MIN	3 MIN
OCRATOXINA	METOH 50%	5 MIN	10 MIN	10 MIN
DON	AGUA DEST	3 MIN	5 MIN	5 MIN
T2 TOXINA	METOH 50%	3 MIN	5 MIN	5 MIN

ANEXO N°4



Fig. N°. 9 Extracción de Micotoxinas

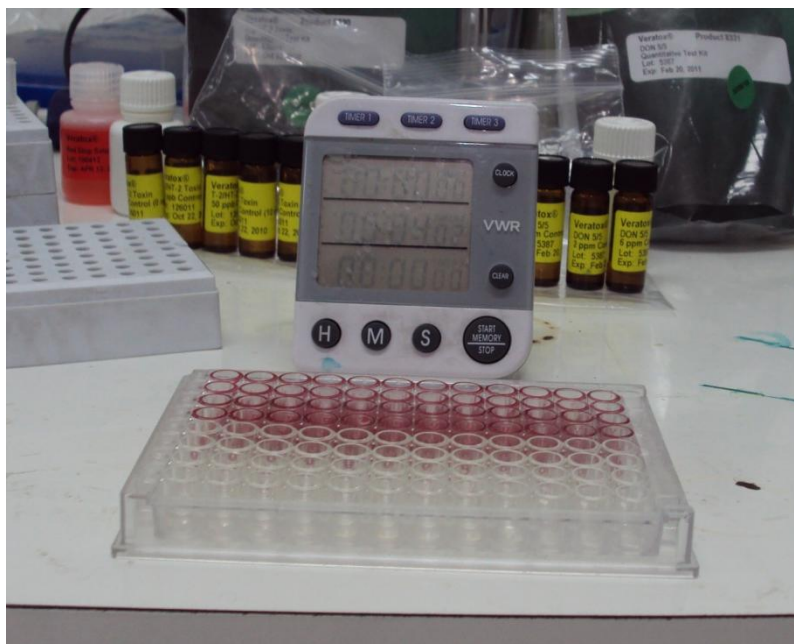


Fig. N°. 10 Incubación de muestras con conjugado

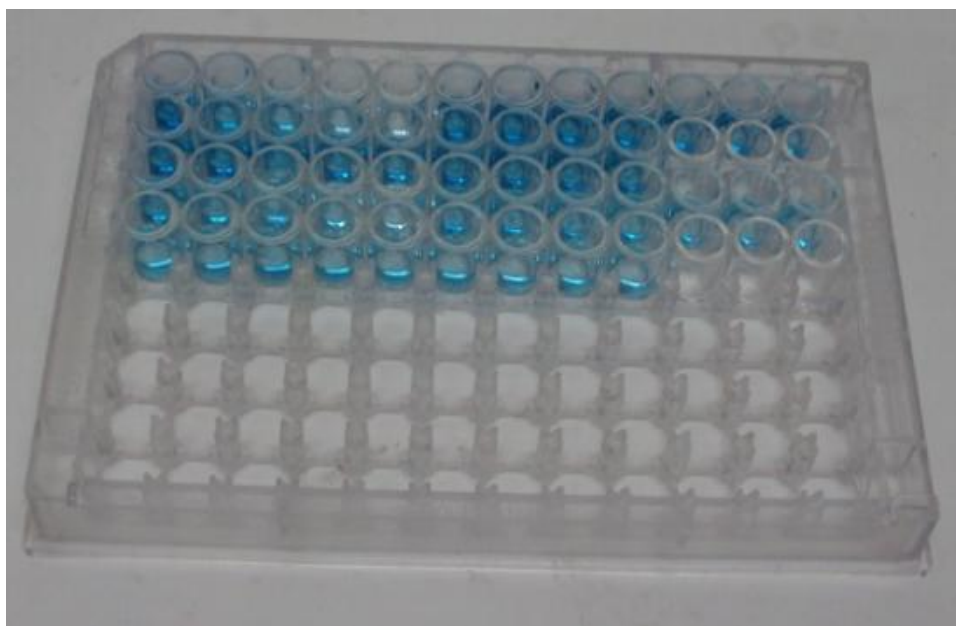


Fig N°. 11 Adición de sustrato a muestras



Fig N°. 12 Lavado de muestras después de período de incubación

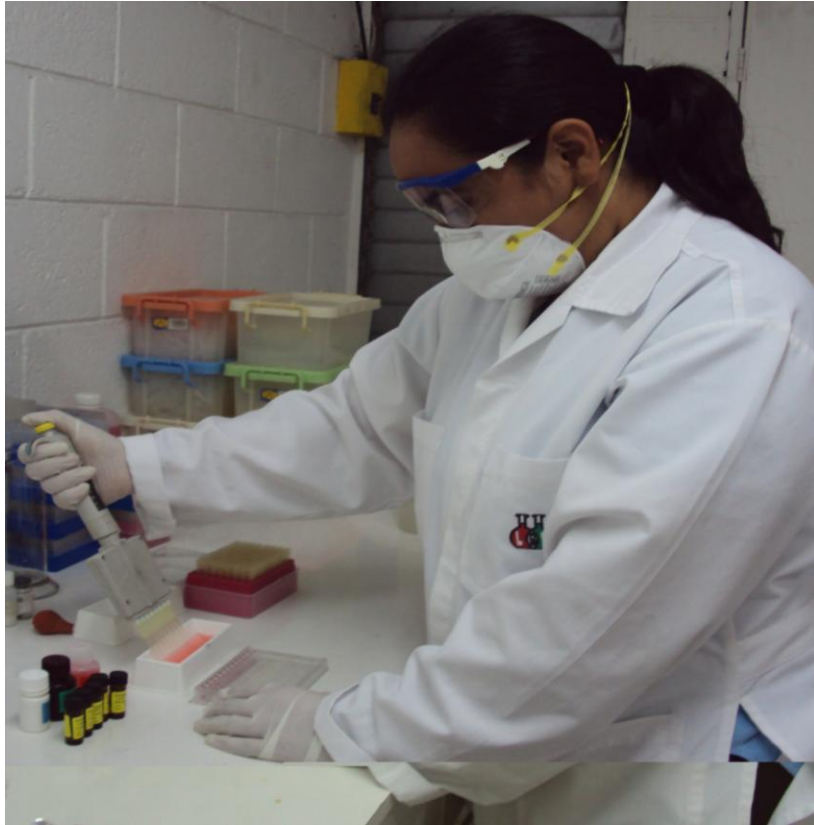


Fig N°. 13 Adición de solución Stop a muestras



Fig N°. 14 Lector de Placas Elisa para cuantificación de micotoxinas