



Maestría en Micología Médica

“Fumonisinias en muestras de harina de maíz comercializadas en Resistencia-Chaco: Comparación de un método comercial rápido de ensayo inmunoenzimático (ELISA) con el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de referencia para la detección y cuantificación”.

Maestrando

Lilian Edith Maldonado

Director

Sofía Chulze

Año 2020

Agradecimientos

Esta tesis es la conclusión de un extenso y profundo período de formación profesional en Micología Médica, area a la cual me aboqué de lleno estos últimos años de mi vida, investigando y aprendiendo del interesante y atrapante mundo de las micotoxinas.

Durante este complejo y fascinante recorrido, dos personas libraron mi trayectoria conduciéndome a la materialización de los logros. Me refiero a mi Directora de Tesis Dra. Sofía Chulze y a la Dra. Verónica Fumero, vaya a ellas mi sincero agradecimiento y especial reconocimiento por las horas de dedicación y esfuerzos brindados.

Fumonisin en muestras de harina de maíz comercializadas en Resistencia-

Chaco: Comparación de un método comercial rápido de ensayo inmunoenzimático (ELISA) con el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de referencia para la detección y cuantificación.

INDICE:

	pág
I) RESUMEN.....	2
II) INTRODUCCION.....	4
III) JUSTIFICACION.....	45
IV) HIPOTESIS.....	46
V) OBJETIVOS.....	47
VI) MATERIALES y METODOS.....	48
VII) RESULTADOS.....	55
VIII) DISCUSION.....	68
IX) CONCLUSIONES.....	72
X) BIBLIOGRAFIA.....	75

I)- RESÚMEN:

Las fumonisinas (FBs) son una familia de micotoxinas que contaminan al maíz y derivados. Son producidas principalmente por *Fusarium verticillioides* y están catalogadas por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) como posibles carcinógenos humanos en vista que estarían relacionadas con una alta incidencia del cáncer esofágico en ciertas regiones donde la dieta es a base de maíz. En este trabajo se propuso utilizar el método ELISA competitivo, (rápido, sencillo) "Agra Quant Total Fumonisin Test Kit (0.25-5.00 ppm)" provisto por Laboratorio Romer, como screening para la detección de FBs totales en harina de maíz y comparar los resultados con un método de referencia HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión). Se adquirieron aleatoriamente 30 muestras envasadas de harina de maíz y 30 sueltas en almacenes de barrio y supermercados minoristas de la ciudad de Resistencia, entre febrero y julio del año 2014. Todas fueron procesadas por ELISA y se seleccionaron 3 grupos de 5, con valores bajos, medios y altos respectivamente, las cuales fueron analizadas por HPLC en la Universidad Nacional de Río Cuarto, donde también se evaluaron los niveles de contaminación fúngica: 1) -Recuento general de hongos en medio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). 2) - Recuento específico de especies del género *Fusarium* en medio pentaclorobenceno (PNCB). El 30% del total de muestras procesadas por ELISA (60) mostraron contaminación con FBs con niveles entre no detectados y 1,00 ppm, el 20% entre 1,00 y 2,00 ppm, 24% entre 2,00 y 3,00 ppm y 26% mayores a 3,00 ppm. El promedio de FBs en el total de muestras: 2,67 ppm \pm S (desviación estándar). De 30 muestras sueltas analizadas por ELISA: 33,3% mostraron niveles entre no detectable y 1,00 ppm; 10% entre 1,00 y 2,00ppm , 23,3% entre 2,00 y 3,00 ppm y 33.3% superiores a 3.00 ppm. El promedio de FBs en las muestras sueltas: 2,94 ppm \pm S.

De 30 muestras **envasadas procesadas por ELISA**: 26,6% presentaron niveles entre no detectable y 1,00 ppm; 30 % entre 1,00 y 2,00 ppm; 23,3% entre 2,00 y 3,00 ppm y 20% mayores a 3,00 ppm. El promedio de FBs en las muestras envasadas: 2,40 ppm. El promedio de toxinas detectado por **el método HPLC**: FB1=5,32ppm, FB2= 1,41 ppm y FB3= 0,45 ppm . El promedio de FBs totales fue de 7,36ppm. Los dos métodos mostraron buena correlación ($R^2=0.82$). **Los perfiles de la microflora aislada incluyó:** *Fusarium* spp (100%), seguido de *Aspergillus* spp (87%); *Penicillium* spp (60%); *Alternaria* spp (27%); (7%) *Aspergillus* spp y *Mucor* spp respectivamente. El promedio de recuento de hongos totales: $>3,46 \times 10^4$ UFC/gr y el promedio de recuento de *Fusarium* spp fue: $1,0 \times 10^4$ UFC/gr. Las **principales coocurrencias fueron**: 40% *Fusarium* spp; *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp (9,01 ppm), 20% *Fusarium* spp; *Aspergillus* spp; *Alternaria* spp (3,03 ppm). **Conclusiones:** - El 30% de las muestras se ajustaron a las reglamentaciones vigentes en CE (Comunidad Europea) y el 40% cumplieron con las establecidas en Brasil por ANVISA. La población de Resistencia, Chaco estaría expuesta a FBs a través del consumo de harina de maíz, lo cual indica la necesidad de una adecuada vigilancia y monitoreo para la prevención de la contaminación fúngica y con fumonisinas. El método ELISA puede ser utilizado como método de screening.

II)- INTRODUCCIÓN:

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos secundarios, tóxicos para humanos y animales, producidos por hongos filamentosos. Si bien, no es muy conocida su función biológica, se postula que conferirían ventajas selectivas, como por ejemplo aumentar la habilidad para competir con otros microorganismos por el sustrato e incrementar la capacidad parásita para infectar al hospedador, siendo muy activas frente a plantas (fitotoxinas), animales (micotoxinas) y microorganismos (antibióticos), inhibiendo su crecimiento e incluso produciendo su muerte cuando compiten con éstos por los nutrientes y por el hábitat. Por lo tanto las micotoxinas son factores de riesgo para la salud humana y animal (1). Se denominan “micotoxicosis” a las intoxicaciones producidas por micotoxinas en los animales y en el hombre. Los géneros fúngicos más importantes productores de micotoxinas son: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (2).

Las especies de *Fusarium* pueden producir varias micotoxinas en maíz tales como: deoxinivalenol (DON); 3-acetil deoxinivalenol (3-AcDON); 15-acetil deoxinivalenol (15-AcDON); nivalenol (NIV); zearalenona (ZEA); Toxina T-2 (T-2); fusarenona X (Fus X); diacetoxiscirpenol (DAS), moniliformina (MON); toxina HT-2 (HT-2); fumonisina B1 (FB1); fumonisina B2 (FB2); fumonisina B3 (FB3) y beauvericina (BEA), fusaproliferina (FUP) Neosolaniol (NEO) (3).

II-I)-Fumonisinas

Las FBs fueron aisladas y caracterizadas a partir de un cultivo de *F. moniliforme* (actualmente denominado *F. verticillioides*) por investigadores sudafricanos (4). Su nombre proviene del origen fúngico del compuesto: *Fusarium moniliforme*.

Estructura química

Químicamente dichas toxinas son amino-polioles de cadena larga (20 carbonos) esterificados en los carbonos 14 y 15 con grupos de ácidos tricarbónicos. La FB1 es un diéster del propano -1, 2,3-ácido tricarbónico y un 2 -amino-12,16-dimetil 3, 5, 10, 14,15-pentahidroxiicosano, donde ambos grupos hidroxilo (C-14 y C-15) están esterificados con el grupo carboxilo terminal de los ácidos (**Fig.II-I**). Tomando como base la estructura de FB1(4), en la serie B, se incluyen fumonisinas B2, B3 (5) y B4,(5-6) donde en estos compuestos homólogos a FB1, su estructura tiene la pérdida de un grupo hidroxilo, FB2 en C-10, FB3 en C-5 y FB4 sufre la pérdida de ambos hidroxilos. Se identificó FB6, que es un isómero posicional de FB1 (7).

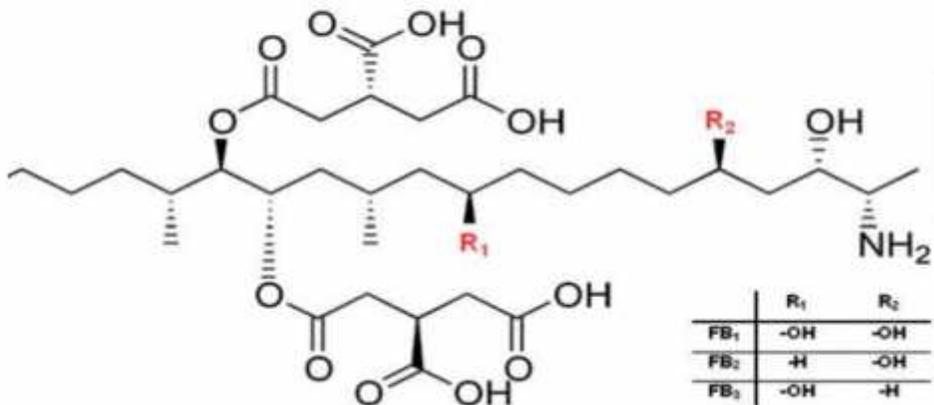


Fig.II- I: Estructura química de las fumonisinas FB1; FB2; FB3

La serie C fue aislada de maíces contaminados naturalmente por *Fusarium* (8-9). Desde el punto de vista estructural es similar a la serie B, sólo difiere en la pérdida del grupo metilo en el C-1; FC1 se encontró en un 3% respecto a FB1

(8) .La FB hidrolizada (HFBs), no presenta los grupos ácidos tricarbónicos (TCA) y la parcialmente hidrolizada (PHFBs) sólo presenta un grupo TCA. Los métodos utilizados en los procesos de fabricación de productos derivados del maíz pueden convertir fumonisinas intactas en hidrolizadas y parcialmente hidrolizadas. Estos compuestos no son de ocurrencia natural y solo se los ha encontrado en alimentos procesados, o estarían presentes en cantidades insignificantes en el maíz contaminado naturalmente (10-11). La serie B ha sido la más estudiada, siendo FB1, FB2 y FB3 las más frecuentes que se encuentran naturalmente en granos contaminados con *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y otras especies productoras de fumonisinas. FB1 representa del 70 al 80% de FBs totales producidas, mientras que FB2 por lo general constituye del 15 al 25% y FB3 alrededor del 3 al 8% cuando se cultivan en el maíz o arroz o en un medio líquido (12) . La FB1 ha sido designada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) perteneciente al grupo 2B como un posible carcinógeno para humanos (13).

F. verticillioides y *F. proliferatum* son las especies generalmente aisladas de maíz, que debido a su distribución geográfica amplia y a los niveles altos de producción de FBs se las asocia a micotoxicosis en animales y humanos. Otras especies de *Fusarium*, también son productoras de fumonisinas, como por ejemplo: *F. globosum*, *F. anthophilum*, *F. kozum*, *F. nygamai* entre otras. Recientemente se han descrito *F. ramigenum* y *F. oxysporum* como productoras de FB1 y FB2 (14). Éste último también produce fumonisinas de la serie C (9). *Alternaria alternata* f sp. *lycopersici* puede sintetizar FB1, (15-16). FB6 (isómero de posición de FB1), es producida por *Aspergillus niger* (17). Se

ha encontrado *A. niger* aislado de uvas, pasas y semillas de café productores de FB2 y FB4 (18).

II-II)-Ciclo de *Fusarium* en los cereales:

El ciclo infectivo de las especies de *Fusarium* en los cereales comienza a partir de un inóculo primario que se encuentra en los materiales vegetales infectados por el hongo. Estos provienen de los residuos de cosechas, los cuales pueden encontrarse sobre o por debajo del suelo. En estos residuos las especies de *Fusarium* pueden vivir en forma saprófita, o bien como peritecios, clamidoconidias, macroconidias y microconidias, según la especie (19). Las condiciones meteorológicas como las lluvias o los vientos e incluso ciertos insectos favorecen la propagación de las esporas, afectando las plantaciones. El inóculo también puede encontrarse en las semillas infectadas.

Un aspecto que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides* en el maíz es la utilización de múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos. Al menos son tres rutas principales (20).

1) Infección sistémica de plántulas: Ocurre durante y desde la germinación de la semilla, el hongo sobrevive -en la semilla o en el suelo- desde donde tiene una posición estratégica para infectar la planta. 2) Infección de la mazorca por medio del estigma. Es la vía más común de infección de la mazorca (choclo). Ocurre cuando el inóculo aéreo y las conidias transportadas por el agua de lluvia, son depositadas en la "barba de choclo" (estigmas del maíz), penetrando por el canal estilar, crecen a través del pericarpio. Incluso las hifas se pueden encontrar en el embrión y el endospermo. Por tanto, el pericarpio es un medio de defensa, por lo que su daño puede conducir a la contaminación de los cereales. 3) Infección del tallo y la mazorca por daño mecánico. Producidos por

insectos “plagas del maíz” que al alimentarse, horadan las mazorcas y tallos permitiendo la entrada de *F. verticillioides*.

II-III)- Factores determinantes en la producción de micotoxinas por especies del género *Fusarium*

Entre los factores ambientales que favorecen la contaminación fúngica y la biosíntesis de micotoxinas por el género *Fusarium*, tanto en campo como durante el almacenamiento de productos alimentarios, se encuentran la actividad del agua (a_w), temperatura, pH, composición gaseosa de la atmósfera, niveles de O_2 , CO_2 y N_2 (21-22). Otros factores son: composición del sustrato, interacción con otros microorganismos, presencia de insectos, stress de la planta (22).

Actividad del agua (a_w): Desde el punto de vista microbiológico el término más adecuado para expresar el agua del sustrato es la actividad de agua (a_w), término que contempla únicamente el agua libre en equilibrio con la humedad relativa ambiental. La a_w da una idea del “agua disponible” que los microorganismos pueden utilizar para su desarrollo. La a_w mínima para el desarrollo de la mayoría de las especies fúngicas que colonizan los granos de cereales está sobre 0,70, mientras que los valores óptimos de a_w para la producción de toxinas por parte de *Fusarium* oscila entre 0,93 y 0,98, no detectándose toxinas por debajo de un valor de 0,71. La producción de fumonisinas aumenta con la a_w , siendo óptima a 0,97 (23).

Temperatura: La producción de fumonisinas se ve favorecida en el intervalo de 15-30°C. Además, Los ciclos de temperatura favorecen la síntesis de micotoxinas, esto es, cuando las temperaturas tienden a ser altas durante el día y bajas por la noche (24).

pH: El pH no tiene una influencia marcada sobre el crecimiento de los hongos, dado que estos organismos pueden tolerar amplios rangos de pH, así por ejemplo, *F. verticillioides* tolera valores desde 3 a 9,5; aunque el pH óptimo de casi todas las especies patógenas de vegetales es aproximadamente 5,6 (25). La capacidad de poder desarrollarse a pH ácidos evita la competencia con las bacterias. En cambio, la formación de micotoxinas, se ve favorecida por valores de PH que oscilen entre 3 ,4 y 5,5 (22, 26). Se ha observado una mayor producción de fumonisinas a pH 4.5, en contraste con el pH alcalino, mayor a 8.

Niveles de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂): la mayoría de los hongos toxigénicos que contaminan los granos son aerobios y se ven influenciados por las condiciones de O₂, CO₂ y en menor grado nitrógeno (N₂). La cantidad de oxígeno, además del crecimiento influye en la producción de micotoxinas. Si la atmósfera se suplementa con CO₂, se produce un descenso tanto en el crecimiento del hongo como en la síntesis de micotoxina. De igual modo, el N₂ inhibe el crecimiento de hongos, efecto que se consigue cuando prácticamente todo el O₂ del aire ha sido sustituido por N₂. En general el crecimiento fúngico puede controlarse manteniendo niveles altos de CO₂ y baja concentración de O₂ (menor al 1%) Si a esto se le suma una baja en a_w de los granos, se logra un control mucho más efectivo (22, 27).

Se usan atmósferas modificadas para el control de los insectos y hongos en los granos almacenados, el inconveniente que observa es que los regímenes CO₂/O₂ útiles para controlar insectos son insuficientes para controlar hongos (28).

Composición del sustrato: Medios ricos en hidratos de carbono y relativamente pobres en proteínas y grasas son más apropiados para la producción de micotoxinas de

Fusarium spp. Es el caso de los granos de maíz, trigo, cebada, que tienen carbohidratos proporcionados por el almidón y la celulosa (29).

La fuente de nitrógeno influye en la síntesis de las fumonisinas, el amonio por ejemplo reprime la producción de la toxina. La relación C: N también afecta la síntesis. Cuando ésta es baja ocurre la supresión. Cuando *F.verticillioides* crece en granos de maíz en estadios tempranos de desarrollo, cuando la planta presenta inmadurez fisiológica y consecuentemente bajo contenido de almidón, se da una pobre generación de fumonisina (30).

Interacción con otros microorganismos: La producción de metabolitos secundarios se ve afectada cuando otras especies comparten el mismo nicho ecológico. Por ejemplo, la producción de fumonisinas en presencia de *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *P. implicatum*, es inhibida, excepto a actividades de agua altas (0,98) donde se ve estimulada. También se ha demostrado que la producción de fumonisinas por *F. verticillioides* y *F. proliferatum* disminuye en presencia de *F.graminearum*, excepto a 25°C y entre 0,95-0,98 a_w donde la producción de fumonisinas aumenta porque se estimula *F.verticillioides* (22).

Insectos : Los insectos pueden potenciar el crecimiento fúngico por los daños mecánicos, además su actividad metabólica y respiración inducen a un aumento de la a_w y temperatura; por otra parte juegan un papel en la diseminación de esporas. También pueden inhibir el crecimiento fúngico al alimentarse del propio hongo (28). Los insectos lepidópteros, como el barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*), constituyen la principal plaga de los cultivos de maíz en Argentina. Sus larvas se alimentan de los tallos, hojas y granos, dejando galerías que dañan la planta, la quiebran, impiden el transporte de nutrientes y son vía de entrada para hongos.

Factores de stress de la planta: sequía, pobre fertilización, competición con la maleza, etc, pueden debilitar las defensas naturales de las plantas y promover así la infección y producción de micotoxinas.

II-IV)- Síntesis de fumonisinas

Los niveles de producción de FB₁ son muy variables entre las cepas de *F. verticillioides*, ya que algunas de ellas no la sintetizan, o lo hacen a niveles muy bajos; en cambio, otras la generan a niveles impresionantes. La capacidad de sintetizar FBs depende de la presencia de una serie de genes (31- 35) que se encuentran, agrupados en una región de 46 Kpb del cromosoma 1 de *F. verticillioides* y forman el locus *FUM* (31- 32). Estos genes codifican las enzimas involucradas en la síntesis de FBs y proteínas relacionadas con la secreción y resistencia a las mismas. El gen *FUM1* es esencial para la biosíntesis y cepas carentes del locus *FUM* no producen FBs (35).

II-V)- Acciones para prevenir el riesgo de contaminación con fumonisinas en los alimentos

Se deben tomar medidas preventivas antes, durante y después de la cosecha.

Antes de la cosecha:

Las especies de hongos toxigénicos sobreviven en los residuos de cosecha, por lo cual se debe evitar, o al menos disminuir, la cantidad de granos y restos de plantas que queden en el campo posterior a la cosecha del maíz. Una rotación adecuada de los cultivos puede ser una forma eficaz de lograrlo. En vista que el trigo y el maíz son especialmente sensibles a las especies de *Fusarium*, no deben rotarse entre ellos. Se deberán utilizar otros cultivos para rotación como la papa, otras hortalizas, la alfalfa, que no son huéspedes de especies de *Fusarium*, y así reducir el inóculo en el campo. Se debe practicar un adecuado control de malezas. El cultivo de germoplasmas resistentes

o menos susceptibles, incluso germoplasmas modificados genéticamente (confieren resistencia genética a especies del género *Fusarium*, particularmente *F. verticillioides* en el maíz) (27), así como semillas de buena calidad son importantes para prevenir la contaminación por fumonisinas. La siembra y cosecha tempranas en zonas templadas puede disminuir los riesgos de infección. También la disminución de la densidad de plantas, así como el uso de fertilización adecuada juegan un papel importante. Como una manera de controlar el daño causado por los insectos, se han desarrollado los maíces llamados Bt, que contienen genes de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, (genes que codifican la proteína Cry 1Ab) cuyos productos resultan tóxicos para la plaga e inocuos para otros organismos. Se consiguen beneficios importantes por su uso, como el control de plagas sin emplear insecticidas, favoreciendo directamente al medio ambiente. Al ser controlada la plaga se permite un manejo más flexible de las fechas de siembra y cosecha que deriva en un mayor rendimiento. Un efecto indirecto y deseable de la protección contra estas plagas, es la asociación de resistencia a insectos de los maíces Bt con niveles reducidos de fumonisinas y de *Fusarium spp* en los granos lo que constituye un beneficio para la salud humana y animal (36-37). En Argentina se observó que los niveles de fumonisinas son menores en los híbridos Bt que en los no Bt. Argentina cultiva maíces genéticamente modificados Bt desde 1998, y actualmente más del 70% de los híbridos que se comercializan en el país son Bt (37).

El control biológico es una alternativa al uso de plaguicidas químicos, para proteger el maíz contra *Fusarium verticillioides* y consiguientemente reducir la producción de fumonisinas. Se ha propuesto el uso a nivel precosecha de *Bacillus amylolicuefaciens* o *Microbacterium oleovorans* (38).

Hay tres razones que contribuyen a la utilización del género *Bacillus* como control biológico: 1-es un buen productor de antibióticos con actividad antifúngica; 2-muestra excelentes aptitudes y eficacia en la colonización y 3-tiene una extraordinaria capacidad para esporular por lo que puede permanecer en estado de latencia por largos periodos de tiempo (meses o años) resistiendo condiciones desfavorables como calor, radiación gamma y ultravioleta, ácidos (39).

Durante y después de la cosecha:

El tiempo apropiado de la cosecha es esencial para reducir el riesgo a contaminaciones. En general, cosechas tempranas conducen a menores contaminaciones. Se debe cosechar el grano cuando el nivel de humedad sea inferior al 16%. Si la humedad es mayor al 16% y se almacenan desarrollan hongos. El retraso en la cosecha del cereal ya infectado por especies de *Fusarium* puede causar un aumento significativo en el contenido de micotoxinas en el cultivo y almacenamiento. Las cosechadoras deben estar limpias, sin residuos de la cosecha anterior, para prevenir las contaminaciones cruzadas.

Los granos recolectados deben ser cuidadosamente inspeccionados a fin de eliminar los que estén rotos, encogidos y las impurezas para reducir la tasa de infección.

Se deben secar los granos antes del almacenamiento. Los sitios de almacenamiento (silos, graneros) deben cumplir ciertas condiciones, temperaturas entre 16-24 °C, deben tener buena ventilación. La higiene de las instalaciones de almacenamiento es importante para evitar las contaminaciones por insectos. Los inhibidores de las especies fúngicas durante el almacenamiento, no pueden eliminar la toxina de los granos, pero pueden inhibir el posterior desarrollo fungico. Se ha demostrado que los antioxidantes de grado alimenticio propilparabeno (PP) y hidroxianisol butilado (BHA) pueden controlar el crecimiento y la producción de fumonisinas, por especies de *Fusarium* y *Aspergillus* en

medios de cultivo y sobre sustratos naturales bajo diferentes condiciones de temperatura y actividad de agua (a_w) (40). Se observó una disminución del 77% en los niveles de toxina producida, con concentraciones de (BHA) de 1000 ug / g después de 28 días de incubación de medios de cultivos. Probablemente, la reducción de fumonisinas producidas serían el resultado del efecto combinado de los antioxidantes, y la micoflora que compete, principalmente especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (41).

II-VI)- Incidencia natural de fumonisinas en maíz en Argentina

Un estudio que analiza los niveles de micotoxinas en maíces de Argentina durante los años 1999 a 2010 en un total de 3246 muestras recién cosechadas y 1655 muestras de maíz almacenado de diferentes regiones, muestra que entre el 90 y 100% de las muestras estaban contaminadas con fumonisinas en todos los años evaluados y los niveles promedio variaron de 1773 a 9093 mg/kg para las muestras de maíz recién cosechado y 2525 a 11528 mg/kg para las muestras almacenadas. Por otro lado, la coocurrencia aflatoxina-fumonisina fue la más frecuente (8,4%), y luego zearalenona-fumonisina (2%) (42). En el año 1999, en la provincia de Entre Ríos se investigó ocurrencia natural de fumonisinas en maíz. Se encontró FB1 en el 58% de muestras, los niveles de FB1 fluctuaron entre 0,047 y 3,347 mg / kg, FB2 en 33%, con niveles de 0,023-0,537 mg / kg y FB3 en 25 % niveles de: 0,024-0,287mg / kg (43). Por lo tanto, en Argentina, el maíz puede estar contaminado con diferentes niveles de FBs dependiendo de la región geográfica de la cual se realice el muestreo.

II-VII)- Fumonisinas en los alimentos

Las FBs están distribuidas ampliamente a nivel geográfico y su incidencia natural ha sido demostrada principalmente en maíz, granos enteros, triturados y alimentos derivados,

como ser: pan de maíz, palomitas de maíz, sémola de maíz copos de maíz, salvado, harina de maíz, pasta de maíz, cereales de desayuno, maíz dulce, polenta, tortillas, palos de harina de maíz, alimentos balanceados para el consumo animal. También se presentan en otros alimentos- distintos del maíz y sus derivados- como cerveza, arroz, sorgo, frijoles, soja, espárragos (44). En China, se detectaron niveles altos de FBs en espárragos ,en rangos de 28 a 4204 $\mu\text{g} /\text{g}$ (45). En Argentina se demuestra contaminación natural con FBs en granos de trigo duro (46). Existe evidencia suficiente de su presencia en semillas de café, uvas, pasas, mosto (18), higos secos (47) y en hojas de té negro y plantas medicinales como manzanilla, hojas de naranjo, flores y hojas de tilo(48).

Estudios en animales refieren que no hay transferencia significativa de FBS o sus metabolitos a productos animales como leche, carne y huevos (49).

Actualmente es de interés producir alimentos de calidad e inocuos por lo tanto es necesario evaluar la contaminación con hongos toxicogenicos y micotoxinas a fin de determinar los riesgos para la salud humana y animal. Atención especial debería darse a la presencia de FBs en la dieta de poblaciones vulnerables, como los niños, en vista que los alimentos a base de cereales son una importante fuente de nutrición en su dieta. La cantidad que consumen es proporcionalmente mayor, en comparación a su peso corporal que los adultos y sumado a que su fisiología es algo diferente a la del adulto, constituyen una población de riesgo (50).

II-VIII)- Procesos de elaboración del maíz

Composición química del grano de maíz:

El grano de maíz tradicional está compuesto por un 70 -75 % de almidón; 8 a-10 % de proteínas y 4-5% de aceites, contenidos en tres estructuras: el germen (embrión), el endospermo y el pericarpio (51).

Germen: Contiene el 83% de los lípidos y el 26% de la proteína del grano. **Endosperma:** Contiene 98% del almidón y 74% de proteínas del grano. Funciona como dador de energía a la planta en su desarrollo. **Pericarpio:** Incluye todos los tejidos de la cobertura exterior (100% de fibras vegetales) Es una cubierta protectora dura y fibrosa que encierra al grano. En el cereal ya maduro, tiene la función de impedir el ingreso de hongos y bacterias.

Molienda húmeda y molienda seca:

II-VIII-I)-Molienda húmeda :Las etapas son: Selección de granos, maceración, molienda gruesa y molienda fina (51).

* Selección de granos: con la finalidad de evitar los granos rotos o partidos que pueden tener mayores niveles de toxina.

* Maceración: Se sumerge el maíz en agua con 0,1-0,2% de SO₂, a temperatura 48-52°C durante 30-50 hs. (solubiliza y desnaturaliza proteínas, detiene el crecimiento de microorganismos de la putrefacción, favoreciendo el desarrollo de bacterias lácticas gracias al bajo Ph del agua y al contenido de azúcar del cereal). Como resultado, el almidón se libera con más facilidad de la matriz proteica. El líquido de macerado al final de la etapa, (contiene la proteína disuelta) se “concentra” y se mezcla con la cáscara (salvado) y el germen agotado para destinarlo a la alimentación animal (gluten feed).

*Molienda gruesa (degerminado): Rompe el grano y libera el germen que se destina a la producción de aceites.

* Molienda fina: La cáscara (salvado) y trozos de endospermo se muelen nuevamente. Se busca separar el almidón, proteínas y fibras. La fibra se separa por tamizado, mientras que el almidón es más denso que la proteína (gluten) y se separa por centrifugación.

El pienso de gluten (gluten feed) con 23% de proteína , (alimentos para rumiantes). Es una mezcla de: salvado+ gérmen agotado+ proteínas solubilizadas en la maceración.

El gluten meal, con 40-60% de proteína, (alimentos para mascotas).Es la fracción proteica que se separa de la lechada de almidón en la centrifugación.

El almidón de maíz se expende como tal o se usa para obtener subproductos (jarabe, fructosa, glucosa).

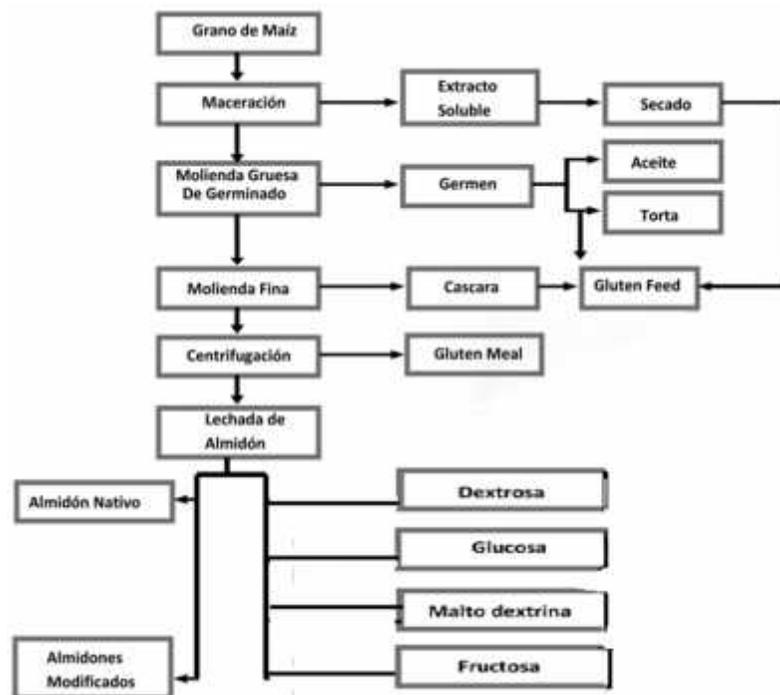


Fig.II II: Molienda Húmeda- Obtención del almidón y subproductos

II-VIII-II)- Molienda seca:

Las etapas son: selección y limpieza del grano, humectación, degerminación y refinación (51).

*Selección y limpieza de los granos: Para evitar granos quebrados, granos de otros cereales, hojas, piedras y partículas pulverulentas.

*Humectación de granos: con agua, mediante rociadores. El maíz humectado se deja en reposo durante algunos minutos en un silo.

*Degerminación (molienda gruesa): Para separar el germen, que se usa en la fabricación de aceites. Los restos de endospermo y cáscara resultantes, pasarán a la segunda molienda (refinación).

*Refinación: Permite una molienda más fina y por distintos procesos (aspiración-tamizaje) se separan la cáscara (salvado), que se destina a productos de panificación y los derivados del endospermo, que según granulometría se clasifican en: **a)-Trozos gruesos (3500-5500micrones)** para elaborar copos y cereales de desayuno. **b)-Trozos medios (2200 y 3300 micrones)** para alcoholes y bebidas alcohólicas y/o sémolas y harinas previa refinación. **c)-Trozos finos (1000 a 2200 micrones)** para sémolas y harinas. Las sémolas según granulometría se clasifican en: **a)-Sémola para cervecería (350 y 1200 micrones)**, **b)- Sémola para expandidos, (450 y 1200 micrones)** usados en productos de copetín como Chizitos **c)- Sémola para polenta (350 y 1100 micrones)**. Las harinas se destinan al consumo humano o animal. (Fig. II-III.)

Las harinas pueden ser:- 1 refinada- (blanca), que se obtiene por remoción del salvado y el germen y se muele únicamente el endospermo. (Fig.II III) - es más durable, pero no conserva el valor nutritivo ni fibras, (es enriquecida con fibras y Vitamina A).-2- integral- (amarilla) , que se obtiene por molienda del grano entero -al conservar el germen se

enrancian con facilidad y dura menos, pero mantiene el valor nutritivo. La harina integral es fuente de hidratos de carbono, minerales (magnesio, fósforo, hierro, selenio y zinc) vitamina B, E y A

Al carecer de gluten es adecuada para enfermos celíacos, sin embargo no es panificable.

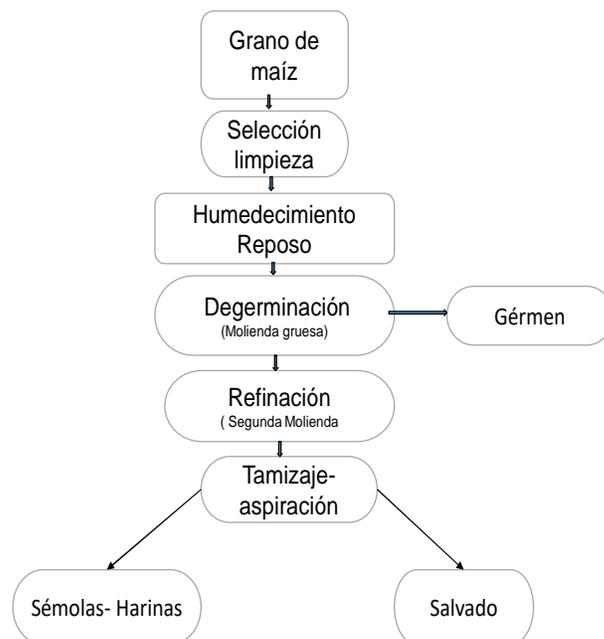


Fig.II III: Molienda seca- Obtención de la harina de maíz

En harina de maíz de Brasil se encontraron niveles de FB1 (0,5 a 7,2 mg/ kg, con una media: 2,1 mg/ kg) y FB2 (0,1-1,8 mg /kg, con una media: 0,7 mg/ kg) (52). En Estados Unidos, de 5- 20.5 mg/kg FB1 (53). En Italia 42mg/Kg -376mg/kg FB1 y 8 mg/Kg a- 91mg/Kg FB2.(54) En Buenos Aires, en el período de octubre1996 a enero 1997, se obtuvieron niveles desde no detectables a186mg/Kg FB1, y entre no detectable y

76,8mg/Kg FB2(55). En enero de 1998, desde 7,5mg/Kg FB1 a 498,7 mg/kg y de no detectable a 181,8mg/kg FB2(55).

II-IX)- Contenido de fumonisinas en los procesos de elaboración de la molienda húmeda y seca

- **Contenido de fumonisinas en el grano de maíz.**

Se encuentran FBs en las distintas partes de la semilla de maíz. En el pericarpio: 49-55%; "endospermo vítreo." (zona cortical del endospermo, limitante al pericarpio) : 7-17%; endospermo harinoso (zona media del endospermo): 28 a 31% y germen: 4 a 6%; (56) .

- **Clasificación y limpieza:**

La clasificación y limpieza, previos a molturación en seco o en húmedo, reducen los niveles de fumonisinas por extracción del material contaminado. Los granos rotos de maíz contienen concentraciones casi 10 veces mayores de fumonisinas que los granos intactos. (57).

En cargamentos a granel al fraccionar por tamizado los granos (tamiz de malla 3 mm), se separaron dos fracciones, las 3 mm con ciertos niveles totales de fumonisinas y las llamadas «multas» (<3 mm) con significativamente más altas concentraciones de fumonisinas totales. La eliminación inicial de «multas», de los envíos a granel de maíz, previo a su procesamiento, es un procedimiento de descontaminación preliminar de fumonisinas (58).

Hoy se cuenta con una metodología que permite el monitoreo de FBs en lotes de maíz contaminados, (para seleccionar antes del procesamiento), basada en la obtención de muestras digitales de maíz generadas con el uso de diferentes luces LED. Se establece

una correlación entre la imagen digital y el nivel de FBs (FB1+FB2), resultando una estimación de la contaminación por FBs en pocos minutos con un mínimo de equipamiento (59).

- **Molturación en seco:**

Durante este proceso no hay destrucción de FBs y aparecen en todas las fracciones, (germen, salvado y harina) con concentraciones más elevadas en el salvado y el germen (60), mientras que el endospermo está contaminado sólo parcialmente (61). En el germen y salvado se encontraron 13 veces más altas que la harina de maíz y el triple que el maíz entero (62). Además del contenido de FBs del grano entero, la contaminación de los productos alimentarios depende de si las fracciones se obtuvieron de maíz al que se ha retirado el germen (niveles inferiores de FBs) o con su germen o parcialmente sin germen (niveles superiores de FBs) (61). Las concentraciones de FBs que se encuentran en granos y harinas -que se obtienen del endospermo- contienen los niveles más bajos de toxina y las concentraciones están estrechamente relacionadas con el tamaño de partícula. Niveles más bajos de *Fusarium* y FBs se encuentran en fracciones con mayor tamaño de partículas, por ejemplo sémola en copos > harinas (60). Hay una relación inversa entre el tamaño de partícula y la contaminación por toxina.

La limpieza de los granos contaminados, previa a la molturación en seco influye sobre la distribución de la toxina en las distintas fracciones. Se logra reducir niveles de FB1 de 11% a 34% y la eliminación posterior del salvado y del germen, reducen aún más la contaminación en los productos destinados al consumo humano (63).

Los niveles de FBs en harina de maíz pueden ser muy variables, del 26% a 310% de las cantidades presentes en el maíz en grano inicial, dependiendo de cada lote y tipo de molturación (57).

Los niveles de contaminación promedio se detectaron en muestras de maíz y diferentes fracciones resultantes de molienda seca en un molino industrial de Argentina (64). -En maíz entero: FB1 1540 ug/Kg, FB2 716 ug/Kg, FB3 152 ug/Kg - sémola: FB1 135 ug/Kg, FB2 39 ug/Kg, FB3 10 ug/Kg -Harina grado C: FB1 358 ug/Kg, FB2 122 ug/Kg FB3 46 ug/Kg-Harina de maíz: FB1 148 ug/Kg , FB2 52 ug/Kg , FB3 28 ug/Kg-Germen+pericarpio: FB1 4210 ug/Kg , FB2 2010 ug/Kg, FB3 447 ug/Kg (64).

- **Molturación en húmedo:**

Se determinó el destino y distribución de FBs en las distintas fracciones resultantes de la molienda húmeda (65). El maíz entero naturalmente contaminado contenía 13.9 ug/kg de FB1. El almidón estaba libre de toxina detectable. Las otras fracciones: -Gluten: FB1 5,5ug/kg - Fibra: FB1 4,2 ug/ Kg y germen FB1: 2.02 ug/kg . El agua de remojo y de los procesos contenía el 22% de FBs recuperables (65).

Si bien se detectan FBs en las aguas de remojo, durante la maceración en agua con el añadido de SO₂ (HSO₃⁻), se reducen los niveles en las distintas fracciones (66). Se encontró en gluten >fibra >germen (57,65), pero no en almidón (65) ni en aceite (67). Estos últimos destinados al consumo humano.

El germen agotado+gluten+ fibra se destinan a alimentación animal. **(Fig.II-II)** Como resultando se concentra la toxina (67) y constituye una vía importante de exposición animal. Se estima que alimentos destinados a alimentación animal y el germen tienen un contenido de FBs más alto que el grano sin procesar, mientras que los derivados destinados a consumo humano están menos contaminados (61).

II-X)- Elaboración de alimentos:

II-X-I) Derivados de fumonisinas durante la elaboración de alimentos:

Ñ Fumonisinas modificadas

Los métodos usados para el procesamiento del maíz en la elaboración de alimentos también influyen en la concentración final de FBs. Hay pérdidas de la toxina, que incluyen la transformación a productos derivados y la unión a ciertas matrices de los productos alimenticios, en forma conjugada “conjugated fumonisins”. Si se encuentran en forma soluble, son llamadas fumonisinas enmascaradas “masked fumonisins” y si se encuentran asociadas a macromoléculas a través de unión covalente se llaman fumonisinas ligadas “bound fumonisins”. Por otra parte, existen mecanismos de atrapamiento físico o complejación, que difieren de la unión covalente en que pueden “esconder” a las fumonisinas. Este tipo de fumonisina derivada no unida covalentemente a la matriz se suele llamar fumonisinas ocultas “hidden fumonisins”, o micotoxinas modificadas (68-69).

Ñ Fumonisinas hidrolizadas :

Las fumonisinas pueden sufrir hidrólisis en presencia de ácido HCl 6M o álcalis NaOH, KOH y Ca (OH)₂. La nixtamalización es un proceso necesario para la obtención de la masa de maíz (usado en la fabricación de tortillas) y consiste en cocer los granos de maíz en una solución alcalina de Ca (OH)₂, a una temperatura cercana al punto de ebullición, provocando la pérdida de uno o ambos grupos TCA, dando como resultado los productos hidrolizados y parcialmente hidrolizados (70). Tales compuestos se forman aún a temperatura ambiente y las concentraciones de FB1 disminuyen al incrementarse la concentración de Ca(OH)₂ (71).

La nixtamalización reduce la concentración de FB1 en aproximadamente 90% y la cantidad restante permanece en su forma hidrolizada (HFB1). No obstante, cuando el proceso es incompleto y no se elimina adecuadamente el pericarpio, el 31% de la FB1 permanece en forma original. HFB1 es menos potente in vitro que la FB1 (72), aunque sigue teniendo efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos (73). Hay quienes afirman que los productos hidrolizados son menos tóxicos que las fumonisinas del maíz no tratado (73). Sin embargo, otros señalan que la toxicidad es igual o superior a la de las fumonisinas en el maíz sin tratar (74-75).

Existe un procedimiento modificado de nixtamalización, que incorpora diversas combinaciones de H_2O_2 , $NaHCO_3$, y $Ca(OH)_2$, que logra reducir la FB1 en un 100 %, y la toxicidad de la masa es del 60 % de la del maíz sin tratar (76).

Ñ **Fumonisinias conjugadas :**

En alimentos tratados térmicamente con alto contenido de azúcares reductores, en presencia de FB1 se han logrado identificar dos derivados: N-(carboximetil) fumonisina B1 y N-(Deoxi-D-fructosa-1-il)-fumonisina B1 (77). **(Fig.II-IV)**

N- (carboximetil) -fumonisina B1, surge de una reacción de glicosilación, entre el grupo amino libre de FB1 y el aldehído del azúcar reductor con posterior oxidación. (Reacción de Maillard). Por hidrólisis alcalina del N-(Deoxi-D fructosa-1-il) se obtiene una mezcla de (HFB1) y N-(carboximetil) fumonisina B1 hidrolizada (78).

El grupo amino primario de la molécula de FB1 es considerado esencial para ejercer su actividad biológica (79). Por lo tanto, estos compuestos presentarían una menor toxicidad al carecer de dicho grupo. La modificación de FB₁ con glucosa, no provoca hepatotoxicidad ni hepatocarcinogénesis en ratas. Se mantiene normal la relación

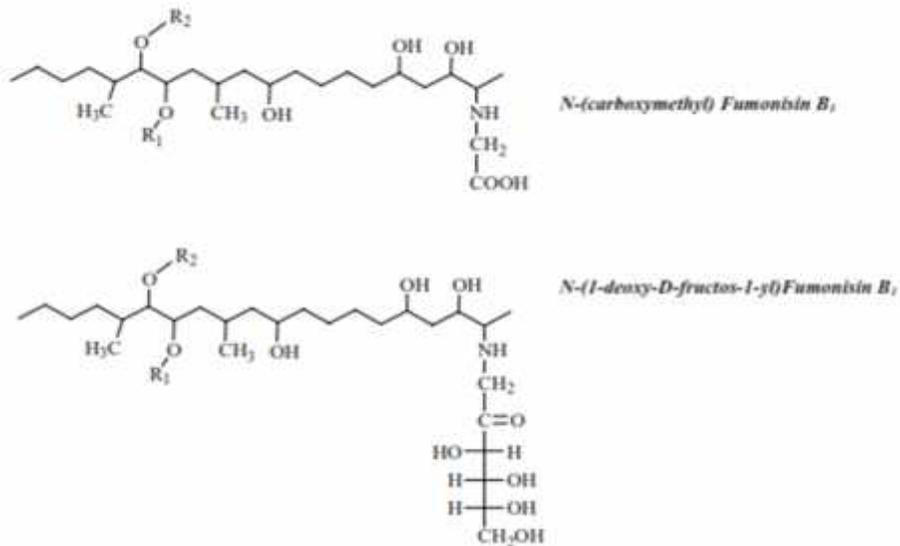


Fig.II-IV: Derivados obtenidos por tratamiento térmico de fumonisina en presencia de azúcares reductores

hepática Sa (esfinganina) / So (esfingosina) (80). La toxicidad del N-carboximetil derivado de FB1 es 100 veces menos eficaz que su análogo FB1 (81). Por lo tanto, los procesos térmicos en presencia de azúcares reductores reducen el contenido de fumonisinas, resultando la formación de productos menos tóxicos.

Se describen otros compuestos, productos de la unión de FBs a la matriz del alimento, formando uniones covalentes con proteínas, polisacáridos (almidón) y ácidos grasos.

La unión de las fumonisinas a los polisacáridos y proteínas se produce a través de sus cadenas laterales TCA. Los compuestos conjugados sólo lo produce FB1 y no HFB1 (por carecer de los grupos TCA) (82).

Las proteínas reaccionan con el TCA a través de sus aminoácidos, principalmente lisina y cisteína, lo hacen por medio de los grupos amino o sulfhidrilo respectivamente, formando, una amida o tioéster, esto es la proteína conjugada. Los grupos hidroxilos de los hidratos de carbono (sacáridos, polisacáridos) reaccionan con el TCA, dando una

unión éster. Se han descrito derivados obtenidos por esterificación de FB1 con ácidos grasos palmítico, oleico y linoleico. Incluso, se encuentran en el maíz crudo esterificados con ácido oleico (EFB1OA) o ácido linoleico (EFB1LA) respectivamente (83).

Ñ **“Hidden” fumonisina**

Las “hidden fumonisins”, se han encontrado con frecuencia en los productos derivados de maíz junto con las formas libres. Existiría una interacción entre los componentes macromoleculares de la matriz, tales como las proteínas y el almidón con la fumonisina, lo que explicaría la base del fenómeno de “ocultación” (84).

Por hidrólisis alcalina in vitro (simulando procesos digestivos) se demuestra que FB1 enlazada (“Bound” fumonisin”) covalentemente a aminoácidos o azúcares es bastante estable, mientras que las formas ocultas (“Hidden fumonisins”), no lo son, dando como productos de hidrólisis los compuestos originales (85). Tal resultado sería suficiente para avalar que la interacción que ocurre entre los analitos y macromoléculas de la matriz es de tipo “asociativa” en lugar de covalente en las “hidden fumonisins” (84).

Existiría una interacción no covalente entre la fumonisina y -zeína (proteína del endospermo del maíz), probablemente a través de un mecanismo de inclusión (86).

II-X-II) Tratamientos térmicos:

El contenido de fumonisina es inversamente proporcional a las temperaturas de procesamiento. Las temperaturas de ebullición son ineficaces para producir una reducción significativa en los niveles de FBs (87).

Durante 60 minutos en medio acuoso a 125 ° C, las pérdidas de FB1 son <27 %; después de 60 minutos a 150 ° C, se pierde 18-90% (dependiendo del Ph) y después de 60 minutos a temperatura 175 ° C la pérdida es > 90%(independiente del Ph) (88). Los

niveles de FB1 pueden reducirse sustancialmente en alimentos que alcanzan 150 ° C durante el procesamiento (88).

La **cocción** de alimento a base de maíz (bollos contaminados con FB1) a 175 y 200 ° C durante 20 minutos resulta en 83,7% y 72,4 % de retención de FB1 respectivamente. (A ambas temperaturas, las pérdidas de FB1 son mayores en la superficie), mientras que la **fritura** a 140 y 170°C durante 6 minutos no produce disminución significativa de FB1. La toxina comienza a degradarse a temperaturas de fritura 180 ° C y tiempos 8 min. Por lo tanto, las fumonisinas sobreviven bajo la mayoría de condiciones utilizadas durante la **cocción y la fritura** (89).

La tecnología de extrusión es muy usada en la industria productora de cereales para desayuno y alimentos para animales. Durante el proceso, la harina de maíz se somete a alta presión a temperaturas que varían entre los 100 y 200 °C y a una humedad entre 13 y 30%, lo cual disminuye significativamente las FBs, en especial bajo condiciones de poca humedad. A temperaturas superiores a 150 ° C, se logra una buena reducción de fumonisinas. Las mayores reducciones se producen a temperaturas de extrusión de 160 ° C o superior y en presencia de glucosa. La Extrusión de sémola de maíz contaminada con fumonisinas con 10% de glucosa añadido, reduce en 75-85% los niveles de FBs (90).

En términos generales puede considerarse que a temperaturas de procesamiento de 125 ° C o inferiores, las pérdidas de fumonisina son bajas (25-30%), mientras que a temperaturas de 175 ° C y superiores, las pérdidas son mayores (90% o más).

Procesos tales como la cocción y enlatado, donde las temperaturas del producto rara vez llegan a 175 ° C, dan como resultado poca o ninguna pérdida de fumonisinas. Procesos como la fritura y la cocción por extrusión, donde las temperaturas pueden superar los 175

° C, dan como resultados mayores pérdidas. La adición de glucosa se traduce en grandes disminuciones de FBs durante la cocción y el procesamiento de extrusión.

El destino químico de FBs en alimentos horneados, fritos y extruidos no se entiende bien y no se sabe si las concentraciones reducidas resultan de la descomposición térmica de fumonisinas o de su unión a proteínas, azúcares u otros compuestos en matrices alimentarias. Estas posibilidades pueden o no ser beneficiosas dependiendo de la biodisponibilidad y la toxicidad inherente de los productos de descomposición o el grado en el que las fumonisinas son liberados en el tracto gastrointestinal. Las consecuencias toxicológicas de los productos de reacción conocidos y probables de fumonisinas se discute aún (91).

II-XI)- Mecanismo de acción:

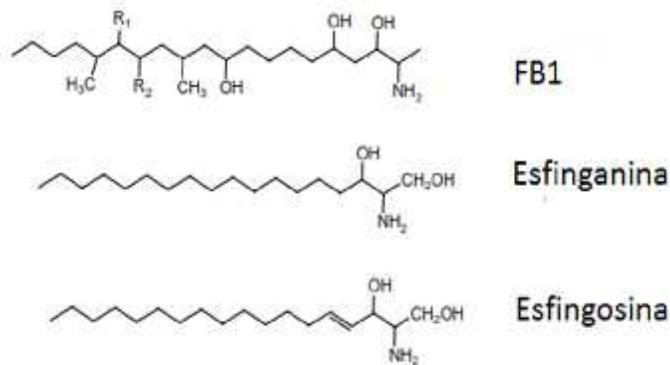


Fig.II-V: Comparación de la estructura química de la Fumonisina B1 y las bases esfingoides esfinganina y esfingosina

Dada la marcada similitud estructural de las fumonisinas con la cadena larga de los precursores de los esfingolípidos, (**Fig.II V**) se considera que el metabolismo de éstos es su blanco de acción tóxica (92). Específicamente actúan inhibiendo la ceramida sintasa.

El metabolismo de los esfingolípidos consta de dos etapas, la primera de síntesis de novo, a partir del complejo serina palmitoil-CoA y la segunda de recambio de esfingolípidos que incluye la hidrólisis de esfingolípidos complejos. En ambas etapas interviene la enzima ceramida sintetasa (es una N-acil transferasa, responsable de la acilación de esfinganina y esfingosina), la cual es bloqueada por la acción de fumonisina. (La toxina compite con los sustratos por la enzima) Este bloqueo se traduce en inhibición de la síntesis de ceramida, incremento de la esfinganina y esfingosina, una mayor degradación de las bases esfingoides provenientes de la dieta y finalmente una reducción en la formación de esfingomielina (93). La esfinganina y esfingosina se liberan de la célula y debido a que aparecen en sangre y orina, se usan como marcadores de exposición a FBs en animales (94).

Los esfingolípidos forman parte de la membrana celular e intervienen en los procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular al mantener la estructura de la membrana, la comunicación intercelular, la interacción entre las células y la matriz extracelular, regulando los receptores del factor de crecimiento y actuando como segundos mensajeros (93).

El agotamiento de esfingolípidos complejos, (ceramida, esfingomielina y glicofosfolípidos) y la acumulación de las bases esfingoides (esfinganina y esfingosina), alteran las funciones celulares mencionadas antes y favorecen el estrés oxidativo entre otros efectos. A través de la activación del factor de necrosis tumoral, la exposición a FB1 altera el balance de muerte celular y replicación y de esta forma contribuiría a la carcinogénesis (93).

FB1 induce apoptosis in vivo (en células de hígado y riñón de ratones) e in vitro (cultivo en células humanas) (95). La interrupción del metabolismo de los esfingolípidos conduce a la producción de daño oxidativo, peroxidación lipídica, daño celular y apoptosis.

FB1, FB2, FB3, FB4 son inhibidores equipotentes de la enzima ceramida sintetasa, no obstante las formas hidrolizadas FBH1,FBH2 yFBH3 ,son sólo el 30-40% tan potente como las toxinas madres (96).

HFB1 y HFB2, no sólo se comportan como inhibidores de la ceramida sintasa, sino también son acilados por esta enzima, Los N-acil derivados resultantes tienen en mamíferos una toxicidad mayor de 10 veces la toxicidad de FB1 intacta (97-98). Óptima toxicidad in vitro en mamíferos, se alcanza con longitudes de cadena de ácidos grasos de 10 a 14 átomos de carbono (99). La contribución de los metabolitos HFB1 y HFB2 N-acilados a la toxicidad requiere in vivo una mayor investigación.

Las fumonisinas reducen la absorción de ácido fólico y la deficiencia resultante podría explicar la asociación entre la exposición a fumonisinas con defectos del tubo neural (DTN) .La incorporación de folato a la célula depende de dos proteínas presentes en la membrana que requieren de esfingomielina para su adecuado funcionamiento: el transportador de folato reducido (hRFC1) y el receptor de folato (RF).En condiciones de deficiencia de esfingomielina, por ejemplo por acción de fumonisinas (100), disminuye la incorporación de folato a la célula (101) y se produce un estado deficiente de folato. Por otro lado, debido a que la deficiencia de ácido fólico causa defectos del tubo neural, algunos defectos de nacimiento no explicados por otros factores de riesgo conocidos, serían causados por la exposición a FB1 (100,102-103).

Los efectos tóxicos de la exposición a FBs se incrementan en condiciones de deficiencia de folato, especialmente deficiencia de 5-Metilentetrahidrofolato (104). HFB1 no causa

DTN (en ratón embarazada), aún a concentraciones muy altas, sin embargo FB1 sí, (102). Es una revelación importante para productos nixtamalizados, por ejemplo el consumo de tortillas que ha sido implicado como un factor de riesgo de DTN.

II-XII)- Toxicocinética y metabolismo :

A causa de su hidrosolubilidad, la probabilidad de bioacumulación de fumonisinas en tejidos animales es menor que en el caso de los compuestos liposolubles. No se han detectado residuos de fumonisinas, o se han detectado en niveles sumamente bajos, en la leche, huevos y carne comestible (49). El hígado y el riñón son los órganos que retienen la mayor parte de las fumonisinas absorbidas, aunque se encuentran en muy bajas concentraciones.

En humanos no existen estudios acerca del metabolismo y cinética de FBs. En animales de experimentación la absorción es baja. En todas las especies estudiadas normalmente sólo llega a sangre el 5% de la dosis ingerida inicialmente. En cerdo 3.9 % (105). La fracción absorbida es rápidamente distribuída y eliminada. La eliminación se produce a través de la orina en un 3% y también por las heces, en un 80% (106); 76,5% (107) .Un cierto porcentaje (1,4% de la dosis), entra en el ciclo de circulación enterohepática, haciendo que se retrase la eliminación total del organismo. Se acumula en hígado y riñón principalmente (órganos Diana) (108), aunque en bajas concentraciones y no existe evidencia de transporte transplacentarios (93), lo que sugiere que la exposición in útero es improbable.

La excreción biliar es la ruta principal de eliminación de FB1 o sus metabolitos: 80%, (106,109). En heces, contenido intestinal y orina predominan FB1 y HFB1 (110). La excreción biliar de HFB1 y FB1 son semejantes, sin embargo la excreción urinaria de

HFB1 es mayor en comparación con FB1 (108), evidencia que la absorción de HFB1 es mayor que la de FB1.

II-XIII)- Vías de transmisión alimentaria:

Las FBs entran a la cadena alimentaria transmitiéndose al ser humano directamente a través del consumo de cereales y productos derivados. En vista a que se eliminan en forma rápida en animales por ser hidrosolubles, los residuos de FBs en los alimentos de origen animal (leche, carne, huevos, etc.) son muy bajos y no contribuyen significativamente a la exposición humana a dichas micotoxinas (49).

II-XIV)- Biomarcadores de exposición:

En humanos hoy se implementa un método moderno muy sensible UPLC-MS/Ms, que resulta adecuado para detectar y medir con precisión la baja concentración de biomarcadores de forma natural en muestras de orina humana. Mide en forma simultánea: DON, FB1, OTA, AFB1 y ZEA, son las principales micotoxinas presentes en los productos agrarios. El hombre al consumir alimentos contaminados puede estar expuesto a varias de ellas al mismo tiempo. El análisis de esta metodología en Italia, reveló que absolutamente todas las muestras de orina analizadas contenían biomarcadores de dos o más micotoxinas. La concentración media de (FB1): 0,55 ppm. Los biomarcadores se detectaron en 100% (ZEA), 100% (OTA) 96%(DON), 56% (FB1)y 6% (AFB1) de las muestras respectivamente (111).

En modelos animales, la relación Sa/So alterada (>1) se observó en tejidos, suero, orina y se considera un buen biomarcador (112). En humanos en cambio la detección de variaciones en estos biomarcadores esfingoides es más problemática y no se aceptan

como biomarcadores (113). Existen dos razones fundamentales que lo avalan, por un lado Sa y So se producen de forma natural en la sangre humana y en la orina, por lo que sus niveles tienen rangos normales y pueden ser influenciados por otros factores de la dieta distintos de la ingestión de fumonisina. Por otro lado, en comparación, las dosis de toxina recibidas por animales de experimentación son mucho mayores que las del humano (112).

II-XV)- Efectos biológicos:

Los principales órganos blanco de las fumonisinas en los organismos son hígado y riñón, también afecta cerebro, pulmón y corazón. Su inmunotoxicidad predispone a enfermedades infecciosas y podría alterar la “inmunovigilancia tumoral” de humanos y animales, pero los mecanismos no han sido dilucidados todavía, y se propone como posible mecanismo la inducción de estrés oxidativo (114). La exposición de FB1 sobre el estado oxidativo celular en células mononucleares del bazo en ratas, determina un aumento total de ROS (especies reactivas de oxígeno) y la oxidación de biomoléculas. Los principales ROS implicados en la oxidación de proteínas, lípidos y ADN son peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. En consecuencia FB1 produce inducción del estrés oxidativo, el cual contribuiría a la generación de fuentes de oxígeno inmunotóxicas (114)

II-XV-I) En equinos:

Leucoencefalomalacia equina (ELEM): Se logró reproducir experimentalmente la enfermedad en equinos por administración E.V de FB1 (115) y por vía oral (116). El cuadro clínico se caracteriza por sintomatología nerviosa trastornos en la locomoción, andar sin rumbo fijo, en círculos, choque contra objetos, ceguera, coma profundo seguido de muerte (117).

Los hallazgos anatomopatológicos, muestran en cerebro áreas multifocales amarillas de reblandecimiento y licuefacción, hemorragia y necrosis de la sustancia blanca de uno o los dos hemisferios y bulbo raquídeo, también **lesiones a nivel hepático** (115)

II-XV-II) En ratas:

FB1 es **hepatocarcinogénica**, **hepatotóxica** (118) y **nefrotóxica**. El riñón es más sensible que el hepatocito (requiere menores concentraciones para producir daño) (119). Induce al **carcinoma hepatocelular** y **carcinoma colangiocelular** (120). Predominan distintos tipos de cáncer según sexo: **tumores de los túbulos renales** en ratas macho (**nefrocarcinogénica**) y tumores hepáticos en ratas hembras (121). FB1 es **inductor de daños oxidativos** (stress oxidativo) en hepatocitos de rata, aumentando la producción de radicales libres, daño celular y la muerte del hepatocito. Los efectos citotóxicos generados como la peroxidación de los lípidos de membranas y daños al ADN conducirían al desarrollo de hepatocarcinoma en ratas (122-123). Existe evidencia que los daños al ADN en los hepatocitos disminuyen notablemente por pretratamiento con antioxidantes protectores, como Vitamina E (-tocoferol), Selenio entre otros (124-125).

FB1 **causa DTN y defectos craneofaciales en cultivo de embriones de ratón in útero** y la administración de ácido fólico o un complejo de esfingolípidos es preventiva (103). Existe evidencia de un 79% de DTN en fetos expuestos, con la administración materna de FB1 durante la gestación temprana (126).

II-XV-III) En cerdos:

FB1 produce **hidrotórax** y **edema pulmonar intersticial (EPI)** (127), causado por insuficiencia cardíaca aguda del lado izquierdo (128-129). Es inductor de **anemia y leucocitosis** (130), **fibrosis pulmonar irreversible** (131) y **hepatonecrosis** (132). Es

un **Inmunosupresor** que **predispone a enfermedades infecciosas** en vista que: 1)- puede inhibir macrófagos intravasculares pulmonares afectando directamente la eliminación de partículas y bacterias de la circulación, (clearance) (133). 2)- altera la integridad del epitelio intestinal, por alteración de la proliferación y la función de barrera de la células intestinales, facilitando la entrada de agentes patógenos en el cuerpo (134). -3): disminuye la eficacia de la vacunación, por disminución significativa del título de anticuerpos (135).

II-XV-IV)- En Humanos:

Para la salud humana, las FBs representan una amenaza latente , porque pueden actuar como un "asesino silencioso", ya que su consumo en dosis muy pequeñas no induce síntomas clínicos evidentes, pero con el tiempo puede traer graves consecuencias, provocando **intoxicaciones crónicas**.

Las **intoxicaciones agudas** no son frecuentes. Se presentan como "brotes" en poblaciones expuestas, como lo sucedido en India en 1995, fueron 27 pueblos afectados. Las personas intoxicadas habían consumido sorgo y maíz, que cosechados permanecieron en los campos durante lluvias fuera de la estación (136). Los síntomas de la intoxicación : **dolores abdominales, borborigmos y diarreas transitorios**, que comenzaban entre media hora y una hora después de consumir pan ázimo, preparado con sorgo mohoso o maíz mohoso.La enfermedad era **autolimitante**. No hubieron defunciones y los pacientes se recuperaron por completo al suprimir la exposición a la toxina.La concentración de FB1 fue muy superior en el maíz y sorgo en los hogares afectados (136).

Las pautas que permiten sospechar la intoxicación son: 1- No es transmisible-. 2)- El tratamiento con drogas tiene poco o ningún efecto-.3)-En los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del hongo-4) -El brote está asociado comúnmente a un alimento específico-. 5)- El examen del alimento sospechoso, revela signos de actividad fúngica.

Numerosos estudios señalan que, las FBs en el hombre estarían implicadas en: - Cáncer de esófago (137-138).- Defectos del Tubo neural en bebés (139). -Infección por HIV (140). - Retraso en el crecimiento en niños- (141).

- **Cáncer de esófago:**

Hay evidencia inadecuada en seres humanos acerca de la carcinogenicidad de las fumonisinas, aunque existen pruebas suficientes en animales de laboratorio.

En ciertas poblaciones con incidencia anormalmente alta de cáncer de esófago -por ejemplo regiones de África del Sur (137), China, Italia, - se demostró una alta exposición a FBs y las condiciones ambientales favorables a la acumulación de la toxina en el maíz (alimento básico regional). Por tal motivo, fueron consideradas como “posibles carcinogénicas” y se incluyeron en el grupo 2B (IARC, 1993)(13). Sin embargo, el cáncer de esófago no se reprodujo en animales de experimentación ni aún con el suministro de fumonisina pura (138). Por lo tanto, se sospecha que la exposición a FBs puede ser un factor de riesgo para el cáncer de esófago (carcinoma de células escamosas, comúnmente asociado a consumo de tabaco y alcohol en varones).

- **Defectos del tubo neural (DTN)**

Los DTN son defectos congénitos del cerebro, la columna vertebral y la médula espinal. Se producen en el primer mes de embarazo, por fallas en el cierre del tubo neural in útero. Los DTN más comunes son la espina bífida y anencefalia en la cual, gran parte del

cerebro no se desarrolla. El consumo materno de folato, particularmente en el primer trimestre, es fundamental para reducir el DTN en fetos. Debido a que las fumonisinas alteran el metabolismo esfingolípido y el transporte de folato a través de las membranas celulares (103), se demostró que actúan como inductoras de DTN en ratones (126). Un estudio de DTN a lo largo de la frontera entre México y Texas en mujeres mexicanas americanas confirma que el consumo materno de maíz contaminado con FB1 durante el embarazo temprano (primer trimestre) se asocia a un mayor riesgo de DTN en poblaciones humanas que dependen en gran medida del maíz como alimento básico de la dieta (tortillas) (139).

- **Promueve Infección por HIV**

En África, en una zona de nivel socioeconómico bajo, un estudio relacionó directamente un "Alto consumo de maíz" con la "mortalidad por VIH" y con la "mortalidad por cáncer de esófago" (140). Los autores sugirieron que debe haber sido la fumonisina en maíz (y no Aflatoxina que se asocia a cáncer hepático), que influyó sobre la mortalidad por VIH. Mencionaron dos posibles mecanismos mediante los cuales la exposición a fumonisinas podría contribuir a la infección por VIH: 1) -el aumento de la permeabilidad de la membrana, que podría promover la transmisión del VIH. 2) -La interrupción de la biosíntesis de esfingolípidos, podría afectar la adhesión del VIH a las células humanas (140).

- **Retraso del crecimiento infantil:**

Las FBs se asociarían a retraso de crecimiento lineal (disminución de talla y peso) en niños en países en desarrollo. Según una investigación realizada en Tanzania, bebés recién nacidos fueron alimentados a base de maíz. A los 12 meses de la exposición, el crecimiento lineal de los niños fue en 1,3 cm más corto y 328 g menos de peso, en los

niños expuestos que superaron la ingesta diaria máxima tolerable, con respecto a los que no la superaron (141). La disminución de crecimiento sería causada por el daño intestinal mediado por inhibición de la ceramida sintasa (142). Especial atención requieren las coocurrencias AF, FUM y DON (sinergismo), también involucradas en retraso de crecimiento en niños (142).

En vista de la insuficiente evidencia acerca de la carcinogenicidad de FB1 en humanos, existen muchos reportes que describen investigaciones para evaluar la toxicidad en líneas celulares humanas, como por ejemplo células intestinales, hepatocitos, fibroblastos, células de colon, células epiteliales de esófago, células de túbulo proximales, queratinocitos etc..

***Alteración “inmunovigilancia tumoral” por disminución de la expresión del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) de Clase I, en células intestinales humanas,** in vitro (143). La vía de presentación del antígeno (HLA) de clase I, desempeña un papel importante en la inmunosupresión. Al disminuir la expresión del Antígeno en la superficie de las células, confiere ventaja de supervivencia a las células mutantes y podría conducir a una transformación maligna. Sin embargo, el papel en la carcinogénesis requiere más información (143).

*FB1 afecta el ciclo celular de las **células normales del hígado humano**. Normalmente la expresión de Ciclina E se asocia con progresión del ciclo celular y la expresión de P21 tiene acción antiproliferativa. FB1 actúa disminuyendo los niveles de expresión de la ciclina E y aumentando la expresión de P21 dando como resultado la detención del ciclo celular y la apoptosis (144).

*FB1 Inhibe la expansión clonal de **queratinocitos humanos y células epiteliales esofágicas humanas**, provocando daños tipo apoptótico en ambos tipos celulares (145) y en células derivadas de **túbulos proximales humanos** (146).

*FB1 induce estrés oxidativo en **células intestinales humanas** (147). FB1 y HFB1 inducen a apoptosis en **células de colon humanas**, mediada por la acumulación de esfinganina in vitro (148). Por lo tanto, es probable que FB1 y HFB1 sean tóxicas para la célula intestinal in vivo, lo cual explicaría los síntomas descritos por el consumo de maíz y sorgo mohoso con importantes niveles de FB1 en India (136).

La co-contaminación de alimentos con AFB1 y FB1 es ampliamente conocida en muchas partes del mundo (149-153) y ha sido implicada en el desarrollo de carcinomas hepatocelulares en humanos y animales (154).

Se planteó la hipótesis - en vista de la coocurrencia natural de AFB1, DON y FBs (las tres asociadas al cultivo de maíz)- que las FBs, de probado efecto carcinogénico en hígado de ratas (118) junto al DON favorecerían el desarrollo de la lesión inicial de AFB1 en el cáncer de hígado primario. Siendo ésta última uno de los más potentes carcinógenos hepáticos naturales conocidos (155).

II-XVI)- Métodos analíticos:

Por todo lo expuesto, es de suma importancia la detección de FBs en alimentos, para lo cual, se desarrollaron numerosas metodologías buscando sensibilidad, selectividad, y rapidez. Para desarrollar los protocolos correspondientes, primero es de importancia tener presente sus **características físico-químicas**: las FBs, por su estructura química son compuestos polares, por lo cual son solubles en solventes polares como el agua, acetonitrilo- agua y metanol e insolubles en solventes no polares. Son muy estables en

mezclas acetonitrilo-agua (1:1). FB1 y FB2 pueden mantenerse perfectamente por espacio de 6 meses a 25 °C en esta solución. En vista que no presentan ningún cromóforo ni grupos fluorescentes (no absorben UV ni visible ni fluorescen), la mayoría de los métodos analíticos utilizan derivatización para conseguir compuestos derivados detectables en el UV o fluorescentes.

Entre los métodos de detección y cuantificación de FBs se incluyen: **HPLC** (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), **GC-MS** (Cromatografía de Gas Acoplada a Espectrometría de Masas), **TLC** (Cromatografía Líquida en Capa Delgada), **métodos inmunoquímicos**, **CZE** (Electroforesis Capilar en Zona).

Para extraer fumonisinas de la matriz del alimento como piensos o cereales, se usa la metodología de extracción con solventes (metanol /agua 3:1, o acetonitrilo/agua); seguido de limpieza (purificación) mediante columnas. Para tal fin se emplean columnas de extracción en fase sólida (SPE). Éstas están rellenas con sílicas modificadas. En sus grupos silanoles, presentan sustituyentes capaces de interactuar con el analito por intercambio aniónico, por ejemplo: **(SAX)**. (contienen grupos de amina cuaternaria (+), que se usan para la extracción de ácidos débiles con una o más cargas negativas, como es el caso de las fumonisinas). Más recientemente se ha optado por el empleo de **columnas de inmunoafinidad**. En este caso se dispone de columnas empaquetadas con un relleno en el que se inmoviliza un anticuerpo específico frente al analito que se quiere determinar. Al pasar la muestra por la columna, da lugar a la captura selectiva del analito gracias a la especificidad del reconocimiento antígeno anticuerpo, mientras que otros componentes de la muestra eluyen sin retenerse en la columna. Posteriormente pueden eliminarse restos de extracto indeseables mediante un disolvente de lavado adecuado, y por último la etapa de elución permitirá obtener el analito aislado para su determinación

La Extracción en Fase Sólida (**SPE**) es la técnica más usual en el tratamiento de muestras antes de su análisis por HPLC, HPLC/MS, GC o GC-MS.

El derivatizante más usado es el ortoftaldehído (OPA) (156). Este reactivo que no tiene fluorescencia natural, la desarrolla al reaccionar con funciones aminas primarias. Como alternativa, se han propuesto con éxito otros agentes derivatizantes como por ejemplo: naftaleno 2-3 dicarboxaldehído (NDA) (157); fluorescamina (158-159); fluoresceína - isocianato (160) entre otros.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC): Es el procedimiento más utilizado para la cuantificación de fumonisinas en los alimentos destinados al consumo humano y animal. La metodología HPLC más empleada es la descrita por Shephard et al. (1990), (156), que se basa en extraer las toxinas del alimento con metanol/agua (3:1) y luego purificarlas en columnas SAX SPE, a continuación se deben derivatizar con OPA y las fumonisinas se separan mediante separación isocrática en una columna en fase reversa C18, y son cuantificadas mediante detección de fluorescencia. El límite de detección es 50 ng/g para FB1 y 100 ng/g para FB2 (156).

Métodos inmunoquímicos: La producción de anticuerpos monoclonales y policlonales contra fumonisinas ha permitido el desarrollo de ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas, más conocido como **ELISA**. Pueden ser competitivos directos e indirectos para buscar la toxina en alimentos, tejidos animales y cultivos de hongos. Es un método rápido, no requieren el uso de columnas de purificación (como los métodos antes citados) y los kits son portátiles y fáciles de usar, sin embargo, el problema de esta metodología es que tienden a sobreestimar el contenido de fumonisinas, particularmente en las muestras más contaminadas comparado con HPLC o GC-MS. Esta sobreestimación podría deberse a reactividad cruzada de los anticuerpos con otros compuestos de estructura

similar presente en los extractos no detectados por las otras metodologías o bien, a diferencias en la preparación previa de la muestra con respecto a los métodos citados. Previo al ELISA, se extraen las toxinas con solventes y no se utilizan columnas de purificación SPE. Por tal motivo, se recomienda confirmar los resultados de ELISA por HPLC.

Las etapas de un ensayo de ELISA directo competitivo se resúmen en la **Fig.NºII-VI**. 1) Se mezclan una porción del extracto de la muestra y una porción de la fumonisina-enzima (llamada conjugado o fumonisina marcada, generalmente la enzima es peroxidasa). 2) Se añade la mezcla preparada antes a los pocillos recubiertos de anticuerpos específicos antifumonisinas. 3) La fumonisina proveniente de la muestra compete con la fumonisina conjugada por los sitios de unión de los anticuerpos específicos (incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos) 4) Se lava (agua destilada) para eliminar la fumonisina libre (no unida al anticuerpo), 5) Se añade el sustrato de la enzima y desarrolla un color azul (Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de fumonisina en la muestra o el estándar. 6) Se añade una solución stop para detener la reacción enzimática. La intensidad del color de la solución en los pocillos de microtitulación se mide ópticamente usando un lector de ELISA con un filtro de absorbancia de 450 nm.

Muchas veces se necesita contar con resultados en el momento, en áreas remotas, los kits para pruebas a campo son la solución. Se usa la **inmunocromatografía de flujo lateral (LFD)** para la detección de FB1, FB2 y FB3 (161). El tiempo de análisis es de 3 a 5 minutos con un mínimo de materiales necesarios.

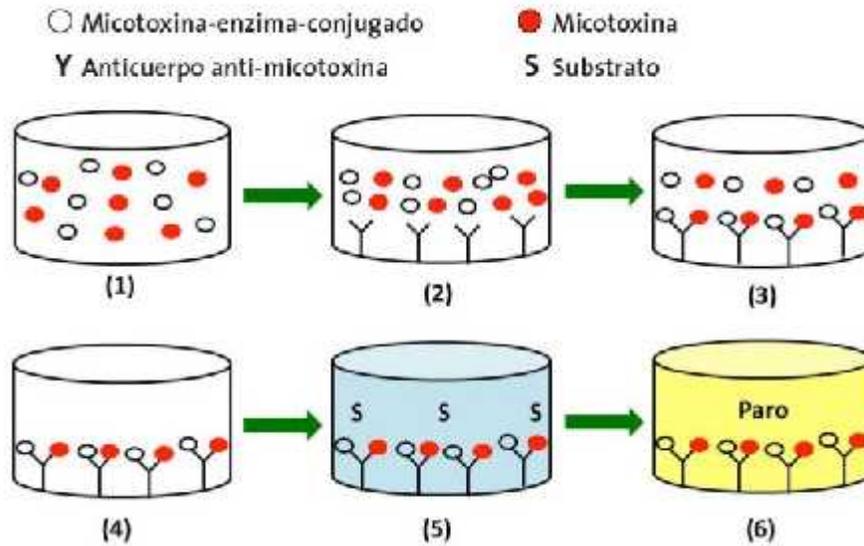


Fig.II-VI: ELISA Competitivo directo, para detección y cuantificación de fumonisin

Inmunosensores: Permiten detectar y cuantificar micotoxinas en comidas, se espera que se desarrollen en el futuro ya que tienen grandes ventajas respecto de los métodos tradicionales: minimizan la preparación de muestra, tienen respuesta rápida, y son portables. Por ejemplo **inmunosensores de fibra óptica** en formato competitivo para medición de FB1. Los anticuerpos monoclonales de fumonisina se acoplan covalentemente a una fibra óptica. Se usa FB1* marcada con fluoresceína (162) o isotiocianato de fluoresceína (163). Entonces FB1 y FB1* marcada compiten por unirse al anticuerpo acoplado a la fibra. La señal generada en el ensayo es inversamente proporcional a FB1. El sensor exhibe un intervalo de trabajo de 10-1000 ng de FB1 / ml y el límite de detección de 10 ng / ml. Estos valores se comparan favorablemente con los de técnicas de ELISA. El sensor muestra reactividad cruzada con FB2, pero no reacciona con FB1 hidrolizada, o TCA (163).

Últimamente se han desarrollado **inmunosensores electroquímicos** (164), el límite de detección es 5 µg/l, ofrecen menos costos de instrumentación que el de fibra óptica (164).

II-XVII)- Legislación vigente:

La necesidad de establecer una legislación para fijar límites en la concentración de FBs en alimentos para humanos y animales está reconocida en varios países del mundo. Prácticamente, todos los países que tienen una economía de mercado bien desarrollada, cuentan con reglamentaciones en lo que respecta a FBs. Sin embargo, muchos de los países que están en vías de desarrollo y donde la agricultura tiene una gran importancia, no tienen reglamentaciones para FBs, como por ejemplo la Argentina.

En Brasil, el LTM (Límite tolerable máximo) para la presencia de fumonisinas FB1+FB2= 1,5 ppm Según publicación de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), (165).

En el otro extremo del mundo, los países del viejo continente, integrantes de la Comunidad Europea (CE), el LMT= 1,00ppm (FB1 +FB2) para harina de maíz de consumo humano, según Reglamento CE 2006-2007 (166,167).

III- JUSTIFICACIÓN:

En vista de los riesgos potenciales para la salud humana y animal relacionados a la presencia de fumonisinas como contaminantes naturales del maíz y productos manufacturados derivados, como es el caso de la harina de maíz, y considerando las pérdidas económicas millonarias que azotan a la explotación agrícola-ganadera año tras año a nivel mundial por esta causa. En base a los antecedentes y si se estima la ausencia en la provincia del Chaco y regiones aledañas de laboratorios especializados en micotoxicología que cuenten con la infraestructura necesaria para llevar a cabo cuantificación de fumonisinas por técnicas convencionales, como lo es la HPLC (cromatografía líquida de alta presión), considerada como método de referencia que tiene el inconveniente del elevado costo de la instrumentación y alta capacitación del usuario. En el presente trabajo se propone evaluar la contaminación natural con fumonisinas en harinas de maíz comercializadas en Resistencia, Chaco utilizando un kit de ELISA disponible en el comercio, método que ha sido validado por el fabricante y que está recomendado como método de screening a utilizar en laboratorios que sólo cuenten con un lector de ELISA.

IV-HIPÓTESIS:

La harina de maíz comercializada en Resistencia, Provincia del Chaco, presenta contaminación con fumonisinas y la población está expuesta a dichas toxinas a través del consumo en la dieta de dicha harina, dichas toxinas puede ser cuantificadas por un método inmunoquímico (ELISA) más accesible que el método utilizado como referencia cromatografía líquida de alta resolución.

V- Objetivos:

V-I Objetivo general -Determinar los niveles de fumonisinas en muestras de harina de maíz envasadas y no envasadas (sueltas) que se encuentran a la venta para consumo humano en supermercados y almacenes de barrio de la ciudad de Resistencia ,a fin de determinar la incidencia natural de fumonisinas en harinas de maíz

V-II Objetivos específicos

- Determinar los niveles de fumonisinas utilizando un Kit comercial basado en el método inmunoquímico ELISA como método de screening.
- Comparar los datos obtenidos por ELISA de algunas muestras con datos obtenidos por un método basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Determinar los niveles de contaminación fúngica y especialmente con especies de *Fusarium* en algunas muestras seleccionadas
- Comparar los niveles detectados en las harinas en estudio con los niveles detectados en otras regiones del país

VI-MATERIALES Y MÉTODOS:

VI-I)- Muestreo:

Se evaluaron 30 muestras de harina de maíz envasada y 30 expandidas a granel (sueltas) en total 60, adquiridas en todos los casos en distintos comercios minoristas, supermercados y almacenes de barrio de la ciudad de Resistencia. Las muestras se adquirieron desde febrero, hasta julio de 2014 inclusive. Se consideró cada una constituida por un Kg. de harina de maíz envasada y suelta respectivamente (muestra universal) , de diferentes marcas, lotes, fechas de envasado y vencimiento .Sin embargo ninguna de las muestras a granel, contaron con datos de marca y número de lote, sólo fecha de envasado y vencimiento en 22 de las 30 kg analizados.

En vista que no todas las marcas envasadas vienen con presentaciones de 1 Kg, esto es 900; 800 ;700 y 500 g. En tales casos se adquirieron dos paquetes de las mismas características en el mismo comercio, (igual marca, número de lote, fecha de envasado y vencimiento.) El contenido de ambos paquetes fue vaciado en un tambor metálico con cierre hermético, donde se mezclaron con movimientos de agitación y rotación durante 5 minutos. Luego, se pesó exactamente 1Kg del producto mezclado. Los paquetes con presentación de 1 kg, se adquirieron sólo una unidad por comercio Considerando la no existencia de una gran disponibilidad de marcas del producto envasado, suficientes como para contar con 30 distintas, en algunas muestras se repitieron las marcas, pero con fecha de envasado, vencimiento y número de lote diferente. Las harinas expandidas sueltas, se compraron a razón de un kg por comercio.

VI-II)- Métodos:

Se usó el Kit comercial de ELISA competitivo directo “**Agra Quant Total Fumonisin** “ **Assay, Romer Lab** para la determinación cuantitativa de fumonisinas totales (FB1+FB2+FB3). El rango de cuantificación del método es 250 a 5000 ppb (ng/g) . El límite de detección es 200 ppb (ng/g), límite de cuantificación 250 ppb (ng/g)

VI-II-a) Preparación de la Muestra / Extracción: Se tomó una fracción de ensayo de cada muestra universal (1 kg), para lo cual, cada una se vació en el tambor metálico con cierre hermético y se procedió al mezclado como se indicó antes, para luego pesar exactamente 20 gramos de cada muestra.

Los 20g de muestra se dispusieron dentro de un recipiente plástico. Se agregaron 100 ml de la solución de extracción 70 /30 (V/V) de metanol en agua. Se tapó el recipiente y se agitó manualmente en forma enérgica, luego se mezcló en una licuadora durante 3 minutos. Se filtró con papel de filtro Whatman #1. Se recolectó el extracto filtrado cuyo pH se debía mantener entre 6 y 8, para lo cual se usó buffer fosfato a pH 7. Se diluyó el filtrado con agua destilada en una relación 1:20. (50 µl del extracto a 950 ul de agua destilada). La muestra diluída así obtenida, se usó para el test de ELISA.

VI-II-b) Ensayo de ELISA:

Se midieron 2 ml de conjugado por tira que se dispusieron en un tubo cerrado. Del conjugado se dispensaron 200 µl en cada pocillo de dilución del kit. A continuación, con una micropipeta se agregaron 100 ul de cada patrón. (0,00; 0,25; 1,0; 2,5; y 5,0 ppm espectivamente) y cada muestra dentro de los pocillos de dilución que contenía el conjugado. Se transfirieron 100 ul del contenido de cada pocillo de dilución a su correspondiente pocillo recubierto con anticuerpos. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, se efectuó el lavado en forma automatizada con agua

destilada 5 veces. Se eliminó todo resto de agua residual, golpeando ligeramente las tiras de pocillos sobre papel de filtro. Se dispuso en un tubo con tapa, la cantidad necesaria de sustrato (1 ml por tira). De éste se dispensaron 100 ul en cada pocillo recubierto. El color cambió al azul y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se dispuso en un tubo con tapa la solución stop, a razón de 1 ml por tira. A continuación se dispensaron 100 ul de dicha solución a cada pocillo de la tira. El color cambió del azul al amarillo. Por último, se leyeron las concentraciones usando el lector de ELISA.

Características del método:

El rango de cuantificación del método es 250 a 5000 ppb (ng/g) expresado en ppm (mg/Kg) 0,25-5 ppm . Para cuantificar muestras con niveles mayores de 5000 ppb deben diluirse los extractos, de manera que la medición se encuentre en el rango de cuantificación.

El límite de detección es 200 ppb (ng/g), límite de cuantificación 250 ppb (ng/g). Descrito como el punto correspondiente a la concentración más baja de la curva de calibración del ensayo donde puede detectarse y cauntificarse las fumonisinas.

VI-III) Materiales.

VI-III-1) Materiales provistos con el Kit:

- 96 pocillos recubiertos con anticuerpos (12 tiras de 8 pocillos) en una gradilla
- 96 pocillos de dilución, no recubiertos (12 tiras de 8 pocillos) en una gradilla
- 5 viales de 1.5 ml de cada patrón de fumonisinas (0.; 0.25; 1.0; 2.5 y 5.0 ppm)
- 1 botella de 25 ml de conjugado de fumonisinas (Tapa verde)
- 1 botella de 15 ml de Solución de Sustrato. (Tapa azul)

- 1 botella 15 ml de solución Stop. (Tapa roja)

VI-III-2) Materiales y reactivos necesarios no provistos por el Kit:

VI-III-2-a) Procedimiento de Extracción:

- 1) Licuadora
- 2) recipiente plástico con tapa (250 ml)
- 3) Balanza Ohaus- Model Scout ProSP401- Máx 400g; d= 0,1g
- 4) Probeta: 100 ml
- 5) Matraz :100 ml
- 6) Metanol p.a. (Biopack) para preparar solución al 70 % de metanol.
- 7) Agua destilada para preparar solución al 70% de metanol.
- 8) Papel de filtro Whatman #1
- 9) Embudos.
- 10) Micropipeta de 50 μ l
- 11) Cintas para medir pH
- 12) Solución buffer fosfato pH 7 – (NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4). Para ajustar el pH del extracto antes del comienzo del ensayo.

VI-III-2-b) Procedimiento del Ensayo:

- 1) **Agra Quant Total Fumonisin Assay 0.25 - 5.0 ppm** (Reorder: COKAQ 3000 (96 well). LOT 300207-1402. EXP.Date:7 feb 2015.
- 2) Micropipetas de 100 μ l y 200 μ l.
- 3) Cronómetro.

- 4) Agua destilada para lavado de pocillos
- 5) Toallas absorbentes.
- 6) Lector de ELISA(filtros de 450nm y 630 nm). Mindray - Model MR 96A /

WH-35104468T. Con filtro de absorvancia de 450 nm y filtro de referencia de 630 nm.

- 7) Lavador de microplacas: Mindray - Model MW-12A / WF-35102985

Una vez obtenidos los niveles de fumonisinas totales por ELISA como se indicó, las muestras fueron enviadas a la Universidad Nacional de Río Cuarto Córdoba, donde fueron procesadas en el Departamento de Microbiología e Inmunología, Laboratorio de Micología y Micotoxicología.

A partir de un gráfico de barras de los niveles de fumonisinas totales de las 60 muestras obtenidas por el método de ELISA, se establecieron tres rangos de concentraciones:

Bajo: 0,20 -3 ppm; Medio: 3-6ppm y Alto: 6-9 ppm .

Se seleccionaron 5 muestras de cada rango para proseguir con los análisis. En cada una se evaluó recuento de hongos totales y por especies de *Fusarium*. Además se efectuó la cuantificación de fumonisinas totales por HPLC, según la técnica descrita por Shephard et al, 1990 (156), modificada por Doko y col. 1995 (170).

1)- Análisis micológico:

1-a) Recuento general de hongos en el medio de cultivo Dichloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) de acuerdo a Pitt and Hocking 2009 (168).

1-b) Recuento de especies del género *Fusarium* en el medio de cultivo PCNB - pentaclorobenceno (Medio de cultivo Nash y Snyder) de acuerdo a Leslie and Summerell, 2006 (169).

2)- Análisis del contenido de fumonisinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC):

1. Extracción

Para determinar en un número seleccionado de muestras los niveles de fumonisinas utilizó el método de HPLC propuesto por Shephard y col., 1990 (156), modificado por Doko y col., 1995 (170). Se pesaron 25 gr de muestra y se realizó la extracción con 50 ml de metanol: agua (3:1), se agitó el extracto en shaker durante 30 min a 150 rpm, se filtró la muestra a través de papel de filtro y se procedió a la limpieza y extracción de las toxinas empleando columnas SAX. Se realizó un primer acondicionamiento de la columna con 5 ml de metanol y 5 ml de metanol: agua (3:1); luego se pasaron 10 ml del sobrenadante de extracción y finalmente se realizó una limpieza con 8 ml de metanol: agua (3:1) y 3 ml de metanol. La elución de las toxinas se realizó con 14 ml de metanol: ácido acético 0,5%. El extracto eluido fue recolectado y el solvente evaporado a sequedad a T° máx de 60°C. El extracto seco se resuspendió en 3 ml de metanol y se procedió al análisis por HPLC.

2. Derivatización y análisis

Se derivatizaron 50 ul del extracto preparado anteriormente agitando enérgicamente con 200 ul de solución derivatizante (40 mg O-ptaldialdehído + 1 ml metanol + 5 ml tetraborato de sodio 0,1 M + 50 ul 2-mercaptoetanol). Se inyectaron 50 µl para su

análisis en el HPLC. La fase móvil consistió de una mezcla de metanol: fosfato de sodio 0,1 M (75: 25) con el pH ajustado en $3,35 \pm 0,05$, y la corrida a un flujo de 1,5 ml/min. La detección de las toxinas se realizó empleando un detector de fluorescencia (excitación: 330 nm; emisión: 440 nm). Límite de detección de fumonisinas B₁ y B₂ y B₃ 20 ng/g. La recuperación del método para las fumonisinas es de 84 %.

Análisis de Datos: Los datos fueron procesados mediante el sistema operativo Excell, Se utilizaron gráficos para presentar los resultados y mediante gráficos de dispersión se compararon los niveles de fumonisinas obtenidos por los dos métodos de análisis.

VII) Resultados:

Los niveles de fumonisinas totales (FB1+FB2+FB3) obtenidos por ELISA para las 60 muestras evaluadas se describen en la **Tabla VII-I** El número de muestra indicado (N°) corresponde al orden de procesado. Las muestras se analizaron por duplicado y los resultados indicados resultaron del promedio de las dos medidas realizadas .

Tabla VII -I: Niveles de fumonisinas totales promedio en harinas de maíz (ppm) obtenidos por metodología de enzima inmunoensayo (ELISA)

N°	Muestra	(ppm)	N°	Muestra	(ppm)
M1	Envasada	2,484±S	M 31	Envasada	1,886±S
M2	Envasada	7,349±S	M32	Envasada	0,400±S
M3	Envasada	0,754±S	M33	Envasada	0,859±S
M4	Envasada	1,921±S	M34	Envasada	3,523±S
M5	Envasada	2,471±S	M35	Suelta	0,380±S
M6	Envasada	2,470±S	M36	Envasada	0,350±S
M7	Envasada	5,688±S	M37	Envasada	0,561±S
M8	Envasada	1,135±S	M38	Envasada	1,516±S
M9	Envasada	1,820±S	M39	Suelta	7,109±S
M10	suelta	0,383±S	M40	Suelta	0,202±S
M11	suelta	0,322±S	M41	Suelta	2,491±S
M12	Suelta	0,354±S	M42	Suelta	9,204±S
M13	Envasada	7,063±S	M43	Envasada	0,308±S
M14	Suelta	4,744±S	M44	Envasada	0,200±S
M15	suelta	4,383±S	M45	Suelta	2,118±S
M16	Envasada	2,123±S	M46	Suelta	7,001±S
M17	Suelta	7,760±S	M47	Suelta	0,220±S
M18	suelta	0,753±S	M48	Suelta	5,435±S
M19	Envasada	1,564±S	M49	Suelta	2,915±S
M20	Envasada	1,113±S	M50	Suelta	1,150±S
M21	Envasada	8,249±S	M51	Suelta	2,45±S
M22	Envasada	3,018±S	M52	Suelta	4,38±S
M23	Envasada	2,623±S	M53	Suelta	6,250±S
M24	Envasada	2,362±S	M54	Suelta	2,116±S
M25	Suelta.	1,496±S	M55	Suelta	2,919±S
M26	Suelta.	2,467±S	M56	Suelta	0,323±S
M27	Envasada	4,634±S	M57	Suelta	0,742±S
M28	Envasada	1,250±S	M58	Suelta	5,890±S
M29	Envasada	0,640±S	M59	Suelta	0,848±S
M30	Envasada	1,520±S	M60	Suelta	1,512±S

Siendo S= 2.40

De las 60 muestras sólo en tres (M40; M44 y M47) se obtuvieron valores dentro del límite de detección 0,20 ppm, mientras que en 11 de ellas los valores superaron las 5ppm (M2; M7; M13; M17; M21; M39; M42;M46; M48;M53 y M58). Estas últimas se diluyeron de manera que los niveles detectados se ubicaran en el rango de cuantificación del método.

Se distribuyeron las muestras en 3 rangos de concentraciones de acuerdo a los resultados

- Bajo: 0,20 – 3 ppm (M19, M41, M56, M57, M60)
- Medio: 3 – 6 ppm (M7, M22, M34, M52, M53)
- Alto: 6 – 9 ppm (M2, M21, M42, M46, M58)

Tabla VII-II: Recuento general de hongos y de especies de *Fusarium*. Géneros presentes y niveles de fumonisinas por metodología de cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Muestra	Rto. Gral. (DRBC) (UFC/gr)	Rto. <i>Fusarium</i> (Nash y Snyder) (UFC/gr)	Géneros presentes	FUM totales (ppm)	FB ₁	FB ₂	FB ₃
M2	9 x 10 ³	6 x 10 ³	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp	14,7	11,03	2,43	1,26
M7	4,6 x 10 ⁴	3,2 x 10 ⁴	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp	7,6	5,90	1,68	-
M19	2,5 x 10 ³	1,7 x 10 ³	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp, <i>Alternaria</i> spp	3,2	1,93	0,66	0,56
M21	3,7 x 10 ⁴	2,6 x 10 ³	<i>Fusarium</i> spp <i>Penicillium</i> spp	16,5	11,47	2,82	2,22
M22	>1 x 10 ⁵	3,5 x 10 ³	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Alternaria</i> spp	2	2,02	-	-
M34	2,8 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Alternaria</i> spp	3,9	2,75	0,56	0,57
M41	7 x 10 ³	6,5 x 10 ³	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp	3,8	2,90	0,66	0,20

M42	$3,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> <i>Penicillium</i> spp	25,2	16,49	6,77	1,92
M46	$>1 \times 10^5$	$4,8 \times 10^4$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp	8,9	7,32	1,57	-
M52	$>1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp	6,5	4,60	1,93	-
M53	3×10^4	$9,5 \times 10^3$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp- <i>Alternaria</i> spp	7,1	5,11	2,02	-
M56	6×10^2	$3,4 \times 10^2$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp	0,2	0,16	-	-
M57	$3,7 \times 10^2$	$6,5 \times 10^1$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp <i>Mucor</i> spp	0,6	0,56	-	-
M58	$1,8 \times 10^4$	2×10^3	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp	9	6,25	2,28	0,46
M60	$5,5 \times 10^3$	$3,7 \times 10^2$	<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp <i>Penicillium</i> spp	1,2	1,35	0,35	0,16

Límite de detección 20 ng/g. Los niveles de fumonisinas se expresan en ppm (mg/Kg).

Los recuentos de la micoflora se expresan en UFC/gr de muestra (unidades formadoras de colonia/gr de muestra)



Figura VII-I: Recuentos en el medio de cultivo de Nash y Snyder (arriba) y DRBC (abajo) mostrando las colonias típicas de los géneros aislados de las muestras de harina de maíz



Figura VII-II: Recuentos en el medio de cultivo DRBC mostrando las colonias típicas de los géneros aislados de las muestras de harina de maíz

Se recategorizaron las muestras, con la finalidad de facilitar el manejo de los resultados.

Se ubicaron del 1 al 30, en orden cronológico de procesado, separando las harinas sueltas de las envasadas. Se resume en la siguiente tabla:

Tabla VII-III- Recategorización de muestras sueltas y envasadas

N° (recategorizado)	Tipo de muestra	Concentración (ppm). ELISA	Tipo de muestra	Concentración (ppm)ELISA
1	Envasada	2,484 ±S	suelta	0,383 ±S
2	Envasada	7,349 ±S	suelta	0,322 ±S
3	Envasada	0,754 ±S	suelta	0,354 ±S
4	Envasada	1,921 ±S	suelta	4,744 ±S
5	Envasada	2,471 ±S	suelta	4,383 ±S
6	Envasada	2,470 ±S	suelta	7,76 ±S
7	Envasada	5,688 ±S	suelta	0,753 ±S
8	Envasada	1,135 ±S	suelta	1,496 ±S
9	Envasada	1,820 ±S	suelta	2,467 ±S
10	Envasada	7,063 ±S	suelta	0,38 ±S
11	Envasada	2,123 ±S	suelta	7,109 ±S
12	Envasada	1,564 ±S	suelta	0,202±S
13	Envasada	1,113 ±S	suelta	2,491±S
14	Envasada	8,249 ±S	suelta	9,204±S
15	Envasada	3,018 ±S	suelta	2,118±S
16	Envasada	2,623 ±S	suelta	7,001±S

17	Envasada	2,362 ±S	suelta	0,22±S
18	Envasada	4,634 ±S	suelta	5,435±S
19	Envasada	1,250 ±S	suelta	2,915±S
20	Envasada	0,640 ±S	suelta	1,15±S
21	Envasada	1,520±S	suelta	2,45±S
22	Envasada	1,886±S	suelta	4,38±S
23	Envasada	0,400±S	suelta	6,25±S
24	Envasada	0,859±S	suelta	2,116±S
25	Envasada	3,523±S	suelta	2,919±S
26	Envasada	0,350±S	suelta	0,323±S
27	Envasada	0,561±S	suelta	0,742±S
28	Envasada	1,516±S	suelta	5,89±S
29	Envasada	0,308±S	suelta	0,848±S
30	Envasada	0,200±S	suelta	1,512±S

S=2.40

1) Análisis de los resultados según metodología ELISA:

-Muestras envasadas: El promedio de FBs totales por ELISA en las muestras envasadas : 2,40 ppm ±S

De las 30 muestras envasadas, 8 (26,6%) presentaron concentraciones entre no detectable (0.20 ppm y 1,000 ppm) ; 9 (30%) entre 1,000 y 2,000 ppm; 7 (23,3%) entre 2,00 y 3,00 ppm y 6 (20%) mayores a 3,00 ppm.

-Muestras sueltas:

EL promedio de FBs totales por ELISA en muestras sueltas: 2,94 ppm ±S

De las 30 muestras sueltas: 10 (33,3%) presentaron niveles entre no detectable y 1,00 ppm; 3 (10%) entre 1,00 y 2,00 ppm; 7 (23,3%) entre 2,00 y 3,00 ppm y 10 (33.3%) concentraciones superiores a 3.00 ppm.

En base a los resultados obtenidos se puede inferir que el (30%) del total de muestras (envasadas más sueltas) presentaban valores comprendidos entre el límite de detección y 1,00 ppm. El (20%) entre 1,00 y 2,00 ppm y 24% entre 2,00-3,00 ppm. El 26% mayor a 3,00 ppm.

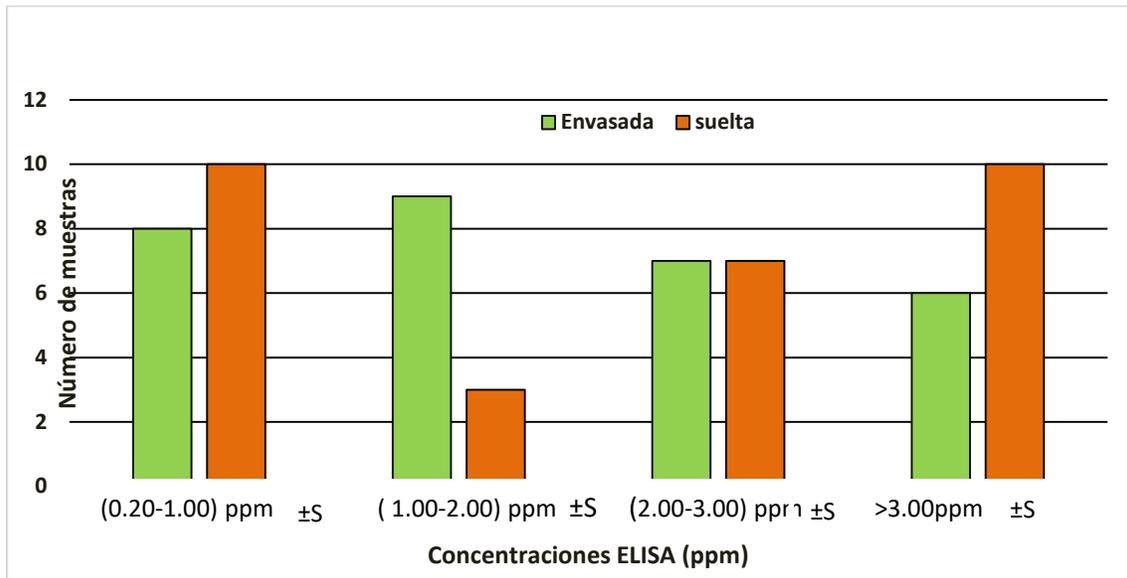
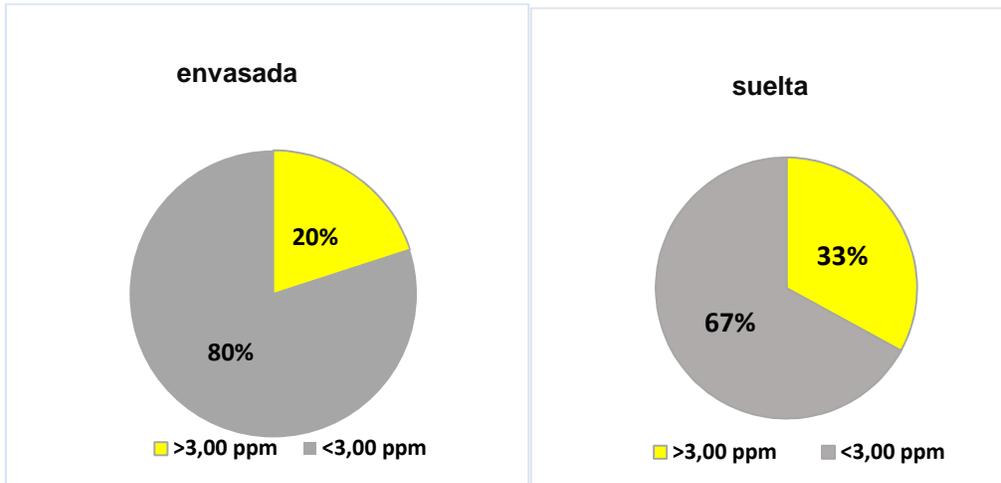


Figura VII-III: Frecuencia de concentraciones de FBs (ppm) por enzima inmunoensayo (ELISA) en muestras de harina de maíz envasada y suelta

Se pudo observar nivel mayor de contaminación en la harina de maíz comercializada suelta. El 26,6% (16) del total de muestras analizadas presentaron niveles > 3,00 ppm siendo el 16,6 % (10) correspondiente a la harina expendida a granel y el 10%(6) envasada. En las figuras VII-IV y VII-V se muestran los porcentajes, según total de muestras envasadas y sueltas respectivamente.

Se observó mayor número de muestras con valores superiores a 3,00ppm en la forma de comercialización **suelta (33%)** con respecto a la **envasada (20%)**. Por lo tanto la primera presentó niveles más altos de contaminación.



(Izq.)FiguraVII-IV: Concentración de FBs (ppm) por enzima inmuno ensayo (ELISA) en harina de maíz envasada. (Der.)FiguraVII-V : Concentración de FBs (ppm) por enzima inmuno ensayo (ELISA) en harina de maíz suelta.

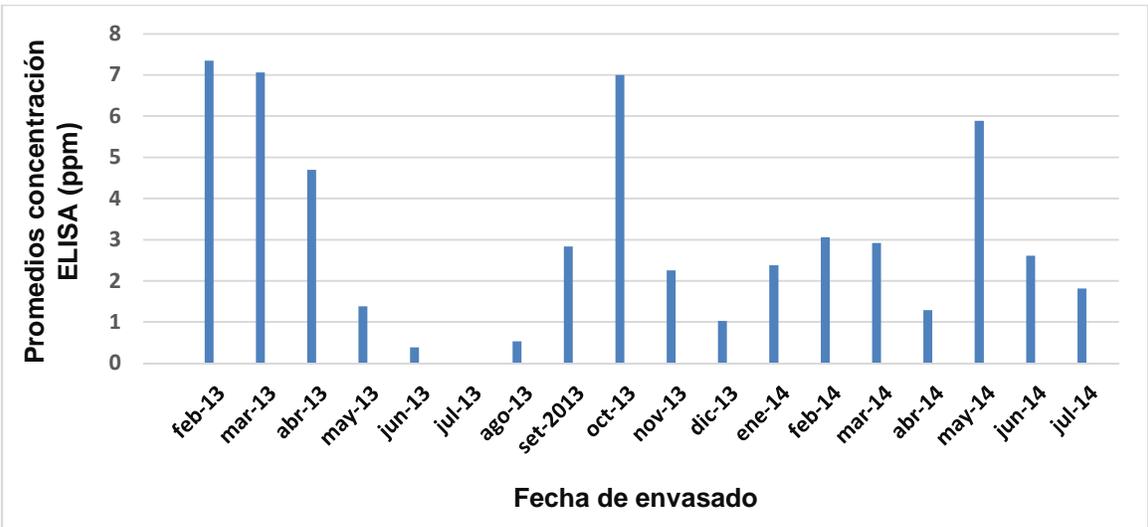
El 50% del total de muestras (30) fueron adquiridas en almacenes bajo la forma de expendio suelta. Mientras que las envasadas se adquirieron en almacenes (14) 23,3% y supermercados (16) 26,6%.



Figura VII-VI : Distribución del promedio de FBs por ELISA (ppm) según tipo de comercio y formas de comercialización

Para muestras de almacén se obtuvieron: niveles promedio 2,21 ppm±5 en las muestras de harinas envasadas y en las muestras comercializadas sueltas: 3,00 ppm±5 . El promedio total de FBs de las muestras de almacén (envasadas+ sueltas): 5,21ppm ±5. Sin embargo, el promedio de las muestras de supermercados (todas fueron envasadas): 2,50ppm±5. Por lo tanto el mayor grado de contaminación corresponde a muestras sueltas adquiridas en almacenes, seguida de envasadas de supermercados y por último envasadas de almacenes.

En vista que el procesamiento por enzima inmuno ensayo (ELISA) se realizó entre mayo y julio de 2014 (**Fig.VII-VII**), se observa que los más altos niveles de FBs se correspondieron con fechas de envasado durante los primeros meses del año 2013, (febrero, marzo, abril) y octubre del mismo año. Por lo tanto, se puede inferir que considerando el tiempo transcurrido desde el envasado hasta el procesamiento, se observó una tendencia a mayores contaminaciones en las harinas que llevaban mayor tiempo de envasado.



FiguraVII-VII : Promedio de Concentraciones por ELISA (ppm) en función de la fecha de envasado

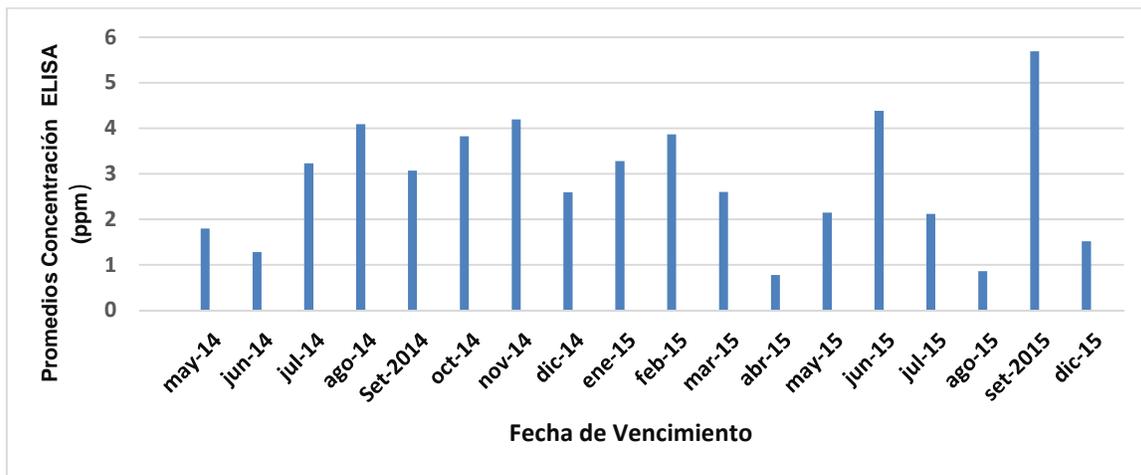


Figura VII-VIII : Niveles de FBs (ppm) por por enzima inmuno ensayo (ELISA) según fecha de vencimiento

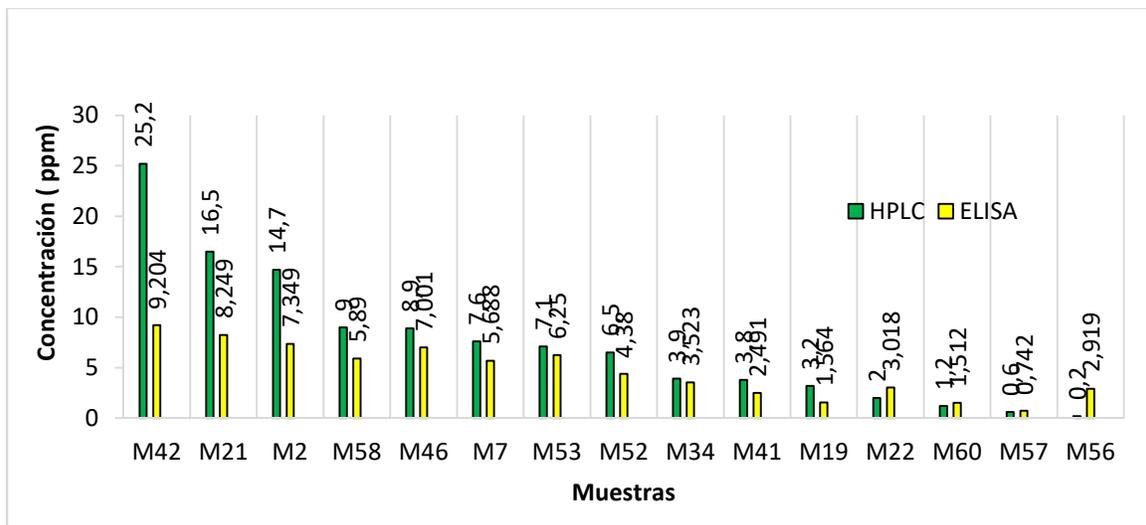
Las muestras fueron procesadas de mayo a julio de 2014, como se expresó, sería de esperar que cuanto más tiempo falte para el vencimiento, más bajos sean los valores, sin embargo dicha asociación no se observa, Por el contrario, las muestras próximas a vencer (mayo y junio de 2014) presentaron menores niveles que harinas con vencimiento mayor a un año de esa fecha, por ej. septiembre de 2015 .

2) Análisis de los resultados según metodología cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

En las 15 muestras (100%), FB1 mostró niveles mayores a FB2 y FB3. Sin embargo FB2 > FB3 en 11 muestras (73%). Mientras que en las 4 restantes ,1 de ellas con FB3 >FB2 (M34), y en 3 solamente se detectó FB1(M22; M56 y M57).El promedio de fumonisinas por HPLC: FB1= 5,32ppm , FB2= 1,41 ppm y FB3= 0,45 ppm

De las muestras evaluadas (n= 60) se seleccionaron 15 que se procesaron por las dos metodologías. El promedio de FBs totales por el método de ELISA fue de 4,65 ppm y

por metodología HPLC fue de 7,36ppm La relación HPLC/ ELISA= 1,63. En 12 muestras las concentraciones por HPLC fueron mayores, sólo en las muestras M22; M56 y M60 los resultados fueron mayores por ELISA. Es destacable que las dos metodologías analíticas no se practicaron en forma simultánea. En la figura VII-IX se observa que cuanto mayores son las concentraciones por ELISA más grande es la diferencia respecto a las mediciones por HPLC. Sin embargo, si se considera el rango de cuantificación del Kit de ELISA (0,25 y 5,00 ppm) , las diferencias medidas en ese intervalo resultan menores entre ambas metodologías.



FiguraVII-IX : Niveles de FBs (ppm) determinados por HPLC y ELISA

En la siguiente figura de dispersión se observan las líneas de tendencia de las dos metodologías analíticas. Existe una zona de “superposición “entre los dos métodos analíticos, aproximadamente entre las lecturas 9, 10 ,11 , 12, 13, y14 que corresponden a valores en el rango de medición del kit de ELISA. En dicha zona se presentan menores dispersiones entre ambos métodos.

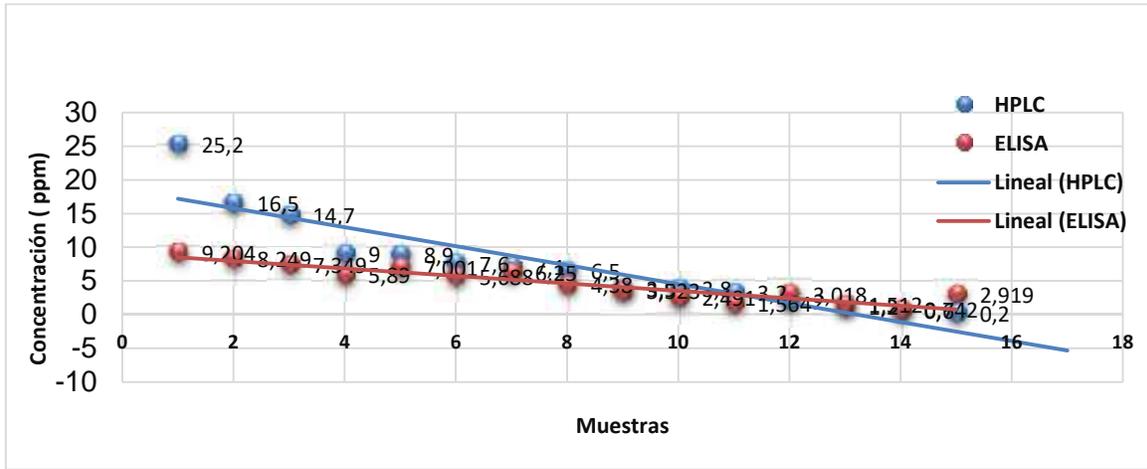


Figura VII-X: Comparación de Metodologías HPLC y ELISA

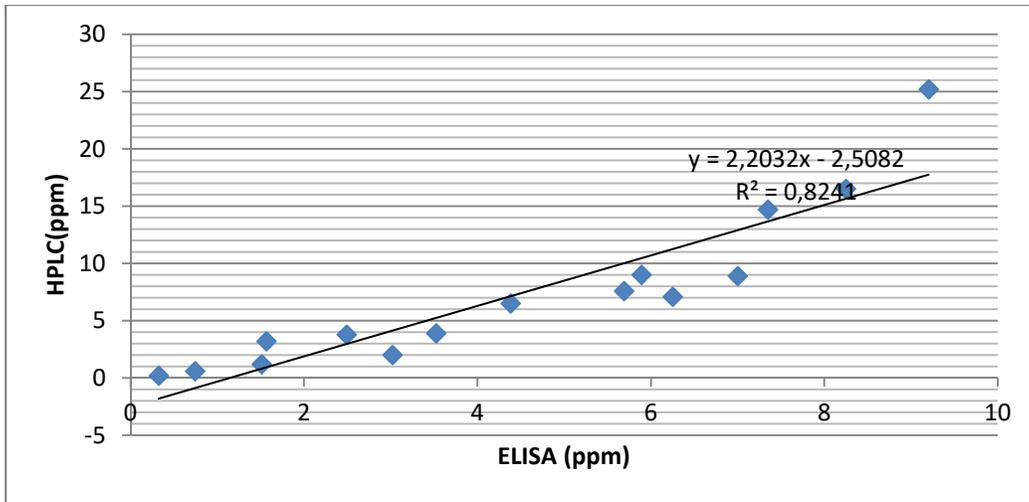


Figura VII-XI: Correlación entre los niveles obtenidos 'por HPLC y ELISA

3) Recuento de hongos

En las 15 muestras evaluadas se aislaron especies del genero *Fusarium*, entre dichas especies *Fusarium verticillioides* fue la principal especie identificada, la especie principal productora de fumonisinas, en 13 muestras (87%) se aislaron especies de *Aspergillus* y en 9 (60%) especies de *Penicillium* ; en 4 (27%) especies de *Alternaria*, en 1 (7%)

Aspergillus sección *Flavi* y *Aspergillus* sección *Nigri* y *Mucor* spp. respectivamente. (Figura VII-XII. De todos los aislamientos sólo *Penicillium* y *Mucor* no son productores de FBs.

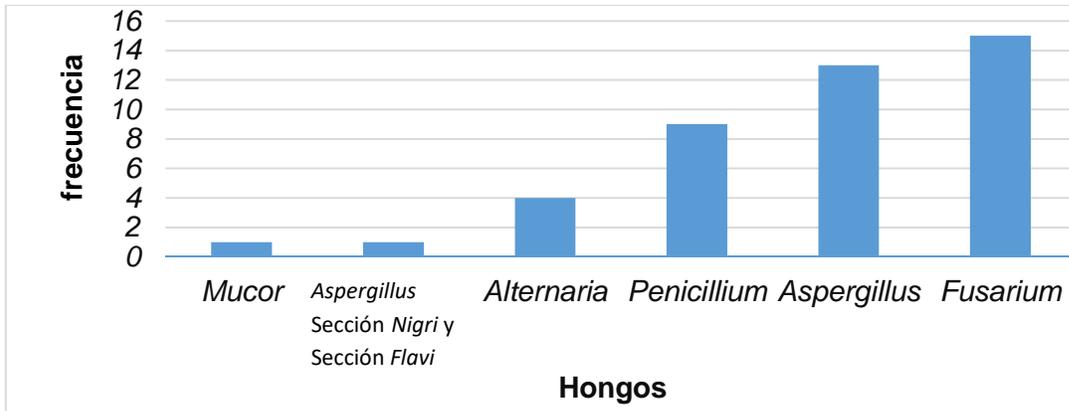


Figura VII-XII: Géneros fúngicos aislados en las muestras de harina que fueron analizadas para determinar la contaminación con fumonisinas por HPLC

El promedio de recuento de hongos totales fue $>3,46 \times 10^4$ UFC/gr y el promedio de recuento de *Fusarium* fue $1,0 \times 10^4$ UFC/gr

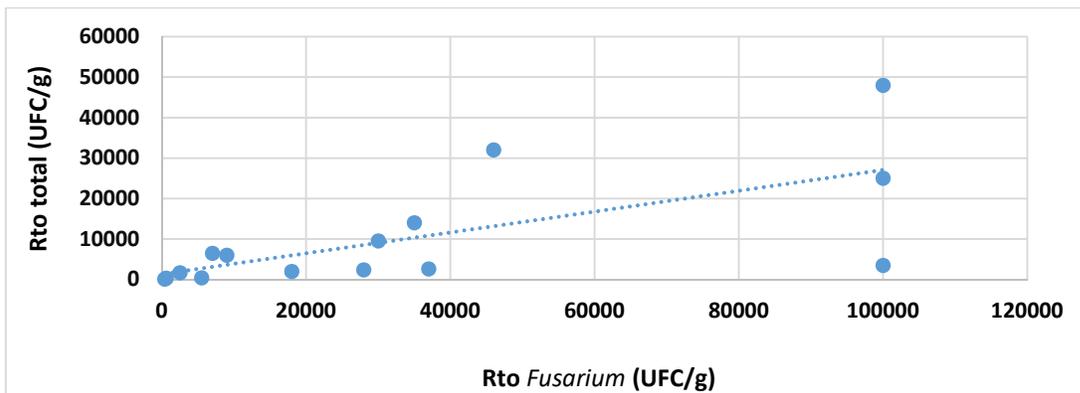


Figura VII-XIII: Relación entre recuento total de hongos y recuento de *Fusarium* spp

Se observa la existencia de una cierta relación entre los Rtos de hongos totales y Rto de *Fusarium* a recuentos bajos. Sin embargo cuando los recuentos aumentan, las dispersiones son marcadas y se pierde tal relación. Podría inferirse que a bajas concentraciones el contaminante principal es *Fusarium* spp y por lo tanto, el Rto de hongos totales es a expensas de *Fusarium* spp. principalmente.

En la figura VII-XIV, se analizan las coocurrencias de los géneros aislados. En 6 de 15 muestras (40%) se aislaron especies de los géneros *Fusarium*; *Aspergillus* y *Penicillium*, seguido de *Fusarium*; *Aspergillus*; *Alternaria* en 3 (20%) y *Fusarium*; *Aspergillus* en 3 (20%). En 1 de 15 muestras (6,66%) se aislaron especies de *Fusarium*; *Aspergillus*; *Penicillium* y *Alternaria*_ *Fusarium* y *Penicillium*_ *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor*.

La co-ocurrencia de especies de *Fusarium* - *Aspergillus* se observó en 14 de las 15 muestras (93%), lo cual permite inferir que existiría posibilidad de coocurrencia de fumonisinas- aflatoxina en las muestras, con el agravante que ello implica.

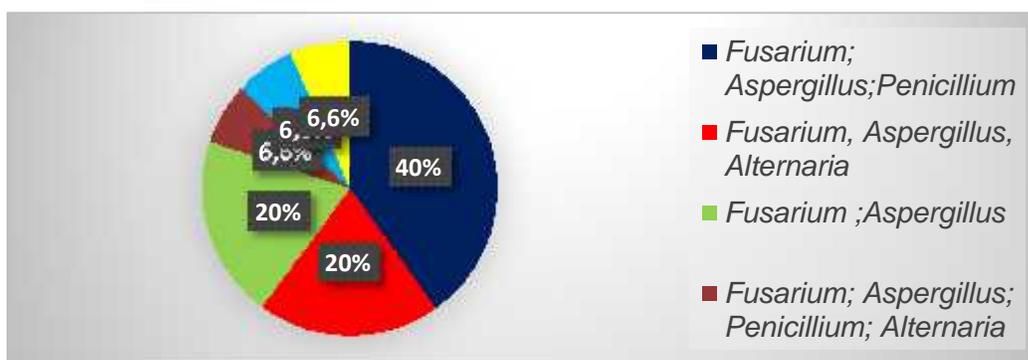


Figura VII-XIV: Co-ocurrencia de contaminación fúngica en las muestras de harina de maíz

VIII)- DISCUSIÓN:

La presencia de FBs en el total de muestras analizadas, permite inferir que existe riesgo de exposición de la población de Resistencia por consumo de harina de maíz. Siendo las comercializadas sueltas las que presentan el mayor grado de contaminación, lo cual podría ser el resultado, al menos en parte, por la mala conservación del producto en los lugares de expendio. En varios establecimientos de venta, las harinas se exponían a la vista del cliente en contenedores abiertos (bolsas plásticas) sin ningún tipo de cierre, totalmente expuestas a la humedad ambiente, lo que condiciona una mayor posibilidad de rehidratación y desarrollo de especies de *Fusarium* y contaminación por FBs.

Un gran número de reseñas basadas en estudios comparativos de ambas metodologías demostraron que las mayores estimaciones se obtienen por ELISA (171-173). Sin embargo, en el presente trabajo los niveles por ELISA fueron menores a los encontradas por HPLC. Tal hallazgo podría justificarse según dos situaciones: Probablemente el método de extracción previo al ELISA no fue eficiente y/o seguramente es de gran influencia el hecho que ambos métodos no se realizaron en simultáneo. Sin duda, **la fase extractiva** de FBs de la matriz de la harina es probablemente la más influyente del análisis y quizá donde se cometan la mayor cantidad de errores. Si bien el kit de ELISA Agra Quant provisto por Laboratorio Romer, ha sido validado para cuantificar fumonisinas totales en harina de maíz, podrían ocurrir interacciones de la toxina con interferentes presentes en la harina (uniones químicas) y no serían detectadas. Recordar que el método ELISA no tiene etapa de purificación, a diferencia de HPLC (84), lo cual justificaría al menos en parte, los menores niveles de FBs medidos con ELISA, sobre todo a concentraciones altas, donde la dispersión entre ambos métodos es muy marcada. Es de consideración que el proceso extractivo debe

realizarse lo más rápido posible, a sabiendas que las FBS son inestables en solución de metanol, lo cual puede ser un verdadero problema cuando se procesan varias muestras por tanda. -Se efectuaron 11 procesos extractivos por tanda-. Deben respetarse los tiempos de agitación - tiempos acortados conducirían a una subestimación de FBS-. Los extractos deben tener un pH entre 6 y 8, -lo cual requiere riguroso control y ajuste-. Condiciones de excesiva acidez o alcalinidad pueden afectar el resultado de la prueba.

Durante el **ensayo de ELISA**, los tiempos de incubación diferentes a los indicados en los protocolos de trabajo pueden inducir a resultados inexactos, sobre todo cuando se procesan varias muestras a la vez. Si las consideraciones citadas durante la **fase extractiva** y el **ensayo de ELISA** no se llevan a cabo convenientemente, podrían resultar subestimaciones en la cuantificación.

La metodología HPLC se llevó a cabo aproximadamente dos meses después que el método ELISA, con lo cual la contaminación fúngica y el contenido de FBS habrán seguido en aumento con el agravante de las mayores cuantificaciones por HPLC. Lo conveniente, a fines comparativos, hubiese sido el procesamiento en simultáneo por los dos métodos.

Se encontró una buena relación entre las dos metodologías analíticas, alrededor de 82%.

El 30% de muestras analizadas registraron concentraciones entre niveles no detectados y 1,00 ppm, (8 envasadas y 10 sueltas) cumpliendo con las reglamentaciones vigentes en la CE (166,167) . En cambio el 40% de las muestras (11 envasadas y 13 sueltas) presentaron niveles entre no detectable y 1.50 ppm., ajustándose a la reglamentación que rige actualmente en Brasil para harina de maíz de consumo humano (165).

La co-contaminación de alimentos con AFB₁ y FB₁ es ampliamente conocida en muchas partes del mundo y ha sido implicada en el desarrollo de carcinomas hepatocelulares en humanos y animales (154). En Argentina se demostró la coexistencia de estas micotoxinas en maíz y alimentos derivados (42,174). En este estudio, es muy probable la coocurrencia AFB₁ y FB₁, en vista que en el 93 % de las muestras se aislaron *Fusarium* sp y *Aspergillus* sp, siendo este último un importante productor de aflatoxinas (*Aspergillus flavus*), lo cual representaría un riesgo aún mayor para la salud humana y animal: micotoxicosis y sinergismo (155).

Se aislaron especies de los géneros más importantes productores de micotoxinas, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Penicillium* (175).

Un estudio (en grano de maíz, no en harinas) revela que uno o ambas especies del género *Fusarium* (*verticillioides* y *proliferarum*) pueden tener una frecuencia de ocurrencia de 90% o más (176), afirmación que concuerda con el presente estudio, ya que de las especies de *Fusarium* aisladas un mayor porcentaje fue *Fusarium verticillioides*.

Estudios realizados en harina de maíz en Buenos Aires, (período octubre 1996- enero 1997) demostraron niveles entre no detectables y 186 ppm de FB₁ y entre no detectado y 16,8 de FB₂ (55), los cuales concuerdan con los niveles observados en el presente estudio. Sin embargo, en el período enero 1998 los niveles detectados en muestras de Buenos Aires fueron FB₁: 7,5ppm a 498,7 ppm y FB₂: de no detectable a 181,8 ppm (55). En Resistencia, sólo resultan comparables los encontrados para FB₂, no así los de FB₁ que fueron muy superiores en Bs.As. Así mismo, los promedios hallados en este estudio guardan relación con los niveles encontrados en Sao Paulo; Brasil para FB₁: 0,5 a 7,2 ppm y FB₂: 0,1 a 1,8 ppm (52) y con los detectados en Estados Unidos para FB₁: 5- 20.5 ppm (53). Por otro lado, muestras analizadas en Italia presentaron niveles

de FB₁: 42 a 376 ppm y FB₂: 8 a 91mg/Kg (54), muy superiores a las encontradas en Resistencia . En un estudio de las fracciones de la molienda en seco, en un molino industrial de Argentina - para harina de maíz tipo C- se encontraron niveles de FB₁: 0,358 ppm, FB₂: 0,122 ppm y FB₃ 0,0459 ppm (64). Muy por debajo de los promedios hallados en Resistencia.

IX)- CONCLUSIONES:

Se cumple la hipótesis :La harina de maíz comercializada en almacenes y supermercados minoristas de Resistencia presenta contaminación con FBs y la población estaría expuesta a dichas toxinas a través del consumo en la dieta de dicha harina , las toxinas pueden ser cuantificadas por un método más accesible que el usado como referencia. Este marco de situación indica la necesidad de una adecuada vigilancia y monitoreo para la prevención de la contaminación con hongos y fumonisinas.

El 30% de las muestras se ajustaron a las Reglamentaciones vigentes en la CE (Comunidad Europea) y el 40% con la reglamentación de Brasil (ANVISA) mientras que el 50% se ajustaron a las reglamentaciones vigentes en Argentina desde 2019.

Las muestras con mayor grado de contaminación fueron las harinas, que se adquirieron en su totalidad en almacenes, seguida de las envasadas compradas en supermercados y las envasadas expandidas en almacenes.

Los niveles más altos de FBs se asocian a muestras de más vieja data de envasado.

No se observó relación entre altos niveles de FBs con muestras cercanas a la fecha de vencimiento.

Según metodología ELISA, el 30% del total de muestras tienen valores comprendidos entre 0,00 y 1,00 ppm. El 20% entre 1,00 y 2,00 ppm y 24% entre 2,00-3,00 ppm. El 26% mayor a 3,00 ppm. Por HPLC los promedios fumonisinas totales= 7,36ppm; FB1= 5,32ppm; FB2= 1,41 ppm y FB3= 0,45 ppm. Los promedios de fumonisinas totales por ELISA para el total de muestras: $2,67 \pm S$ ppm y para las 15 muestras procesadas por

HPLC :7,36 ppm y ELISA : 4,67ppm, La relación HPLC/ ELISA =1,63. Se detectó FB₁ en niveles mayores a FB₂ y FB₃ en harina de maíz.

El método de ELISA requiere de un equipamiento (lector de ELISA) que no es muy costoso y los anticuerpos aportan al ensayo la ventaja de una alta especificidad; no obstante, pueden presentarse interferencias con la matriz de la harina analizada lo que podría dar como resultado una subestimación de FBs. Es importante realizar en cada laboratorio la caracterización del método a utilizar determinado los parámetros de recuperación, límite de detección, reproducibilidad del método. En el presente estudio no se llevo a cabo por razones de costo y falta de disponibilidad de medios

El método de ELISA podría usarse como screening para la cuantificación de FBs en harina de maíz en este caso en el rango establecido por el proveedor del Kit 0,25 -5,00 ppm.

Los 3 géneros aislados mayoritariamente (40%) *Fusarium*; *Aspergillus* y *Penicillium* incluyen especies potencialmente productoras de micotoxinas. En el 100% de muestras se aislaron especies de *Fusarium*,

En el 93% de las muestras se observó coocurrencia de especies de *Fusarium* y *Aspergillus*. Por lo tanto es muy probable la co-ocurrencia de -fumonisinas y aflatoxinas con el agravante que la población podría estar expuesta a ambas micotoxinas, frente al consumo de harina de maíz y derivados.

En las muestras se observó coocurrencia de los siguientes géneros : (40%) *Fusarium*; *Aspergillus*; *Penicillium*;- (20%) *Fusarium*; *Aspergillus* y *Alternaria*;- (20%) *Fusarium* *Aspergillus*;- (6,6%) *Fusarium*; *Aspergillus*; *Penicillium*; *Alternaria*;- (6,6%) *Fusarium*; *Penicillium*;- (6,6%) *Fusarium*; *Aspergillus*; *Penicillium*; *Mucor*.

En el presente trabajo se planteó la evaluación de la incidencia natural de fumonisinas en harina de maíz a través del uso de un método de inmunoensayo (ELISA). Es frecuente en la zona el consumo de platos típicos tradicionales, a base de harina de maíz, como por ejemplo: “sopa paraguaya”, polenta, “mbaipú”, “vorí vorí” por lo que los consumidores del Chaco estarían expuestos a través de la dueta a la fumonisinas. Se debe tener en cuenta que los efectos de la fumonisinas en la salud generalmente son crónicos y se pueden manifestar con reducción de la tasa de crecimiento en niños (La población infantil es más sensible a las fumonisinas que la adulta),, además de trastornos inmunológicos, entre otros.

A partir del año 2019, Argentina Reglamentó los niveles máximos permitidos para fumonisinas en maíz y derivados: 2.00ppm. Es importante poder evaluar la contaminación de los productos que pueden estar contamiandos con fumonisinas para poder determinar el riesgo toxicológico de las pobalciones en distintas regiones del país y establecer mecanismos de control a través de las autoridades competentes.

El presente estudio contribuye al área de la Micotoxicología con datos de contaminación natural de fumonisinas. La micotoxicología es una disciplina cuyo desarrollo comenzó en la década de los 60 con el descubrimiento de las aflatoxinas.

El avance de la micotoxicología necesita del aporte de distintas disciplinas tales como la micología, la fitopatología, la química, la medicina veterinaria, la medicina, la biología entre otras dado el impacto de los hongos toxicogéncios y las micotoxinas en las cadenas alimentarias del hombre y los animales.

X- BIBLIOGRAFIA

- (1) Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003; (16): 497-516.
- (2) Bryden WL. Mycotoxins in the food chain: human health implications. Asia Pac J Clin Nutr. 2007; 16 (Supl1): 95-101.
- (3) Sainz MJ, Aguin O, Bande MJ, Pintos C, Mansilla JP. Biodiversidad de especies de *Fusarium* en tallos de maíz forrajero de Galicia. Pastos. 2012; 42 (1): 51-66.
- (4) Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G, et al.. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J Chem Soc Chem Commun .1988; 743-5.
- (5) Cawood ME, Gelderblom WC, Vleggaar R, Behrend Y, Thiel PG, Marasas WF. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. J Agric Food Chem. 1991; 39 (11): 1958-62.
- (6) Seo JA, Lee YW. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. Appl Environ Microbiol.1999; 65 (3): 1331-34.
- (7) Mansson M, Klejnstrup M, Phipps R, Nielsen K, Frisvad J, Godfredsen C, et al. Isolation and MNR characterization of fumonisins B2 and e new fumonisins B6 from *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. 2010; 58 (2): 949-53.
- (8) Nelson PE, Desjardins AE, Plattner RD. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. Annu Rev Phytopathol. 1993; 31 (1): 233-52.
- (9) Seo J A, Kim JC, Lee YW. Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*. J Nat Prod .1996; 59 (11):1003-5.
- (10) Poling SM, Plattner RD. Rapid purification of fumonisins and their hydrolysis products with solid-phase extraction columns. J Agric Food Chem. 1999; 47(6): 2344-9.
- (11) Plattner RD, Weisleder D, Shackelford DD, Peterson R, Powell RG. A new fumonisin from solid cultures of *Fusarium verticillioides*. Mycopathol .1992; 117: 23-8.
- (12) Marasas WFO. Fumonisins: History, World-Wide Occurrence and Impact. In: Fumonisins in Food. Springer, Boston, MA; 1996. p. 1–17.
- (13) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Int Agency Res Cancer. 1993.
- (14) Moretti A, Ferracane L, Somma S, Ricci V, Mulè G, Susca A, et al. Identification, mycotoxin risk and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fig endosepsis in

Apulia, Italy. Food Addit Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2010; 27(5):718-28.

(15) Chen J, Mirocha CJ, Xie IW, Hogge L, Olson D. Production of the Mycotoxin Fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. Appl Environ Microbiol. 1992; 58 (12): 3928-31.

(16) Abbas HK, Riley RT. The presence and phytotoxicity of fumonisins and AAL-toxin in *Alternaria alternata*. Toxicon. 1996; 34(1): 133-6.

(17) Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. 2007; 55(23): 9727-32.

(18) Logrieco A, Ferracane R, Haidukowsky M, Cozzi G, Visconti A, Ritieni A. Fumonisin B(2) production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. Food Addit Contam .2009; 26(11):1495-500.

(19) Goswami RS, Kistler HC. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Mol Plant Pathol. 2004; 5 (6): 515-25.

(20) de la Torre-Hernández ME, Sánchez-Rangel D, Galeana-Sánchez E, Plasencia-de la Parra J. Fumonisin-síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. TIP Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas. 2014; 17(1):77-91.

(21) Magan N, Lacey J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans Br Mycol Soc.1984; 82 (1): 83-93.

(22) Soriano JM, Dragacci S. Occurrence of fumonisins in foods. Food Res Int.2004; 37(10): 985-1000.

(23) Magan N, Lacey J. Effects of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. Trans Br Mycol Soc .1984; 82(2): 305-14.

(24) Marín S, Magan N, Ramos AJ, Sanchis V. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology. J Food Prot.2004; 67(8): 1792-1805.

(25) Marin S, Sanchis V, Magan N. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. Can J Microbiol. 1995; 41(12): 1063-70.

(26) Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina; 2003. 118 p.

(27) Munkvold GP. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. Annu Rev Phytopathol. 2003; 41(1): 99-116.

- (28) Lacey J. Pre-and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *J Appl Bacteriol.*1989; 67(s18): 11s-25s.
- (29) Anadón A, Céspedes A, Caballero V, Martínez-Larrañaga M, Martínez M. Mycotoxins of major impact in pig production and human health implications. *Avances en Tecnología Porcina (España)*. PRODIVE; 2004.
- (30) Bluhm BH, Woloshuk CP. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant Microbe Interact.* 2005; 18(12): 1333-9.
- (31) Proctor RH, Desjardins A E, Plattner RD, Hohn T M. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet Biol.* 1999; 27(1): 100-12.
- (32) Seo JA, Proctor RH, Plattner RD. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* 2001; 34(3): 155-65.
- (33) Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 2003; 38(2): 237-49.
- (34) Brown DW, Cheung F, Proctor R H, Butchko RA, Zheng L, Lee Y, et al. Comparative analysis of 87,000 expressed sequence tags from the fumonisin-producing fungus *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* 2005; 42(10): 848-61.
- (35) Desjardins A E, Munkvold G P, Plattner R D, Proctor R H. *FUM1-a* gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol Plant Microbe Interact.*2002; 15(11): 1157-64.
- (36) Munkvold GP, Hellmich RL, Rice LG. Comparison of fumonisin concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and nontransgenic hybrids. *Plant disease.* 1999; 83(2): 130-8.
- (37) Barros G, Magnoli C, Reynoso MM, Ramirez ML, Farnochi MC, Torres A, et al. Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina. *World Mycotoxin J.* 2009; 2(1): 53-60.
- (38) Etcheverry MG, Scandolara A, Nesci A, Ribeiro MSVB, Pereira P, Battilani P. Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from maize. *Mycopathologia.* 2009; 167(5): 287-95.
- (39) Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb Cell Fact.* 2009; 8(63): 1-12.

- (40) Torres AM, Ramirez ML, Arroyo M, Chulze SN, Magan N. Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *Int J Food Microbiol.* 2003; 83 (3): 319-24.
- (41) Farnochi MC, Torres AM, Magan N, Chulze SN. Effect of antioxidants and competing mycoflora on *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* populations and fumonisin production on maize grain. *J Stored Prod Res.* 2005; 41(2): 211-9.
- (42) Garrido CE, Pezzani CH, Pacin A. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.), from 1999 to 2010. *Food Control.* 2012; 25(2): 660-5.
- (43) Pacin A M, Broggi LE, Resnik SL, González HHL. Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Rios province, Argentina. *Mycotoxin res.* 2001; 17(1): 31-8.
- (44) Scott PM. Recent research on fumonisins: a review, Part A. *Food Addit Contam.* 2012; 29(2): 242-8.
- (45) Wang J, Wang X, Zhou Y, Du L, Wang Q. Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium spp.* in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in Zhejiang Province of China. *J Sci Food Agric.* 2010; 90(5): 836-42.
- (46) Palacios SA, Ramirez ML, Cabrera Zalazar M, Farnochi MC, Zappacosta D, Chiacchiera SM, et al. Occurrence of *Fusarium spp.* and fumonisin in durum wheat grains. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(22):12264-9.
- (47) Karbancioglu-Güler F, Herpekan D. Natural occurrence of fumonisin B1 in dried figs as an unexpected hazard. *Food Chem Toxicol.* 2009; (47): 289-92.
- (48) Martins ML, Martins HM, Bernardo F. Fumonisins B 1 and B 2 in black tea and medicinal plants. *J Food Prot.* 2001; 64(8): 1268-70.
- (49) Prelusky DB, Trenholm H L, Rotter BA, Miller JD, Savard M E, Yeung J M, et al. Biological fate of fumonisin B1 in food-producing animals. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 392: 265-78.
- (50) Lombaert G A, Pellaers P, Roscoe V, Mankotia M, Neil R , Scott P M. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Addit Contam.* 2003; 20(5): 494-504.
- (51) Gear JRE, Rubinstein C. Maíz y nutrición : informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Serie de Informes Especiales (Argentina). ILSI Argentina; 2006.
- (52) Bittencourt ABF, Oliveira CAF, Dilkin P, Corrêa B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Control.* 2005; 16(2): 117-20.

- (53) Bullerman LB, Tsai WYJ. Incidence and Levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and Fumonisin in Corn and Corn-Based Foods and Feeds¹. *J Food Prot.* 1994; 57(6): 541-6.
- (54) Doko MB, Visconti A. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Addit Contam.* 1994; 11(4): 433-9.
- (55) Henning MR, Sanchez S, Benedetto NM, Longhi A, Torroba JE, Valente Soares LM. Fumonisin levels in commercial corn products in Buenos Aires, Argentina. *Food Addit Contam.* 2000; 17 (1): 55-8.
- (56) 2 Congresso Nazionale. Le micotossine nella filiera agro-alimentare. Institute Superior de la Sanidad, Roma, Italia, 16-18 de octubre 2006. Abstract Book
- (57) Comisión Del Codex Alimentarius. Documento de debate sobre las fumonisinas en el maíz y en los productos de maíz: código de prácticas y otras medidas para combatir la presencia de fumonisinas en el maíz. Moscú; 2013. p. 1–10.
- (58) Sydenham E W, van der Westhuizen L, Stockenström S, Shephard GS, Thiel PG. Fumonisin-contaminated maize: Physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. *Food Addit Contam.* 1994; 11(1): 25-32.
- (59) Firrao G, Torelli E, Gobbi E, Raranciuc S, Bianchi G, Locci R. Prediction of milled maize fumonisin contamination by multispectral image analysis. *J Cereal Sci.* 2010; 52(2): 327-30.
- (60) Katta SK, Cagampang AE, Jackson LS, Bullerman LB. Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions. *Cereal Chem.* 1997; 74(6): 858-63.
- (61) Vanara F, Reyneri A, Blandino M. Fate of fumonisin B 1 in the processing of whole maize kernels during dry-milling. *Food Control* . 2009; 20(3): 235-8.
- (62) Resnik S, Pacin A, Funes G. Identification and quantification of mycotoxins in corn harvested in Cordoba Province and in milling products. In: Rubinstein H, editor. *Micotoxinas: Impacto en la Producción y Salud Humana y Animal*. Unquillo, Córdoba; 2006. p. 199–220.
- (63) Pietri A, Zanetti M, Bertuzzi T. Distribution of aflatoxins and fumonisins in dry-milled maize fractions. *Food Addit Contam.* 2009; 26(3): 372-80.
- (64) Broggi LE, Resnik SL, Pacin AM, Gonzalez, HH L, Cano G, Taglieri D. Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Addit Contam.* 2002; 19(5): 465-9.
- (65) Bennett GA, Richard JL, Eckhoff SR. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 392:317-22.

- (66) Pujol R, Torres M, Sanchis V, Canela R. Fate of fumonisin B in corn kernel steeping water containing SO₂. *J Agric Food Chem* . 1999; 47: 276-8.
- (67) Patel S, Hazel CM, Winterton AGM, Gleadle AE. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Addit Contam* . 1997; 14(2): 187-91.
- (68) Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsk P, et al. Masked mycotoxins: A review. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57(1): 165-86.
- (69) Rychlik M, Humpf H-U, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, et al. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin Res*. 2014; 30(4):197–205.
- (70) Dombrink-Kurtzman MA, Dvorak TJ. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *J Agric Food Chem*. 1999; 47: 622-7.
- (71) De La Campa R, Miller JD, Hendricks K. Fumonisin in tortillas produced in small-scale facilities and effect of traditional masa production methods on this mycotoxin. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(14): 4432-7.
- (72) Dombrink-Kurtzman MA, Dvorak TJ, Barron ME, Rooney LW. Effect of nixtamalization (Alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *J Agric Food Chem* . 2000; (48): 5781-6.
- (73) Voss KA, Bacon CW, Meredith FI, Norred WP. Comparative subchronic toxicity studies of nixtamalized and water-extracted *Fusarium moniliforme* culture material. *Food Chem Toxicol*. 1996; 34(7): 623-32.
- (74) Hendrich S, Miller KA, Wilson TM, Murphy PA. Toxicity of *Fusarium proliferatum*-fermented nixtamalized corn-based diets fed to rats: effect of nutritional status. *J Agric Food Chem*. 1993; 41(10): 1649-54.
- (75) Bullerman LB, Ryu D, Jackson LS. Stability of Fumonisin in Food Processing. *Mycotoxins and Food Safety*. 2002; 195-204.
- (76) Park DL, López-García R, Trujillo-Preciado S, Price RL. Reduction of risks associated with fumonisin contamination in corn. *Adv Exp Med Biol*. 1996;392:335–44.
- (77) Howard PC, Churchwell M I, Couch LH, Marques MM, Doerge DR. Formation of N-(carboxymethyl) fumonisin B1, following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(9):3546-57.

- (78) Poling SM, Plattner RD, Weisleder D. N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisin B₁, the initial reaction product of fumonisin B₁ and D-glucose. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(5): 1318-24.
- (79) Norred WP, Riley RT, Meredith F I, Poling SM, Plattner RD. Instability of N-acetylated fumonisin B₁ (FA1) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(11): 1071-8.
- (80) Liu H, Lu Y, Haynes JS, Cunnick J E, Murphy P, Hendrich S. Reaction of fumonisin with glucose prevents promotion of hepatocarcinogenesis in female F344/N rats while maintaining normal hepatic sphinganine/sphingosine ratios. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(8): 4113-21.
- (81) Hartl M, Humpf HU. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38(12): 1097-102.
- (82) Seefelder W, Knecht A, Humpf HU. Bound fumonisin B₁: analysis of fumonisin-B₁ glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(18), 5567-73.
- (83) Falavigna C, Lazzaro I, Galaverna G, Battilani P, Dall'Asta C. Fatty acid esters of fumonisins: first evidence of their presence in maize, Part A. *Food Addit Contam.* 2013; 30(9): 1606-13.
- (84) Dall'Asta C, Mangia M, Berthiller F, Molinelli A, Sulyok M, Schuhmacher R, et al. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 395(5): 1335-45.
- (85) Falavigna C, Cirlini M, Galaverna G, Dall'Asta C. Masked fumonisins in processed food: co-occurrence of hidden and bound forms and their stability under digestive conditions. *World Mycotoxin J.* 2012; 5(3): 325-34.
- (86) Mangia M. Free and hidden fumonisins in maize and gluten-free products (Doctoral dissertation). Università degli Studi di Parma; 2010.
- (87) Mohanlall R, Odhav B, Mohanlall V. The effect of thermal processing on fumonisin B₁ (FB₁) levels in maize-based foods. *Afr J Food Sci.* 2013; 7(3): 45-50.
- (88) Senthil KR, Bullerman LB, Musser SM. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B₁ in an aqueous model system. *J Agric Food Chem.* 1996; 44 (3): 906-12.
- (89) Jackson LS, Katta SK, Fingerhut DD, DeVries JW, Bullerman LB. Effects of Baking and Frying on the Fumonisin B₁ Content of Corn-Based Foods. *J Agric Food Chem.* 1997; 45 (12): 4800-5.

- (90) Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol.* 2007; 119(1): 140-6.
- (91) Humpf HU, Voss KA. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res.* 2004; 48(4): 255-69.
- (92) Stockmann-Juvala H, Savolainen K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Hum Exp Toxicol.* 2008; 27(11): 799-809.
- (93) Torres-Sánchez L, López-Carrillo L. Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. *Salud pública Méx.* 2010; 52(5):461–7.
- (94) Wang E, Ross PF, Wilson TM, Riley RT, Merrill Jr AH. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. *J Nutr.* 1992; 122(8): 1706-16.
- (95) Tolleson WH, Dooley K L, Sheldon WG, Thurman JD, Bucci TJ, Howard PC. The mycotoxin fumonisin induces apoptosis in cultured human cells and in livers and kidneys of rats. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 392: 237-50.
- (96) Norred WP, Plattner RD, Dombrink-Kurtzman MA, Meredith FI, Riley RT. Mycotoxin-induced elevation of free sphingoid bases in precision-cut rat liver slices: Specificity of the response and structure–activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 147(1): 63-70.
- (97) Humpf HU, Schmelz EM, Meredith FI, Vesper H, Vales T R, Wang E, et al. Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganines by ceramide synthase formation of N-palmitoyl-aminopentol produces a toxic metabolite of hydrolyzed fumonisin, AP1, and a new category of ceramide synthase inhibitor. *J Biol Chem.* 1998; 273(30): 19060-4.
- (98) Seiferlein M, Humpf HU, Voss KA, Sullards MC, Allegood JC, Wang E, et al. Hydrolyzed fumonisins HFB1 and HFB2 are acylated in vitro and in vivo by ceramide synthase to form cytotoxic N-acyl-metabolites. *Mol Nutr Food Res.* 2007; 51(9):1120-30.
- (99) Abou-Karam M, Abbas HK, Shier WT. N-Fatty acylation of hydrolyzed fumonisin B1, but not of intact fumonisin B1, strongly enhances in vitro mammalian toxicity. *Toxin Rev.* 2004; 23(1): 123-151
- (100) Stevens V.L, Tang J. Fumonisin B1-induced sphingolipid depletion inhibits vitamin uptake via the glycosylphosphatidylinositol-anchored folate receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272(29):18020-5.
- (101) Wolf G. Inhibition of cellular uptake of folate by blocking synthesis of the membrane folate receptor. *Nutr Rev.* 1998; 56(3): 86-7.

- (102) Voss KA, Riley RT, Snook ME, Waes JGV. Reproductive and sphingolipid metabolic effects of fumonisin B1 and its alkaline hydrolysis product in LM/Bc mice: hydrolyzed fumonisin B1 did not cause neural tube defects. *Toxicol Sci.* 2009; 112(2): 459-67.
- (103) Marasas W F, Riley RT, Hendricks K A., Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, et al. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr.* 2004; 134(4): 711-6.
- (104) Nour AMA, Ringot D, Guéant JL, Chango A. Folate receptor and human reduced folate carrier expression in HepG2 cell line exposed to fumonisin B1 and folate deficiency. *Carcinogenesis.* 2007; 28(11): 2291-7
- (105) Fodor J, Balogh K, Weber M, Mezes M, Kametler L, Posa R, et al. Absorption, distribution and elimination of fumonisin B1 metabolites in weaned piglets. *Food Addit Contam.* 2008; 25(1): 88-96.
- (106) Norred WP, Plattner R D, Chamberlain W J. Distribution and excretion of [14C] fumonisin B1 in male sprague-dawley rats. *Nat Toxins.* 1993; 1(6): 341-6.
- (107) Dilkin P, Direito G, Simas MMS, Mallmann CA, Corrêa B. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B1 containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. *Chem Biol Interact.* 2010; 185(3): 157-62.
- (108) Dantzer WR, Hopper J, Mullin K, Hendrich S, Murphy PA. Excretion of 14C-fumonisin B1, 14C-hydrolyzed fumonisin B1, and 14C-fumonisin B1-fructose in rats. *J Agric Food Chem.* 1999; (10): 4291-6.
- (109) Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Alberts JF. Biliary excretion of the mycotoxin fumonisin B1 in rats. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32(5): 489-91.
- (110) Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Alberts JF, Cawood ME. Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B1 in a non-human primate. *Toxicol.* 1994; 32(6): 735-41.
- (111) Solfrizzo M, Gambacorta L, Visconti A. Assessment of multi-mycotoxin exposure in southern Italy by urinary multi-biomarker determination. *Toxins.* 2014; 6(2): 523-38.
- (112) Shephard GS, Van der Westhuizen L, Sewram V. Biomarkers of exposure to fumonisin mycotoxins: a review. *Food Addit Contam.* 2007; 24(10): 1196-201.
- (113) Solfrizzo M, Chulze SN, Mallmann C, Visconti A, De Girolamo A, et al. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Addit Contam.* 2004; 21(11): 1090-5.

- (114) Mary VS, Theumer MG, Arias SL, Rubinstein HR. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology*. 2012; 302(2): 299-307.
- (115) Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res*. 1988; 55(4): 197-203.
- (116) Kellerman TS, Marasas WFO, Thiel PG, Gelderblom WCA, Cawood M. Coetzer JAW. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort J Vet Res*. 1990; 57:269-75.
-
- (117) Ross PF, Rice LG, Reagor JC, Osweiler GD, Wilson TM, Nelson HA , et al. Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. *J Vet Diagn Invest*. 1991; 3(3): 238-41.
- (118) Gelderblom WC, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis*. 1991; 12(7): 1247-51.
- (119) Riley RT, Hinton DM, Chamberlain WJ, Bacon CW, Wang E, Merrill Jr AH, et al. Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. *J Nutr*. 1994; 124(4):594.
- (120) Lemmer ER, Vessey CJ, Gelderblom WC, Shephard EG, Van Schalkwyk DJ, Van Wijk, RA, et. al. Fumonisin B 1-induced hepatocellular and cholangiocellular tumors in male Fischer 344 rats: potentiating effects of 2-acetylaminofluorene on oval cell proliferation and neoplastic development in a discontinued feeding study. *Carcinogenesis*. 2004; 25(7): 1257-64.
- (121) Howard PC, Eppley RM, Stack M E, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, et al. Fumonisin b1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect*. 2001; 109 Supl 2 : 277.
- (122) Abel S, Gelderblom, WCA. Oxidative damage and fumonisin B 1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology*. 1998; 131(2):121-31.
- (123) Sahu SC, Eppley RM, Page SW, Gray GC, Barton CN, O'Donnell MW. Peroxidation of membrane lipids and oxidative DNA damage by fumonisin B 1 in isolated rat liver nuclei. *Cancer letters*. 1998; 125(1): 117-21.
- (124) Atroschi F, Rizzo A, Biese I, Veijalainen P, Saloniemi H, Sankari S, et al. Fumonisin B1-induced DNA damage in rat liver and spleen: effects of pretreatment with coenzyme Q10, L-carnitine, -tocopherol and selenium. *Pharmacol Res*. 1999; 40(6): 459-67.

- (125) Mobio TA, Baudrimont I, Sanni A, Shier TW, Saboureau D, Dano SD, et al. Prevention by vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fumonisin B1 in C6 glioma cells. *Arch Toxicol.* 2000; 74(2): 112-9.
- (126) Gelineau-van Waes J, Starr L, Maddox J, Aleman F, Voss,KA , Wilberding J, et al. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an in vivo mouse model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005; 73(7): 487-97.
- (127) Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE., Cole JR. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest.* 1990; 2(3): 217-21.
- (128) Smith GW, Constable PD, Tumbleson ME, Rottinghaus GE, Haschek WM. Sequence of cardiovascular changes leading to pulmonary edema in swine fed culture material containing fumonisin. *Am J Vet Res.*1999; 60(10): 1292-300.
- (129) Constable PD, Smith GW, Rottinghaus GE, Haschek WM. Ingestion of fumonisin B1-containing culture material decreases cardiac contractility and mechanical efficiency in swine. *Toxicol Appl Pharmacol.*2000; 162(3): 151-60.
- (130) GBORE FA, EGBUNIKE GN. Haematotoxicity of dietary fumonisin B1 in growing pigs. *ASSET.* 2008; Series B 7:1–8.
- (131) Zomborszky-Kovács M, Kovács F, Horn P, Vetési F, Repa I, Tornyos G, et al. Investigations into the time-and dose-dependent effect of fumonisin B 1 in order to determine tolerable limit values in pigs. *Livestock, Prod Sci.* 2002; 76(3): 251-6.
- (132) Colvin BM, Cooley, AJ, Beaver RW. Fumonisin toxicosis in swine: clinical and pathologic findings. *J Vet Diagn Invest .*1993; 5(2): 232-41.
- (133) Smith GW, Constable PD, Smith AR, Bacon CW, Meredith FI, Wollenberg GK, et al. Effects of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. *Am J Vet. Res.*1996; 57(8): 1233-48.
- (134) Bouhet S, Hourcade E, Loiseau N, Fikry A, Martinez S, Roselli M, et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol Sci.*2004; 77(1): 165-71.
- (135) Taranu, I., Marin, D. E., Bouhet, S., Pascale, F., Bailly, J. D., Miller, J. D., et al. Mycotoxin fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol Sci.* 2005; 84(2): 301-7.
- (136) Bhat RV, Shetty PH, Amruth RP, Sudershan RV. A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *J Toxicol: Clin Toxicol.* 1997; 35(3): 249-55.

- (137) Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*. 1992; 82(3): 353-7.
- (138) Hendricks D, Parker MI. Oesophageal cancer in Africa. *IUBMB life*. 2002; 53(4-5): 263-8.
- (139) Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill Jr AH, Rothman KJ, et al. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environ Health Perspect*. 2006; 114(2): 237.
- (140) Williams JH, Grubb JA, Davis JW, Wang JS, Jolly PE, Ankrah NA, et al. HIV and hepatocellular and esophageal carcinomas related to consumption of mycotoxin-prone foods in sub-Saharan Africa. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92(1): 154-60.
- (141) Kimanya ME, De Meulenaer B, Roberfroid D, Lachat C, Kolsteren P. Fumonisin exposure through maize in complementary foods is inversely associated with linear growth of infants in Tanzania *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54(11): 1659-67.
- (142) Smith LE, Stoltzfus RJ, Prendergast A. Food chain mycotoxin exposure, gut health, and impaired growth: a conceptual framework. *Adv Nutr An Int Rev J*. 2012; 3(4): 526-31.
- (143) Yao ZG, Zhang XH, Hua F, Wang J, Xing X, Wang JL, et al. Effects of fumonisin B1 on HLA class I antigen presentation and processing pathway in GES-1 cells in vitro. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 30(5): 379-90.
- (144) Wang SK, Liu S, Yang LG, Shi RF, Sun GJ. Effect of fumonisin B1 on the cell cycle of normal human liver cells. *Mol Med Rep*. 2013; 7(6): 1970-6.
- (145) Tolleson WH, Melchior WB, Morris SM, McGarrity LJ, Domon OE, Muskhelishvili L, et al. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 1996; 17(2): 239-49.
- (146) Seefelder W, Humpf HU, Schwerdt G, Freudinger R, Gekle M. Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 192(2): 146-53.
- (147) Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont I, Moukha S, Dano SD, Creppy EE. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*. 2005; 213(1), 56-65.

- (148) Schmelz EM, Dombrock-Kurtzman MA, Roberts PC, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Merrill AH. Induction of apoptosis by fumonisin B 1 in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol Appl Pharmacol.*1998; 148(2): 252-60.
- (149) Abbas HK, Cartwright RD, Xie W, Shier WT. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Prot.* 2006; 25(1): 1-9.
- (150) Bankole SA, Mabekoje OO. Occurrence of aflatoxins and fumonisins in preharvest maize from south-western Nigeria. *Food Addit Contam.* 2004; 21(3): 251-5.
- (151) Kimanya ME, De Meulenaer B, Tiisekwa B, Ndomondo-Sigonda M, Devlieghere F, Van Camp J, et al. Co-occurrence of fumonisins with aflatoxins in home-stored maize for human consumption in rural villages of Tanzania. *Food Addit Contam.* 2008; 25(11): 1353-64.
- (152) Kpodo K, Thrane U, Hald B. Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000; 61(2): 147-57.
- (153) Rocha LO, Nakai VK, Braghini R, Reis TA, Kobashigawa E, Corrêa B. (2009). Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil. *Int J Mol Sci.* 2009; 10(11): 5090-103.
- (154) Li FQ, Yoshizawa T, Kawamura O, Luo XY, Li YW. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J Agric Food Chem.* 2001; 49(8): 4122-6.
- (155) Ueno Y, Iijima K, Wang SD, Sugiura Y, Sekijima M, Tanaka T, et al. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol.* 1997; 35(12): 1143-50.
- (156) Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG and Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr.*1990; 13: 2077-87.
- (157) Bennett GA, Richard JL. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins. *J AOAC Int.*1994; 77(2): 501-6.
- (158) Holcomb M, Sutherland JB, Chiarelli MP, Korfmacher WA, Thompson HC, Lay JO, et al. HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisins B1 and B2 produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J Agric Food Chem.*1993; 41(3): 357-60.
- (159) Rottinghaus GE, Coatney CE, Minor HC. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2. *J vet Diagn Invest* 1992; 4(3): 326-9.

- (160) Maragos CM. Capillary zone electrophoresis and HPLC for the analysis of fluorescein isothiocyanate-labeled fumonisin B1. *J Agric Food Chem* .1995; 43(2): 390-4.
- (161) Wang S, Quan Y, Lee N, Kennedy IR. Rapid determination of fumonisin B1 in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 2491-5.
- (162) Maragos CM, Thompson VS. Fiber-optic immunosensor for mycotoxins. *Nat Toxins*. 1999; 7(6): 371-6.
- (163) Thompson VS, Maragos CM. Fiber-optic immunosensor for the detection of fumonisin B1. *J Agric Food Chem*. 1996; 44(4): 1041-6.
- (164) Abdul Kadir MK, Tothill IE. Development of an electrochemical immunosensor for fumonisins detection in foods. *Toxins*. 2010; 2(4): 382-98.
- (165) ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2017. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 138. Brazil. Available at: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3219534/RDC_138_2017_pdf
- (166) European Commission (EC) Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). *Off. J. Eur. Union*. 2006.
- (167) European Commission (EC) Commission Regulation No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union*. 2007.
- (168) Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA: Springer US; 2009.
- (169) Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Pub; 2006. 388 p.
- (170) Doko MB, RapiorS, Visconti A, Schjoth JE. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J Agric Food Chem*. 1995; 43(2): 429-34.
- (171) Pestka JJ, Azcona-Olivera JI, Plattner RD, Minervini F, Doko MB, Visconti A. Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J Food Prot*.1994; 57(2): 169-72.

- (172) Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Bird C, Miller BM. Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. *J Agric Food Chem* .1996; 44(1): 159-64.
- (173) Ono EY, Kawamura O, Ono MA, Ueno Y, Hirooka EY. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. *Food Agric Immunol*. 2000; 12(1): 5-14.
- (174) González Pereyra ML, Pereyra CM, Ramirez ML, Rosa CDR, Dalcero AM, Cavaglieri LR. Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. *Lett Appl Microbiol*. 2008; 46(5): 555-61.
- (175) Pitt JI, Wild, CP, Gelderblom W, Miller J, Riley R, Wu F, Bann R. Improving public health through mycotoxin control. *World Health*. 2012: 158-62.
- (176) Bacon C, Nelson P. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *J Food Prot*.1994; 57: 514-21.
-

