

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
MENCION MICROBIOLOGIA



TESIS DE GRADO

Determinación de la presencia del gen codificador de la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* en la castaña (*Bertholletia excelsa*), mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

AUTOR : NOELIA ALEJANDRA RENDÓN ROCHA

ASESORES : SUSANA REVOLLO ZEPITA Ph.D:
ANGÉLICA MARÍA ESPADA, MSc.

La Paz – Bolivia
2007

INDICE

RESUMEN.....	1
CAPITULO 1	
INTRODUCCION.....	3
CAPITULO 2	
ANTECEDENTES	
	2.1 GENERALIDADES...
6
	2.2
ASPERGILLUS.....	7
	2.2.1
MORFOLOGIA.....	7
	2.2.2
CULTIVO.....	9
	2.2.3
IDENTIFICACION.....	10
2.2.4 AMBIENTE.....	10
2.3 MICOTOXINAS.....	1
	1
	2.3.1 FORMACION DE LAS
	MICOTOXINAS.....12
2.3.2 MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR EL GENERO	
ASPERGILLUS.....	1
5	
2.3.2.1 AFLATOXINAS.....	15
	2.3.2.1.1 Aflatoxinas en ambientes
	laborales.....19
	2.3.2.1.1.1 Efectos sobre la
	salud.....19
2.3.2.1.1.2 Inhalación.....	21
	2.3.2.2 OCRATOXINA
	A.....22
2.3.2.3 ESTERIGMATOCISTINA.....	2
	3
	2.3.2.4 ACIDO
CIPLOPIAZONICO.....	24

2.3.2.5	NEUROTOXINAS.....	2
		5
	2.3.3 NIVEL DE AFLATOXINAS EN LOS ALIMENTOS.....	25
2.4	MICOTOXICOSIS.....	2
		6
	2.4.1 METABOLISMO FUNGICO.....	28
	2.4.2 MECANISMO DE ACCION PATOGENA.....	29
2.4.3	ASPERGILOSIS.....	29
		29
2.4.3.1	EPIDEMIOLOGÍA.....	29
2.4.3.2	MORFOLOGIA.....	3
		0
	2.4.3.3 RESPUESTA INMUNE.....	30
2.4.4	AFLATOXICOSIS.....	31
2.4.4.1	TOXICOCINETICA.....	3
		2
	2.4.5 MODO DE ACCION DE LAS AFLATOXINAS.....	32
	2.4.6 MECANISMO DE ACCION DE LAS AFLATOXINAS.....	33
	2.5 TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS.....	34
	2.5.1 EVALUACIÓN DEL RIESGO Y TOXICIDAD.....	34
2.5.2	FACTORES QUE INFLUENCIAN TOXIGENICIDAD.....	35
		35
	2.5.2.1 FACTORES INTRINSECOS.....	36
	2.6 HONGOS TOXIGENICOS NATURALES.....	37
	2.7 HONGOS EN EL CAMPO Y EL ALMACENAMIENTO.....	38
	2.8 CONTAMINACION DE ALIMENTOS.....	39
2.9	CONTROL DEL HONGO ANTES Y DURANTE LA COSECHA.....	4
		2
	2.9.1 CONTROL ANTES DE LA COSECHA.....	42

2.9.2 CONTROL DURANTE LA COSECHA.....	43
2.9.3 CONTROL DURANTE EL ALMACENAMIENTO.....	43
2.10 CONTROL DESPUES DE LA COSECHA Y DESCONTAMINACION..	44
2.10.1 MÉTODOS FISICOS DE ELIMINACION DE MICOTOXINAS.....	45
2.10.2 MÉTODOS FISICOS DE DESCONTAMINACION.....	46
2.10.3 DESCONTAMINACION BIOLÓGICA.....	48
2.10.4 INACTIVACION QUÍMICA.....	48
2.11 ARACTERÍSTICAS DE LA CASTAÑA.....	49
2.11.1 CONTEXTO AMBIENTAL.....	52
2.11.2 REGULACIONES.....	54
2.11.3 LAS AFLATOXINAS EN LA CASTAÑA.....	55
2.11.4 RIESGOS PARA LA SALUD CAUSADOS POR LAS AFLATOXINAS.....	56
2.11.5 ASPECTO SOCIO-ECONÓMICO.....	57
2.11.6 INFRAESTRUCTURA.....	58
2.11.7 PRODUCCION.....	59
2.11.8 MERCADEO.....	61
2.11.9 CERTIFICACION DE CALIDAD.....	62
2.11.10 ALMACENAMIENTO.....	62
2.12 EACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	63
2.12.1 BASES MOLECULARES DE LA PCR.....	65
2.12.2 PCR PARA <i>Aspergillus flavus</i>	69

CAPITULO 3

OBJETIVOS.....	70
3.1 OBJETIVO	
GENERAL.....	70
3.2 OBJETIVOS	
ESPECÍFICOS.....	70
CAPITULO 4	
DISEÑO EXPERIMENTAL	
4 DISEÑO	
METODOLOGICO.....	71
FLUJOGRAMA.....	71
4.2 CEPAS.....	72
4.3 MUESTRAS.....	7
4.3.1 CREACION DE LA BASE DE DATOS Y DISEÑO DE LA ENCUESTA.....	2
4.4 CULTIVO DE LAS MUESTRAS.....	74
4.4.1 PREPARACION DE AGAR ATATA DEXTROSA (APD).....	74
4.4.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	75
4.4.3 SEMBRADO DE LAS MUESTRAS EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	75
4.4.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS SIN CULTIVAR.....	75
4.5 IDENTIFICACION MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	76
4.5.1 VALIDACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN DE <i>Aspergillus flavus</i>	76
4.5.2 RELIZACION DE LA PRUEBA MOLECULAR (PCR).....	77
4.5.2.1 PREPARACION DE LA MEZCLA DE REACTIVOS PARA LA TÉCNICA DE PCR.....	77
4.5.2.2 AMPLIFICACIÓN.....	78

4.5.2.3 REVELADO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS.....	7
8	
CAPITULO 5	
5 RESULTADOS.....	79
5.1 EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE CEPA DE REFERENCIA.....	7
9	
5.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CODIFICADOR DE LA AFLATOXINA EN LAS MUESTRAS.....	81
5.3 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE <i>Aspergillus flavus</i>	89
5.4 DATOS DE LEVANTAMIENTO DE MUESTRAS.....	94
5.5 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	98
CAPITULO 6	
6 CONCLUSIONES.....	10
1	
CAPITULO 7	
7 DISCUSION.....	1
02	
CAPITULO 8	
8 RECOMENDACIONES.....	1
04	
CAPITULO 9	

9	BIBLIOGRAFIA.....	1
	05	

RESUMEN

En Bolivia la castaña es un producto muy importante de exportación a Europa y otros países desarrollados, que constituyen una parte importante de la economía del norte de Bolivia.

Las nuevas regulaciones que rigen la importación de la castaña a la Unión Europea entran en efecto desde 1999, estas, junto con la carencia de un programa efectivo de manejo de aflatoxinas en las áreas de producción, ponen en riesgo los mercados de exportación en nuestro país.

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por el hongo *Aspergillus flavus*. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para los animales; estas aflatoxinas se consideran cancerígenos hepáticos humanos.

Las micotoxinas en la mesa del consumidor constituyen un problema que comienza en el campo y continúa durante el acopio y la comercialización, cuya única solución es prevenir el crecimiento fúngico.

La determinación de estas aflatoxinas se realizan mediante métodos convencionales microbiológicos que demora varios días en que desarrollen en un medio de cultivo y que es susceptible de contaminación externa disminuyendo así la sensibilidad y especificidad, en cambio con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), tiene la ventaja de ser muy sensible y específica, además de reducir el tiempo de análisis.

En el presente trabajo de investigación se analizaron 40 muestras que fueron recolectadas de los mercados mas frecuentados por la población; de los cuales solo 20 muestras fueron sometidas a cultivo y posterior análisis molecular mediante la técnica de la PCR, en cambio las otras 20 muestras fueron directamente evaluadas por la técnica molecular.

Los resultados obtenidos en la técnica de la PCR de las 40 muestras, 19 dieron positivo para la aflatoxina de *Aspergillus flavus*, y los resultados obtenidos en el cultivo de las 20 muestras procesadas 10 fueron positivas para *A. flavus* lo que constituye un riesgo importante para la población que lo consume.

Es muy importante tener un control de calidad estricto y regulado por normas bolivianas, la técnica de la PCR es una herramienta muy valiosa ya que tiene la ventaja de ser más sensible y específica que otras pruebas además que el tiempo de análisis es mas corto, que puede ser condicional en un futuro próximo.

SUMMARY

In Bolivia the chestnut is a very important product for export to Europe and other countries, and constitutes an important part of the economy of the north of Bolivia.

The new regulations that rule the import of the chestnut to the European Union since 1999, and the deficiency of an effective program of handling of aflatoxins in the production areas, have evidenced the risk of exportation of it in our country.

Aflatoxins are mycotoxins produced by the fungus *Aspergillus flavus*. The metabolic products it are very toxic usually, as much for humans as for animals; these aflatoxins are considered as human hepatic carcinogenic substances.

This mycotoxins constitute a problem for the consumer that begins in the culture and continues during storing and commercialization, whose only solution is to prevent the fungus contamination.

The identification of these aflatoxins is realized by microbiological conventional methods that delay several days for its development in culture media and that are susceptible of external contamination diminishing therefore its sensitivity and specificity, however with the application of the Polymerase Chain Reaction (PCR), a very sensible and specific technique, we have reducing the time of analysis.

In the present study, 40 samples were analyzed that were collected from different markets frequented by the population; of which 20 samples were only analyzed by culture and later by PCR, however the other 20 samples were directly evaluated by the molecular technique.

The results obtained by PCR, 19 samples were positive for the *Aspergillus flavus* aflatoxin and 10 samples were positive by culture of 20 analyzed which constitutes an important risk for the population consumes that consumes this product.

It is very important to have a strict quality control regulated by Bolivian norms, the PCR technique is a very valuable tool since it has been demonstrated to be more sensitive and specific, advantages of great value for this kind of analysis in addition that the time for processing the samples is reduced remarkable for posterior studies in this field.

1. INTRODUCCION

Los hongos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios siendo uno de los más importantes *Aspergillus flavus*. Dichos hongos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de material orgánico.

Estos hongos pueden contaminar alimentos y cultivos agrícolas a nivel mundial por medio de sus micotoxinas, de las cuales las aflatoxinas son las más importantes. Las aflatoxinas liberadas por *Aspergillus flavus* presentes en alimentos pueden producir cáncer en humanos; también afectan a algunos animales. La formación de las micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica. Se conocen unas 300 toxinas fúngicas; estas crecen a temperaturas de 25° C y a una humedad relativa del 70%; se las puede hallar en la castaña, maíz, cacao, trigo, avena y otros cereales. El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfiguran el aspecto de frutas y hortalizas. En los granos de cereales, los hongos persisten si el grano está suficientemente seco como para soportar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente.

Son varios los metabolitos secundarios de los aspergilos que son considerados micotoxinas: aflatoxinas, esterigmatocistina y otros. Las micotoxinas en la mesa del consumidor constituyen un problema que comienza en el campo y continúa durante el acopio y la comercialización, siendo la única solución prevenir el crecimiento fúngico. Con el fin de conocer la situación de peligro se buscan las micotoxinas en los productos alimenticios y forrajeros, pero muchas veces hay que comenzar por el aislamiento e identificación de las especies fúngicas para prever cuales toxinas podrían estar presentes.

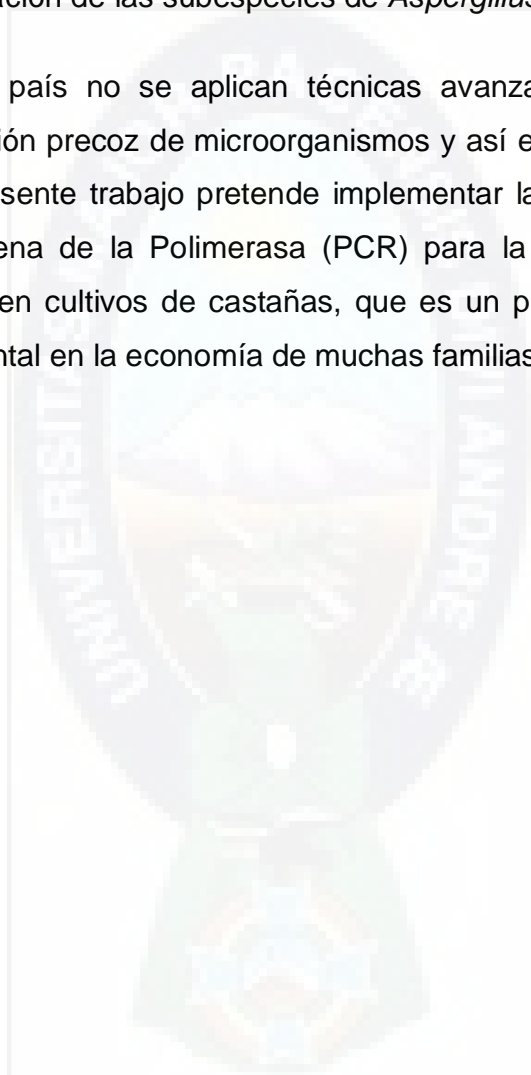
La castaña se convierte en un problema serio debido a las aflatoxinas que recibe, por consiguiente, la industria que este producto sustenta, se ve amenazada por las estrictas regulaciones sobre el contenido de aflatoxinas en las castañas que se exportan a los países desarrollados. Las nuevas regulaciones que rigen la importación de castaña a la Unión Europea (UE) entran en vigencia desde 1999; éstas, junto con la carencia de un programa efectivo de manejo de aflatoxinas en las áreas de producción, pondrían en peligro más de un 50% de los mercados tradicionales para este producto, que constituye la base para un 70% de toda la actividad económica de la región norte de Bolivia, que comprende la totalidad del Departamento de Pando, la provincia Vaca Diez del Beni y la provincia Iturrealde del Departamento de La Paz. La importancia de la castaña no sólo radica en su aporte a la economía de la mencionada región, sino por su componente ecológico en la preservación de nuestra selva amazónica, ya que su explotación permite frenar la depredación de los bosques. El cierre de los mercados, debido a las regulaciones, podría devastar la economía de las regiones productoras.

La determinación y análisis de las aflatoxinas hoy en día son realizados por: métodos inmuno-enzimáticos, cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para estas pruebas se requiere alrededor de una semana a fin de obtener los resultados, es decir que las muestras deben ser cultivadas previamente. Además, estas pruebas convencionales no permiten realizar la identificación específica de las subespecies del género *Aspergillus*. Las malas condiciones de almacenamiento y procesamiento de la castaña constituyen un alto riesgo de contaminación de estos productos almacenados, provocando una disminución en su calidad nutritiva y de exportación. En este sentido, creemos imprescindible la identificación rápida y acertada del patógeno, para controlar y prevenir riesgos epidemiológicos. La investigación a través de los métodos moleculares puede ser una herramienta epidemiológica poderosa para identificar y

controlar fuentes y vías de transmisión, investigar brotes definidos e identificar toxinas particulares.

Con el uso de nuevas herramientas moleculares para la identificación del genoma de *Aspergillus*, estas pruebas requieren de poco tiempo y nos permiten realizar la identificación de las subespecies de *Aspergillus*.

En nuestro país no se aplican técnicas avanzadas o moleculares que permitan la detección precoz de microorganismos y así evitar la contaminación de los cultivos. El presente trabajo pretende implementar la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección específica de *Aspergillus flavus* en cultivos de castañas, que es un producto de exportación y por tanto fundamental en la economía de muchas familias.



2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES

Los hongos son organismos eucariotas, es decir, poseen núcleo verdadero, están rodeados de membrana celular y son portadores de varios cromosomas. La mayor parte de los hongos están formados por largas cadenas de células denominadas hifas, y el conjunto o masa de estas se denomina micelio (10).

Los hongos miceliales o filamentosos incluyen todos los denominados mohos, como *Penicillium*, *Aspergillus*, o el moho negro del pan, así como las setas en general. Éstas forman cuerpos fructíferos multicelulares, aunque la mayor parte vegetativa de la planta es micelial, y cuando se cultivan en el laboratorio su aspecto es muy parecido al de los mohos (10).

Como organismos sin clorofila, los hongos, a diferencia de las plantas verdes, no poseen la capacidad de realizar la fotosíntesis, por lo que necesitan el suministro del carbono fijado orgánicamente. Su nutrición se produce por la incorporación de elementos químicos simples como agua, sales, aminoácidos o monosacáridos a través de su pared celular y necesitan, por lo tanto, producir gran cantidad de enzimas hidrolíticas para degradar las sustancias orgánicas complejas, como proteínas, polisacáridos, etc. Muchos hongos usan la materia orgánica muerta como alimento por liberación de enzimas que digieren sustancias que contienen carbono, tal como la celulosa y materiales orgánicos. La metabolización de los carbohidratos sigue dos vías principales: la oxidación, que se realiza en condiciones de aerobiosis estricta y genera como productos finales dióxido de carbono y agua, y la fermentación, que se produce mejor en condiciones microaerófilas y determina la formación de ácidos o alcoholes. Estos procesos producen compuestos que los hongos usan como energía (azúcares, por ejemplo) y metabolitos secundarios, la mayoría de los cuales son tóxicos para las células humanas y animales y se denominan micotoxinas. Algunos de estos

compuestos secundarios, que son tóxicos para las células bacterianas, se denominan antibióticos, como es el caso de la penicilina. (2) (10).

La reproducción de los hongos se opera principalmente por la formación de esporas, que son células uni o multinucleadas destinadas a la diseminación o propagación de la especie a distancia. Dichas esporas pueden formarse por un procedimiento asexuado o mediante previa copulación sexual; en este último caso habrá una plasmogamia inicial, seguida de una carogamia con una fase diploide y la posterior meiosis reduccional que dará origen a un número de 2 a $2n$ esporas asexuadas (7).

2.2 ASPERGILLUS

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para algunos animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*, son de interés industrial, o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones (5).

2.2.1 MORFOLOGIA

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (fig. 1), y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato (5).

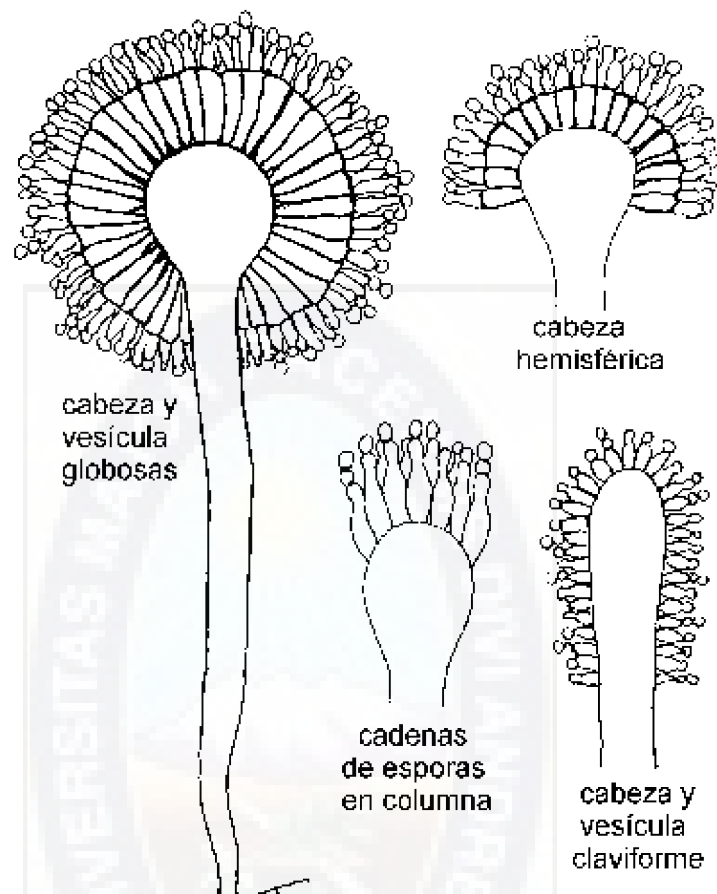


FIGURA N° 1: CONIDIOFOROS DE *Aspergillus ssp.*

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos (5).

2.2.2 CULTIVOS

La mayoría de las especies crecen sobre el medio de cultivo Czapek-Levadura, pero los aspergilos osmófilos, particularmente los miembros de las secciones *Aspergilli* y *Restricti*, se desarrollan sobre el medio Czapek-20% Sacarosa. La temperatura de incubación corriente es de 25°C, pero para algunos

miembros de la sección *Fumigati* es conveniente 37°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras (5).

Para el aislamiento se usan medios selectivos (Rosa de Bengala, Rosa de Bengala-Diclorán) con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberante de algunos mohos, dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia, aunque restringida si el número no es demasiado grande. Si solamente interesa determinar la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus*, se suele sembrar sobre el medio AFAP que es selectivo para dichas especies. Con el fin de identificar los aspergilos se suele sembrar en placas de Malta-Glucosa, Czapek-Levadura, Czapek-Glicerol o Czapek-20% Sacarosa, incubando a 5, 25 y 37°C registrando las características macro y micromorfológicas para acceder a la clave (5).

Con el fin de comprobar que los medios utilizados son adecuados para observar la velocidad de crecimiento y las características macro y microscópicas, es conveniente sembrar cepas obtenidas de una colección de referencia. La degeneración de las cepas (pleomorfismo) es un problema de muchos hongos, los cuales sufren cambios morfológicos como colonias algodonosas, reducción de la esporulación y modificaciones de los conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas cuando se los mantiene durante mucho tiempo mediante sucesivos repiques (5).

2.2.3 IDENTIFICACION

Tradicionalmente se hace con base en las características macro y micromorfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas, debido a la necesidad de conocer el contaminante para orientar la búsqueda de micotoxinas en un producto. Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de

granos y otros productos vegetales y técnicas moleculares con base en el polimorfismo del ADN nuclear y mitocondrial, el polimorfismo de tramos de fragmentos amplificados (AFLP), el polimorfismo de tramos de fragmentos de restricción (RFLP) y el polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) para estudios a nivel intra e interespecífico (5).



FIGURA N° 2: OBSERVACIÓN DE *Aspergillus flavus* POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (23).

2.2.4 AMBIENTE

La ubicuidad de los aspergilos se debe a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre substratos con diverso contenido de humedad (tabla 1). La colonización de los granos durante el almacenamiento por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación (5).

ESPECIES	TEMPERATURA ° C		ACTIVIDAD DE AGUA	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMO	ÓPTIMO
<i>A. flavus, A. parasiticus</i>	6 – 45	35 – 37	0.78	0.95
<i>A. candidus</i>	3 – 44	25 – 32	0.75	0.90 – 0.98
<i>A. fumigatus</i>	10 – 55	40 – 42	0.85	0.98 – 0.99
<i>A. restrictus</i>	9 – 40	30	0.71	0.96
<i>A. versicolor</i>	4 – 39	25 - 30	0.78	0.95

TABLA N° 1: TEMPERATURA Y ACTIVIDAD DE AGUA REQUERIDAS PARA EL DESARROLLO DE ALGUNAS ESPECIES DE *ASPERGILLUS* .

2.3. MICOTOXINAS

Las micotoxinas no son proteínas, no son anfígenos, sino compuestos de bajo peso molecular que no pierden su toxicidad por tratamiento térmico ni por la acción de los complejos enzimáticos del sistema gastrointestinal; por lo que podemos comprobar su acción toxica y de ahí su importancia (3).

Son varios los metabolitos secundarios de los aspergilos considerados micotoxinas: aflatoxinas, esterigmatocistina y otros, algunos de los cuales también son producidos por especies de penicilios, por ejemplo ácido ciclopiazónico y ocratoxinas (3).

1. HONGOS QUE PRODUCEN MICOTOXINAS DE ACUERDO CON EL HÁBITAT:	<i>ASPERGILLUS FLAVUS</i> <i>CLAVICEPS PURPUREA</i> <i>FUSARIUM</i> <i>GRAMINEARUM</i>
2. Hongos que se encuentran en las plantas:	<i>Fusarium moniliforme</i> <i>Helminthosporium</i> <i>biseptatum</i> <i>Rhizoctonia leguminicola</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>A.clavatus</i> <i>A.ochraceus</i>
3. Hongos que se encuentran en el almacenaje:	<i>Fusarium graminearum</i> <i>A. parasiticus</i> <i>F. moniliforme</i> <i>F. nivale</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>P. citrinum</i> <i>P. rubrum</i>

TABLA Nº 2: HONGOS QUE PRODUCEN MICOTOXINAS DE ACUERDO CON EL HÁBITAT (3).

2.3.1 FORMACION DE LAS MICOTOXINAS

La producción de forrajes conservados requiere de una adecuada aplicación de las técnicas de cultivo, recolección y almacenamiento. Un manejo inadecuado, entre los que cabe destacar una humedad excesiva en condiciones de aerobiosis, puede dar lugar a la aparición de toxinas producidas por hongos, cuyas especies más peligrosas pueden afectar en forma grave a los animales y al

hombre. Estos hongos incluyen especies de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Claviceps* y otros hongos endofíticos que son potencialmente productores de micotoxinas. Son múltiples factores que intervienen en el proceso de proliferación fúngica y de la contaminación con micotoxinas de los forrajes conservados. Los principales factores que se pueden citar son: (1):

- Tipo de suelo
- Susceptibilidad del cultivo
- Madurez de los granos en el momento de la cosecha
- Temperatura y humedad
- Daños mecánicos o los producidos por insectos y/o pájaros
- Tipo de almacenamiento.

Básicamente, y más allá del estadio de la cadena alimentaria que se esté analizando, se puede presentar el problema de la contaminación de la siguiente manera: hongos filamentosos, en condiciones ambientales favorables colonizan sintomática o asintomáticamente un vegetal, pudiendo conducir esta interacción a la producción de micotoxinas (1).

Es común que las condiciones óptimas para el crecimiento de las especies toxinógenas no coincidan con las que facilitan la producción de micotoxinas. Así, mientras el desarrollo óptimo de *Aspergillus flavus* ocurre a 36°C con una actividad de agua de 0,95, la producción de aflatoxinas es favorecida por una temperatura de 33°C a una actividad de 0,99, aunque pueda ser formada aun a 15°C con una actividad de agua de 0,95 (5).

La actividad agua se refiere a que los microorganismos tienen necesidad de agua, ya que sin esta no es posible que exista crecimiento; la cantidad de agua depende del microorganismo. Esta demanda de agua se expresa de forma más apropiada como agua disponible o actividad agua, que se define como la presión de vapor de la solución (de sustancias disueltas en agua en la mayoría de los

alimentos), dividida por la presión de vapor del disolvente (generalmente agua). Una humedad relativa en la atmósfera que rodea al alimento corresponde a una actividad agua inferior a la del alimento y tendería a desecar la superficie de éste; por el contrario, si la humedad relativa tuviese un valor más elevado que la correspondiente a la actividad agua del alimento, esta aumentaría en la superficie del alimento en cuestión (25).

Tanto en el campo como en el almacenamiento los factores ambientales no son constantes, por lo que puede ocurrir que habiendo un desarrollo fúngico apreciable, no se encuentre la cantidad de micotoxina esperada. Debido a su estabilidad, las micotoxinas pueden persistir aun cuando hayan muerto las esporas. Además influyen los requerimientos nutricionales de la especie particular. Por ejemplo, una escasa disponibilidad de Zn, elemento necesario para biosíntesis de aflatoxinas, puede determinar la baja incidencia de este metabolito en algunos substratos. En general, el aumento de los metabolitos secundarios es una respuesta al "stress". Si éste es causado por un biocida en concentración subletal, provoca un aumento de la biosíntesis de micotoxinas (5).

La contaminación de los productos agrícolas con micotoxinas de *Aspergillus* se debe a la invasión del hongo saprobio, oportunista sin capacidad patogénica; así las cepas de *Aspergillus flavus* suelen infectar antes de la cosecha a semillas de algodón, maníes o granos de maíz en crecimiento. Los insectos están asociados a la presencia de aflatoxinas en granos debido a que pueden actuar como vectores, pero las larvas no son inmunes al efecto tóxico. La aplicación de insecticidas limita el daño por insectos, pero no suele eliminarlos ni evita la infección fúngica de los granos (5).

Con el fin de conocer la situación de peligro se buscan las micotoxinas en los productos alimenticios y forrajeros, pero muchas veces hay que comenzar por el aislamiento e identificación de los mohos para prever cuales toxinas podrían estar presentes. El análisis cuantitativo de las micotoxinas se hace mediante

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por espectrofotometría, fluorimetría o espectrometría de masas, cromatografía en capa fina (TLC) con densitometría de las manchas fluorescentes o coloreadas y los inmunoensayos. Estos últimos son muy sensibles debido a que hay una interacción altamente específica entre el anticuerpo y la toxina, por lo que tales análisis pueden hacerse con poca purificación de la muestra (5).

2.3.2 MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR EL GÉNERO *Aspergillus*

Ahora es bien conocido que algunos hongos producen una única toxina, otros pueden producir muchas y diferentes géneros de hongos pueden producir la misma micotoxina. Muchos géneros, entre ellos *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Fusarium* y *Penicillium*, producen micotoxinas. Mientras que la evidencia indica que la ingestión de pienso mohoso es la vía primaria de la micotoxicosis animal, las esporas de hongos esparcidas por el aire y las plantas particuladas infestadas/infectadas pueden también inducir enfermedad letal tanto en animales como en personas (8).

2.3.2.1 AFLATOXINAS

La química y el metabolismo de las aflatoxinas se encuentran descritos en la literatura (Figura 3). La aflatoxina B₁ es metabolizada por los sistemas microsómicos a un rango de metabolitos. El metabolito activo se supone que sea el 8-9 epóxido de la aflatoxina B₁. La inactivación depende de la conjugación del glutatión, y la susceptibilidad a la intoxicación aguda depende de la actividad de la enzima glutatión-S- transferasa. El epóxido B₁ se une en forma covalente a un rango de proteínas que tienen tanto actividades estructurales como enzimáticas. La fosforilación de las proteínas también se altera con la aflatoxina B₁. Todas las aflatoxinas son genotóxicas (5).

La aflatoxicosis en humanos se asocia con el consumo de aflatoxina de comida contaminada con el hongo *Aspergillus flavus*. Un gran número de

aflatoxinas con un rango de potencia ($B_1 > G_1 > B_2 > G_2$) son producidas por *Aspergillus*, y las proporciones relativas dependen de la especie del hongo (8).

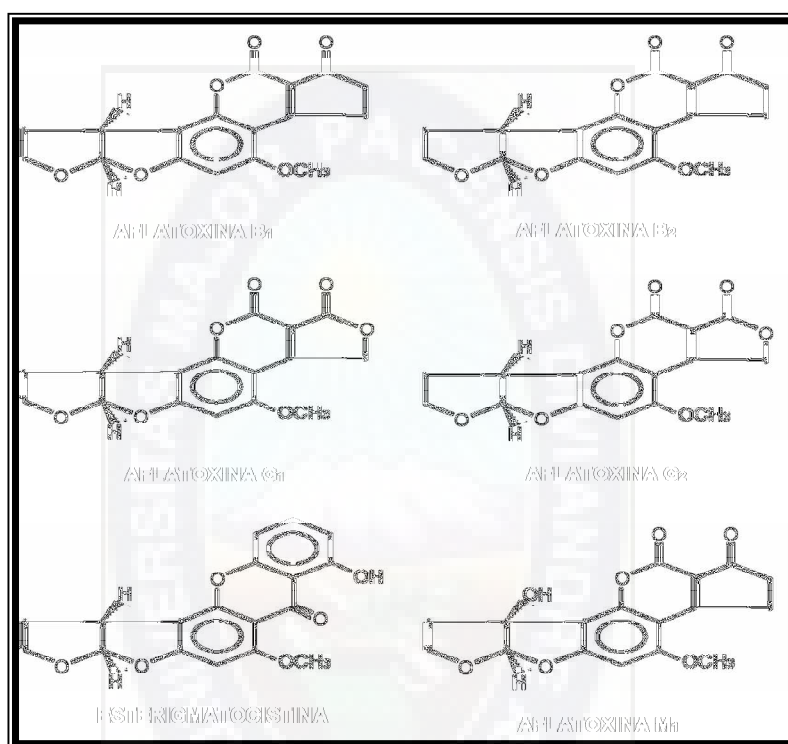


FIGURA N° 3: AFLATOXINAS PRODUCIDAS POR *Aspergillus flavus*

Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (blue y green por sus nombres en inglés) observada bajo luz UV, mientras que los subíndices 1 y 2 indican componente mayor y menor respectivamente. En estado puro son polvos cristalinos que se descomponen al alcanzar el punto de fusión (B₁ 268-269°C, B₂ 286-289°C, G₁ 244-246, G₂ 237-240, M₁ 299°C, M₂ 330°C). Estas toxinas se encuentran con más frecuencia sobre oleaginosas aunque también en cereales, especialmente de zonas cálidas. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son el producto metabólico hidroxilado de las B₁ y B₂. Alrededor del 1% de la aflatoxina B₁ consumida con el forraje es excretada en leche como M₁ (5).

El rango de temperatura para la producción de aflatoxinas va de 7,5-12 a 40-41°C según los hongos y las condiciones experimentales. Una humedad relativa menor del 85 % detiene el crecimiento de los hongos productores de estas toxinas, lo que corresponde a un contenido de humedad de más de 16 % y a una actividad del agua igual a 0,85. La elaboración de las toxinas sucede poco después de la infección de las mazorcas a la temperatura ambiente y en dos días puede alcanzar una concentración de 200 ng/g, llegando a 2.000 ng/g luego de nueve días a 26-34°C. Se observa una gran variación de la contaminación fúngica, transmitida por insectos, entre los granos de una misma mazorca y entre las mazorcas de un mismo cultivo. El estrés hídrico de la planta asociado con altas temperaturas es la principal causa de contaminación; también contribuyen una escasa disponibilidad de fuente nitrogenada en el suelo así como un exceso esta (5).

La exposición a las aflatoxinas es difícil de evitar porque no es sencillo prevenir el crecimiento fúngico en los granos y otros productos. Los límites a la concentración de aflatoxinas para proteger la salud humana y animal, establecidos por distintos países e instituciones son variables. Por ejemplo, Canadá aceptó el límite de 50 ng de aflatoxina M₁/L de leche, propuesto por la Comisión Codex sobre Contaminantes y Aditivos Alimentarios (FAO-WHO) pero no Brasil, pues sufriría un gran impacto económico si se aplicara en ese país. Un ng/kg de peso corporal/día de aflatoxina B₁ o aun menos, contribuye al riesgo de contraer cáncer hepático. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos estableció como límites máximos la concentración de 20 ng/kg para granos y otros forrajes destinados a la crianza animal y vacas lecheras, 100 ng/kg para granos destinados al ganado y cerdos reproductores así como gallinas ponedoras, 200 ng/kg para granos empleados en el engorde de cerdos y 300 ng/kg para los destinados al engorde de la hacienda (5).

El uso de un nivel máximo de contaminación reduce la ingesta promedio de toxinas por la población, aunque la aplicación de un límite de 20 ng de

aflatoxinas/kg resulta en el rechazo de un 4% de las muestras con un nivel de 0,9 ng/kg, mientras que un límite de 10 ng/kg impide la aceptación del 6,2% de las muestras con valores entre 0,3 y 0,6 ng/kg. Si todos los lotes con una contaminación superior a 20 ng/kg se eliminaran de la dieta “europea”, la ingesta diaria estimada promedio sería 19 ng/persona por día, mientras que con una dieta “oriental” sería 125 ng/persona por día (5).

Las aflatoxinas son potentes carcinógenos, mutagénicos y teratogénicos, y son grandes agentes destructores del sistema hepático. La más potente es la toxina B₁ mientras que la M₁ tiene una potencia diez veces menor (3).

La exposición a las aflatoxinas también se produce por el polvo suspendido en el aire, generado durante la cosecha en el campo (67 ng/m³), la descarga de los granos (92 ng/m³), la limpieza de los silos (4849 ng/m³) y las operaciones de alimentación animal (421 ng/m³). Los polvos contaminados están asociados a un aumento de la incidencia de tumores de las vías respiratorias superiores. Los valores de la DL50 oral para especies animales más comunes se presenta en la tabla 3 (5).

Especie Animal	DL50 mg/Kg oral
Paticos y Pavitos	0,335
Conejos	0,3
Cerdos	0,62
Ganado ovino	1,0
Ganado vacuno	2
Gallo y Gallina	20
Ratas macho	7,2
Ratas hembras.	17,9

TABLA Nº 3: DOSIS LETAL 50 mg/Kg ORAL DE AFLATOXINAS (3)

2.3.2.1.1 AFLATOXINAS EN AMBIENTES LABORALES

El papel de las micotoxinas en la vida de los hongos no ha sido establecido claramente, aunque una importante función parece ser la competición reguladora con otros organismos. Las micotoxinas son muy diferentes en estructura molecular, desde simples moniliformes (cuya disposición es similar a las cuentas de un collar) hasta complicados polipéptidos de peso molecular alrededor de 2000. En general estos compuestos no son volátiles y permanecen asociados a la estructura de los hongos, esporas incluidas, o en el substrato en el que crecen los hongos. Aunque la formación de toxinas por parte de los hongos no es un proceso totalmente generalizable, se parte de la idea de que si un hongo que produce toxinas está presente en el ambiente, probablemente su toxina también lo estará (10).

2.3.2.1.1.1 EFECTOS SOBRE LA SALUD

Los efectos nocivos de las micotoxinas sobre la salud humana son conocidos desde hace tiempo. La enfermedad de "La feria de San Antonio", por ejemplo, adquirida por los espigadores de centeno (contaminado por hongos toxicogénicos) en los campos después de la cosecha, se halla documentada desde la Edad Media. A principios de los años sesenta murieron cerca de 100.000 pavos en Inglaterra después de haber comido pienso contaminado con hongos *Aspergillus*. Desde entonces se han publicado diferentes estudios sobre la toxicología de las micotoxinas, que suelen afectar, aparte de órganos concretos, a los sistemas inmune y nervioso y presentan carácter carcinogénico (10).

Las aflatoxinas fueron aisladas a partir de los años sesenta, cuando la extensión del tumor de hígado en los animales de crianza ingleses y estadounidenses alcanzó niveles alarmantes. Los estudios que se iniciaron rápidamente llevaron a la identificación de los agentes etiológicos que producían dichas alteraciones y que estaban contenidos en alimentos contaminados con

Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus*. Las aflatoxinas más importantes que se conocen son las B (AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}) y G (AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}), denominadas así por la fluorescencia azul y verde respectivamente emitida por excitación a 365nm, las M (AFM₁ y AFM₂) aisladas de la leche, del cultivo de *A. flavus* y de los cacahuates enmohecidos y la aflatoxina R₀ llamada también aflatóxico (3).

El aspecto más importante a destacar, es que algunos de estos compuestos son potentes carcinógenos asociando a la etiología del cáncer de hígado en algunos países tropicales. La más tóxica de las aflatoxinas es la AFB, denominada comúnmente B₁, que da una respuesta muy positiva en el test de Ames y al de carcinogenicidad sobre ratas y truchas; se la considera como una de las sustancias conocidas con mayor poder mutágeno y cancerígeno. Es también un tóxico para la reproducción y tiene actividad inmunodepresora (10).

2.3.2.1.1.2 INHALACION

La inhalación de material contaminado con micotoxinas tiene como consecuencia su transporte al tejido superficial alveolar, donde puede interferir en la eliminación normal de partículas por el sistema macrófago. Puede producirse, además, un incremento de las infecciones por bacterias oportunistas (10).

Aunque la mayor parte de los hongos producen micotoxinas, los más conocidos y, posiblemente, los metabolitos más tóxicos los producen las especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillum*, *Stachybotrys*, y *Myrothecium*. Sin embargo, aunque ninguno de estos hongos es abundante al aire libre y sólo adquieren niveles muy altos durante las actividades agrícolas, pueden ser contaminantes habituales en ambientes interiores (10).

Dado que las micotoxinas no son sustancias volátiles, normalmente sólo existe la exposición por inhalación cuando pasan al medio ambiente partes de los hongos, las esporas, en las cuales se ha comprobado que existe concentración

elevada de toxinas o de substrato contaminado (por ejemplo, polvo de grano). Algunos de ellos han sido recogidos relacionándolos con varias formas de cáncer debido a la exposición a aflatoxinas en el medio ambiente en granjas, o durante la manufactura de productos que se hallaban contaminados (10).

Finalmente, también se ha estudiado la exposición de los granjeros y otros trabajadores agrícolas a las aflatoxinas mediante su determinación en ambiente. Se tomaron muestras durante el proceso de varias operaciones agrícolas con maíz contaminado: recolección, traslado en cintas transportadoras, almacenamiento, etc. Se recogieron muestras de polvo sobre filtros de fibra de vidrio, con un muestreador Andersen de alto volumen. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de un potencial peligro de inhalación de las aflatoxinas que contiene el polvo. Dada su elevada toxicidad y carcinogenicidad sobradamente demostrada en estudios con animales, se sugirieron medidas de protección a los trabajadores expuestos (10).

Se ha demostrado también que la presencia de flora fúngica variada procedente del medio natural, retarda la producción de micotoxinas en los mohos. La presencia de mohos en un sistema de ventilación, climatización y calefacción (HVAC) o en algún otro lugar del local no es suficiente para confirmar la existencia de contaminación por micotoxinas, por lo que se debe tener en cuenta las condiciones particulares de cada sistema HVAC (humedad, temperatura y substrato nutritivo por depósito de aerosoles y de polvo) y la existencia o no de competitividad entre la diferente flora fúngica. En lo que se refiere a las dosis mínimas con efectos tóxicos, éstas varían según las micotoxinas, la especie animal y la vía de administración (10).

2.3.2.2 OCRATOXINA A

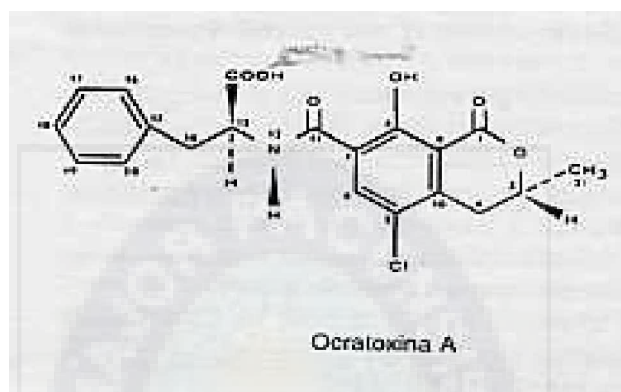


FIGURA N° 4: OCRATOXINA

En áreas cálidas, las ocratoxinas (figura 4) son formadas por especies de *Aspergillus*; pero en climas más fríos, por cepas de *Penicillium*. Las especies productoras se encuentran en las secciones *Circumdati* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. auricomis*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum*, *A. sulfureus*), *Flavi* (*A. alliaceus*, *A. albertensis*), *Nigri* (*A. niger*, *A. carbonarius*) y *Aspergillus* (*Eurotium herbariorum*). El valor mínimo de actividad del agua para la producción de toxinas está entre 0,83 y 0,87 para aspergilos, con un óptimo de 0,99 a 24°C, mientras que el rango de temperatura a la actividad del agua óptima está entre 12 °C y 37°C (5).

La ocratoxina A es una sustancia que provoca adenoma y cáncer renal en los animales de experimentación. El Comité de Expertos sobre Aditivos y Contaminantes de Alimentos de la FAO/OMS, estableció una ingesta semanal tolerable máxima de 0,1 mg por kg de peso corporal. Los límites en Europa son 5 mg/kg en cereales y 3 mg/kg en derivados (5).

2.3.2.3 ESTERIGMATOCISTINA

Este compuesto puede ser un precursor en la biosíntesis de las aflatoxinas (figura 5). Produce los mismos efectos, es tóxico, carcinogénico, mutagénico y teratogénico, pero su actividad es menor que la aflatoxina B₁ (5).

Los productos afectados por las micotoxinas incluyen maíz, nuez de Brasil, maní, pistacho, semillas de algodón, de melón, de sésamo, de girasol, almendras, calabazas, nuez moscada, etc (5).

Sin embargo, cualquiera de los alimentos nombrados, en condiciones de alta temperatura y humedad pueden desarrollar aflatoxinas en el almacenamiento. También la presencia de insectos y roedores puede influir en la infección (5).

La producción de esterigmatocistina se observa en un rango de hongos que incluye *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Chaetomium*, *Farrowia* y *Monocillium*. Entre los aspergilos productores se encuentran *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. caespitosus*, *A. multicolor*, *Emericella nidulans*, *Emericella quadrilineata*, *Emericella rugulosa*, *Emericella varicolor*, *Emericella unguis* y otras especies, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium repens* y *Eurotium rubrum* (5).

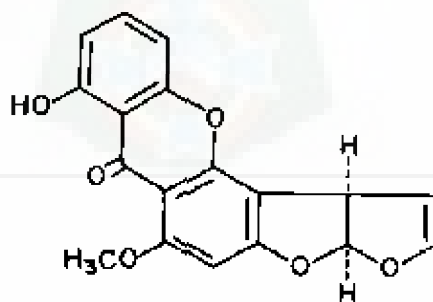


FIGURA N° 5: ESTERIGMATOCISTINA

2.3.2.4 ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO

La mayoría de las cepas de *Aspergillus flavus* y algunas de *A. caelatus* producen ácido ciclopiazónico (figura 6) junto con aflatoxina B₁ y ambas toxinas potencian su acción sinérgicamente, mientras que la mayoría de las cepas de *A. tamarii* forman ácido ciclopiazónico (5).

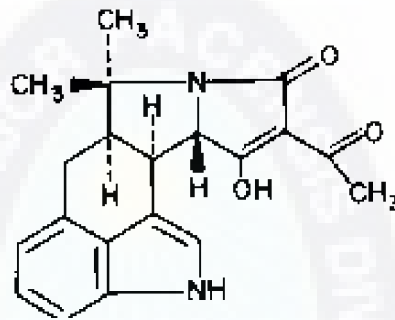


FIGURA Nº 6: ACIDO CICLOPIAZÓNICO

2.3.2.5 NEUROTOXINAS

Los fumitremógenos provocan temblores en el ganado que consume forraje contaminado con *A. fumigatus* y *A. caespitosus*, además son formados por *N. fischeri* y algunos penicilios (5).

Estos mismos hongos producen una toxina relacionada, verruculógeno, que genera iguales síntomas en los animales de laboratorio. *A. terreus* y *A. flavus* forman, respectivamente, territrem y aflatrem, ambas causantes de temblores. La dosis letal oral (DL50) de verruculógeno y fumitremógeno en ratón es 2,4 y >5 mg/kg de peso corporal respectivamente, la DL50 oral de aflatrem es 5 mg/kg de peso corporal en ratón (5).

2.3.3 NIVEL DE AFLATOXINAS EN LOS ALIMENTOS

Debido a la alta toxicidad y a la acción cancerígena de las aflatoxinas, aproximadamente sesenta países publicaron reglamentaciones referentes a la

contaminación de los productos alimenticios y de los piensos. En los países industrializados, las cantidades máximas admisibles de aflatoxina (límite máximo de residuos = LMR) oscilan generalmente entre 5 y 300 µg/kg (13).

Las concentraciones de micotoxinas se expresan en mg/kg ($1/10^9$), lo que equivale a la relación que existe entre una regla de dibujo y la distancia entre la Tierra y la Luna. La acción de estas pequeñas cantidades es acumulativa, y la enfermedad se manifiesta, en algunos casos, al cabo de meses o años (13).

Esto ocurre principalmente con las toxinas mutagénicas. La aflatoxina B₁ causa cáncer hepático. Además, un factor adicional que aumenta la sensibilidad a las micotoxinas es la infección viral hepática (13).

Entre los factores valorados para establecer límites a la presencia de micotoxinas en los alimentos se encuentran:

- o La distribución de la micotoxina en el producto.
- o Las limitaciones inherentes al método de análisis.
- o La evaluación de los riesgos y el potencial tóxico.
- o La disponibilidad de alimentos para la población.

La ocratoxina A también fue considerada como posible cancerígeno y los valores presentes en granos han llegado hasta un máximo de 5 mg/kg. El JECFA estimó tolerable una ingesta semanal máxima de 0,1 mg/kg peso corporal. y se establecieron límites de 1 a 50 mg/kg para el consumo humano, y veinte veces más para los animales (4).

Los sistemas integrados de gestión de micotoxinas deben considerar los puntos de control, desde el campo hasta el consumidor. Este tipo de sistema de gestión tiene en cuenta la comunicación entre expertos en el control antes y

después de la cosecha y en el transcurso de ésta. En un sistema de este tipo, cada fase de la producción contribuiría a reducir el riesgo, de manera que cuando el alimento/pienso final llegara al consumidor, los peligros asociados con la contaminación por micotoxinas se habrían reducido al mínimo (3).

2.4. MICOTOXICOSIS

Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados, y secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas (8).

Su presencia en niveles superiores a los tolerables representa una amenaza para la inocuidad de los alimentos y un riesgo importante en salud alimentaria. No obstante, la posible toxicidad crónica de muchas micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas o zearalenona, entre otras) en bajas dosis suele suscitar mayor preocupación que la toxicidad aguda. La mayoría de los mohos reducen el valor nutritivo de los alimentos, en especial los que se proporcionan al ganado. Puesto que muchos de ellos generan micotoxinas; la FAO estima que las cosechas mundiales de granos se encuentran afectados en un 25% (1).

Esta afectación preocupa por varios motivos. En primer lugar, y aunque los efectos de las micotoxinas no suelen ser graves en animales, salvo excepciones, se ha comprobado que pueden pasar a humanos. Algunas de las micotoxinas evaluadas hasta la fecha se han clasificado como carcinógenos muy poderosos (1).

Aunque sería imposible eliminar por completo las micotoxinas de los alimentos, es importante asegurarse de que sus niveles no representen una amenaza para la salud (1).

Las características de una micotoxicosis son las siguientes:

- No es una enfermedad transmisible.
- En los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del hongo.
- El brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje específico.
- El examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica.

Los primeros casos de micotoxicosis conocidos se debieron al centeno contaminado con *Claviceps purpurea*, en la Edad Media. En 1912 Quevedo, en la Argentina, describió la acción de los metabolitos tóxicos de un *Aspergillus* del maíz sobre varias especies animales, lo que constituye la primera observación científica de las micotoxicosis en Sudamérica. En 1960 la intoxicación masiva de pavos en Inglaterra llevó al aislamiento de las aflatoxinas, llamadas así pues las producen especies del grupo *Aspergillus flavus* (7).

La mayoría de las micotoxicosis animales se deben al consumo de forrajes que han sido deteriorados por la actividad de una compleja microbiota saprobia. Se conocen algunas especies que inhiben la producción de aflatoxinas, por ej. *Trichoderma viride* Pers. A su vez, *A. flavus* impide la formación de toxinas en un cultivo mixto con *A. alutaceus* o *A. versicolor*. También *A. flavus* y *A. alutaceus* inhiben la formación de toxinas de *M. roridum* en un cultivo mixto (5).

2.4.1 METABOLISMO FUNGICO

Los hongos pueden crecer en un amplio rango de temperaturas que varían entre los 5°C y los 45°C, pero la mayor parte lo hacen en forma óptima entre los 20°C y los 39°C. Igualmente, toleran una amplia gama de pH, entre 2 y 8, pero su desarrollo óptimo se obtiene entre 5,6 y 7,2 (7).

Un medio de cultivo para hongos debe tener como elemento básico el agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales. Son capaces de aprovechar una gran diversidad de fuentes de carbono: polisacáridos, disacáridos y monosacáridos. Las fuentes de nitrógeno pueden ser proteínas, aminoácidos, sales de amonio o nitratos. Los minerales más importantes son fosfatos de sodio y potasio, sulfato de amonio, sulfato ferroso, sulfato de magnesio y cloruro de sodio (7).

Existe una estrecha correlación entre la fisiología, condicionada por las características del medio (nutrientes, temperatura, pH, etc.), y la morfogénesis (7).

2.4.2 MECANISMO DE ACCION PATOGENA

Los hongos poseen tres mecanismos de acción patógena principales: la liberación de toxinas, la invasión o proliferación en los tejidos animales con el desarrollo por parte de estos últimos de una respuesta inmune originada por los antígenos fúngicos y la sensibilización con desarrollo de una respuesta alérgica a hongos saprofitos (7).

2.4.3. ASPERGILOSIS

2.4.3.1 EPIDEMIOLOGÍA

Los hongos del género *Aspergillus* se encuentran en el ambiente y tienen una distribución geográfica universal. Se observa una mayor concentración de esporas de estos hongos en ambientes húmedos, con gran cantidad de plantas, y en la tierra (7).

Los hongos del genero *Aspergillus* son capaces también de producir toxinas llamadas micotoxinas que generan enfermedad en el hombre y en los animales, ya sea cuando estos ingieren directamente al hongo o cuando el hongo contamina granos o alimentos balanceados. Pueden invadir o proliferar sobre

tejidos humanos y liberar sus antígenos, o provocar enfermedades a través de sus toxinas. Estas últimas pueden originarse en hongos dentro de los tejidos humanos (fibrinolisis, hemolisinas y citotoxinas), o liberarse en granos almacenados que son luego ingeridos por el hombre o los animales (aflatoxinas y otras micotoxinas) (7).

Poseen esporas que contaminan habitualmente la atmósfera de todas partes del mundo; cuando son inhaladas se eliminan rápidamente por la fagocitosis y lisis de neutrófilos y macrófagos. La aparición de enfermedad dependerá del estancamiento de las esporas en cavidades revestidas de epitelio o de la falla de fagocitosis, como sucede en la cetoacidosis diabética o en las enfermedades malignas de los órganos hemocitopoyéticos (7).

2.4.3.2 MORFOLOGIA

Presentan un micelio hialino tabicado cuyas ramificaciones dicotómicas en los tejidos son características. Las esporas asexuadas externas se generan a partir de esporoforos que poseen una célula pie en la zona de contacto con el micelio vegetativo y una dilatación vesiculosa en el otro extremo a partir de la cual nacen esterigmas que se disponen en uno o dos series. De acuerdo con las características de estos esporoforos y sus correspondientes esporas, se clasifican en una gran variedad de especies (7).

Los hongos *Aspergillus* del grupo *flavus* se presenta con frecuencia como agentes de formas diseminadas en huéspedes neutropénico; poseen una cabeza aspergilar globulosa con una o dos series de esterigmas en el extremo de un esporoforo largo y rugoso (7).

2.4.3.3 RESPUESTA INMUNE

A diferencia de otras micosis sistémicas, el principal mecanismo de defensa frente a estos hongos es la fagocitosis. Los macrófagos tienen la capacidad de endocitar las esporas y destruirlas. Este mecanismo es el que se encarga en

forma constante de eliminarlas de todo el árbol respiratorio (macrófagos alveolares). Los polimorfonulceares, en cambio, presentan la propiedad de producir la depuración de los micelios vegetativos de estos microorganismos. Los hongos del género *Aspergillus* son capaces de estimular la producción de anticuerpos de tipos IgG, IgM e IgE. Se han demostrado cuadros de hipersensibilidad de tipo I (atopia), como ocurre en el asma aspergilar, y de tipo III, en los cuales se producen depósitos de inmunocomplejos con subsiguiente vasculitis en los cuadros de aspergilosis broncopulmonar alérgica (7).

2.4.4 AFLATOXICOSIS

Los síntomas asociados con la aflatoxicosis son: ictericia, fiebre, ascitis, edema de los pies y vómito. Los principales órganos afectados son: hígado, riñón y cerebro (4).

La AFB₁, es absorbida vía tracto gastrointestinal dentro del sistema portal sanguíneo y es llevada al hígado donde se metaboliza. Una porción de aflatoxina se activa y se fija en el tejido hepático (4).

Algunos metabolitos conjugados de la AFB₁ solubles en agua, se los excreta dentro de la bilis y van a las heces. La Glucurono y Sulfoconjugación se producen específicamente en los microsomas de hígado (Retículo Endoplásmico Liso).

Estas sustancias altamente hidrofílicas son capaces de oxidar sustancias lipofílicas, formando compuestos denominados "epoxis", los cuales pueden reaccionar con los grupos nucleofílicos de ADN y de algunas proteínas. Estas reacciones necesitan del oxígeno y del NADPH (reducido), un átomo de oxígeno se fija sobre el sustrato y el otro es reducido en agua (el NADP se oxida) (4).

Otras formas conjugadas solubles en agua, productos de degradación de la AFB₁ y metabolitos no conjugados de ésta, se las excreta en el sistema circulatorio sanguíneo y se distribuyen sistémicamente (4).

Eventualmente esos residuos mencionados van a la leche, huevos, músculo y tejidos comestibles. La AFM₁ es uno de esos derivados metabólicos que van a la leche contaminándola (4).

2.4.4.1 TOXICOCINETICA

Una vez absorbida la micotoxina desde el tracto digestivo, llega al tejido hepático y produce las alteraciones fisiológicas e histológicas. Su distribución en el organismo no tiene mayor información, especialmente en lo que concierne a su acumulación en algún tejido en particular. Se habla, sin embargo, que el límite permisible de la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, es 10 mg/Kg ó 5mg/Kg para la aflatoxina B₁ sola (2).

Los animales extremadamente susceptibles a las aflatoxinas, las biotransforman en el hígado en metabolitos que pueden resultar más tóxicos que las mismas aflatoxinas, mientras que aquellos animales menos susceptibles probablemente las metabolizan en menor grado (2).

Es posible que las aflatoxinas sean excretadas con rapidez, ya que dentro de las 24 horas de haber sido ingeridas, su nivel en el organismo desciende por debajo del límite de detección (2).

2.4.5 MODO DE ACCION DE LAS AFLATOXINAS

Cuando la exposición al alimento contaminado es baja, pero de larga duración (25 a 80 ppb por más de 25 días), se presenta la toxicidad crónica (4).

Es fundamental tener en cuenta que la intoxicación subaguda o crónica a causa de AFB₁ (Aflatoxicosis) en vacas de leche y animales en engorde, se

caracteriza por presentar un síndrome hepatotóxico tipo distrófico con infiltración grasa (lipidosis) y colangiopatía tipo obliterante (4).

Este estado de origen micotóxico es debido a la ingesta de aflatoxina B₁. Como esta intoxicación es acumulativa y el depósito se localiza en el lugar de su detoxificación (hígado), es lógico suponer que la agresión de las toxinas desencadena la enfermedad en el hepatocito (4).

Es importante saber que una vez que se han producido las toxinas, éstas no desaparecen en el procesamiento de los alimentos, salvo que estos últimos sean sometidos a termoproceso. Este sistema modifica químicamente la toxina por el vapor a presión, con lo cual el consumo se torna menos peligroso (4).

2.4.6 MECANISMO DE ACCION DE LAS AFLATOXINAS

Se ha planteado la inducción de necrosis y tumores hepáticos en ratas que pueden observarse a la combinación de macromoléculas intercelulares vitales. La Aflatoxina B₁ se combina con el ADN, inhibiendo así la síntesis de RNA, proteína y enzimas (3).

Se combina con las macromoléculas celulares imputándose a estos la citotoxicidad y carcinogenicidad de las Aflatoxinas B₁. El mecanismo de acción de las aflatoxinas en el organismo tiene la siguiente secuencia:

- a) penetración a las células y sus núcleos (3).
- b) combinación con el DNA (3).
- c) reducción de la síntesis del RNA, especialmente del m-RNA (3).
- d) en pocos minutos bloquean la proteosíntesis, y a causa de la inhibición del m-RNA también se inhibe la mitosis (3).

e) la inhibición de la mitosis es seguida por la muerte celular (3).

2.5 TOXICIDAD DE LAS MICOTOXINAS

Actualmente se considera que las aflatoxinas constituyen la micotoxina de mayor riesgo para la salud, en especial por su potencial carcinogénico para el hígado humano. Entre ellas, la aflatoxina B₁ está considerada como la de mayor riesgo, seguida por la aflatoxina M₁ con una potencia de un orden de magnitud inferior (1).

Los estudios realizados sobre alimentos con aflatoxinas (10 mg/kg o 20 mg/kg) aplicados a modelos de población, revelan que los grupos en los que la prevalencia de individuos positivos al antígeno superficial de la hepatitis B es baja y/o en la que la ingesta media de aflatoxinas es baja (inferior a 1 ng/kg de peso corporal al día), no muestran diferencias significativas de cáncer respecto a la población. Sin embargo, las poblaciones en las que tanto la prevalencia de individuos positivos al antígeno superficial de la hepatitis B como la ingesta de aflatoxinas son altas, se encuentran mucho más expuestas al riesgo de sufrir cáncer. En este sentido, una reducción de la concentración de aflatoxinas actuaría como factor de prevención (1).

2.5.1 EVALUACIÓN DEL RIESGO Y TOXICIDAD

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) evalúa aditivos alimentarios, contaminantes, sustancias tóxicas naturales y residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos y proporciona asesoramiento científico a la Comisión del Codex Alimentarius. Hasta la fecha, el JECFA ha evaluado tres micotoxinas: las aflatoxinas B, G y M, la patulina y las fumonisinas (1).

La FAO clasifica a los diferentes peligros en función de los riesgos comprobados o potenciales para la salud humana. En términos generales, la

Organización de Naciones Unidas considera que el riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas es entre moderado y bajo en comparación con otras familias de compuestos, como los de origen microbiológico. En cualquier caso, es mayor que el derivado de aditivos, contaminantes químicos o pesticidas (1).

El riesgo se incrementa, según la clasificación de la FAO, cuando se habla de efectos crónicos. A este nivel, las micotoxinas son el grupo de sustancias que mayor preocupación suscitan en el organismo internacional, seguido de contaminantes y fitotoxinas (1).

Otros productos afectados por micotoxinas como resultado de la alimentación con productos contaminados, son la carne, la leche y los huevos. Por lo que se ha comprobado que las micotoxinas son dañinas para los animales y los seres humanos, ocasionando una amplia gama de efectos. En general, disminuyen la resistencia a enfermedades, aumentan la sensibilidad al estrés y usualmente afectan los síntomas de digestión internos (riñón e hígado en particular). Esto trae como consecuencia mayor mortalidad, aumento en los costos de medicamentos y disminución de la producción (3).

Con esto tenemos al menos una idea de las pérdidas económicas a causa de las micotoxinas, además de que con la proliferación de estas se producen alteraciones en los alimentos, en particular de los piensos, como son degradación de vitaminas A y E, aminoácidos, almidón, etc. (3).

Sin lugar a dudas, el grado de contaminación de los piensos está dado por las condiciones ecológicas y en particular por la humedad (3).

2.5.2 FACTORES QUE INFLUENCIAN LA TOXIGENICIDAD

Las condiciones de crecimiento que permiten la toxigenesis son más limitadas que aquellas que posibilitan el crecimiento del hongo. Entre los factores

que conducen a la presencia de micotoxinas en los alimentos, hay dos categorías principales (4):

- 1) Factores intrínsecos: son la actividad hídrica, el pH y el potencial de reducción-oxidación.
- 2) Factores extrínsecos: son aquellos que influyen en la producción de micotoxinas como la humedad relativa, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (4), (13).

Los hongos que afectan los granos pueden clasificarse en dos grupos: el 1º Los llamados hongos del campo, debido a que invaden los granos antes o durante la cosecha. Incluyen especies como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Helminthosporium* El 2º grupo los llamados hongos del almacenamiento, grupo formado principalmente por *Aspergillus* y *Penicillium* (4), (13).

2.5.2.1 FACTORES INTRINSECOS

La producción de una determinada micotoxina no está asociada con una especie en particular sino con una cepa en concreto, y en algunos casos incluso depende del sustrato en que se aísla a la cepa es aislada (4).

En una misma especie fúngica, no todas las estirpes se comportan de la misma forma. Así pues, la estirpe NRRL 1957 de *Aspergillus flavus* no produce aflatoxina, sin embargo otras estirpes como: NRLL 3251, NRRL 3357, NRRL 3517 y NRRL 3353 si la producen (4).

Los parámetros que afectan al nivel de residuos de micotoxinas en animales son:

1. - Especies y raza de los animales. La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la microflora, y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido

de humedad del sustrato y además la rotura del pericarpio permite la infección del interior del grano (4).

2. - Concentración de micotoxina, cantidad y duración del consumo de alimento contaminado (4).

2.6 HONGOS TOXIGÉNICOS 'NATURALES'

La presencia de una micotoxina y el peligro asociado, solamente puede ser determinada después de su extracción e identificación de la misma debido a (6):

- o La presencia del hongo no asegura que exista una micotoxina (6).
- o La micotoxina continúa en el alimento aunque el moho haya desaparecido (6).
- o Un hongo dado puede producir más de una micotoxina (6).
- o Una determinada toxina puede ser formada por más de una especie de mohos (6).

La contaminación de los productos hortícolas y animales con micotoxinas no es grande, mientras que la de los granos es variable. En la tabla 4 se indican algunos de los mohos toxigénicos y las micotoxinas que han se han hallado en frutas, hortalizas, productos de granja y granos diversos (6).

Algunos mohos toxinogénicos no producen micotoxinas sobre todos los sustratos, pero tampoco se buscaron todas las toxinas que potencialmente podrían producir en los materiales amohosados (6).

2.7 HONGOS EN EL CAMPO Y EL ALMACENAMIENTO

Los hongos adquiridos en el campo son *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Verticillium*, además de otros fitopatógenos

y las especies difieren según el vegetal, el clima y la región geográfica. Requieren generalmente una humedad relativa entre el 90% y 100% y un contenido de agua en las semillas de 22% a 23% para crecer, con un amplio rango de temperatura entre 0°C y 30°C, aunque algunos pueden desarrollarse a 35°C o más (6).

La colonización de las partes aéreas de las plantas por los microorganismos comienza tan pronto como son expuestas al aire. Las bacterias suelen aparecer primero, luego las levaduras y finalmente los hongos filamentosos saprobios y patógenos. Los mohos continúan desarrollándose a lo largo de todo el crecimiento de la planta, lo que se acentúa cuando envejece y las semillas maduran. La cosecha perturba el ecosistema, y las condiciones relativamente estables del almacenamiento entrañan un profundo cambio en la composición de la microbiota. Los restos vegetales abandonados en el campo suelen albergar esclerocios, como en el caso de *A. flavus*, que serán la fuente de contaminación del cultivo en la temporada siguiente (6).

El crecimiento fúngico continúa en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfiguran el aspecto de frutas y hortalizas. En los granos de cereales, los hongos persisten si el grano está suficientemente seco como para soportar la competencia de otras especies incorporadas posteriormente (6).

Otros hongos presentes en los productos almacenados son especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos xerófilos. Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de humedad del sustrato, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento y la actividad de insectos y ácaros que facilitan la diseminación. Requieren menor humedad relativa ambiente (70% - 90%) y contenido de agua en las semillas (15% - 20%), pero el rango de temperatura es más amplio (0°C - 45°C) y pueden crecer a menor concentración de oxígeno (6).

La microbiota sobre y dentro de los vegetales, afecta la calidad y el comportamiento durante el acopio y el procesamiento de varios productos hortícolas. La competencia entre las poblaciones microbianas mixtas que se encuentran naturalmente, suele constituir una desventaja para la producción de las micotoxinas. Cuando el contenido de agua aumenta, el crecimiento se vuelve más vigoroso, conduciendo a un calentamiento espontáneo del sustrato y al desarrollo de especies termotolerantes, tales como *Humicola*, *Rhizomucor* y *Absidia*, frecuentemente acompañadas por actinomicetos termófilos (6).

2.8 CONTAMINACION DE ALIMENTOS

Las micotoxinas son ingeridas con alimentos o forrajes contaminados directa o indirectamente. La contaminación directa con un moho y la consecuente producción de toxina puede ocurrir durante la producción, el transporte, el estacionamiento o el procesamiento del alimento o forraje. Mientras que la contaminación indirecta se debe a la presencia de un ingrediente previamente contaminado con un moho toxigénico que ya ha desaparecido y cuya micotoxina persiste (6).

El consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas es causa de cáncer hepático en animales intoxicados, debido a que se inhibe la actividad de las enzimas responsables de la replicación del ADN y, con esto, se reduce la síntesis de proteínas en las células, y finalmente todo aquel animal que las consume muere en pocos días. También se ha comprobado que algunas personas que normalmente consumen este tipo de alimentos como parte fundamental en su dieta (siempre que éstos se encuentren en malas condiciones de almacenamiento antes del procesado) excretan estos compuestos por la orina, y por esta razón se considera que pueden ser causa de cáncer hepático y de estómago (9).

La tabla 4 muestra varias de las micotoxinas importantes, producidas por especies de hongos en los granos.

HONGO	MICOTOXINA	CARACTERISTICAS PRINCIPALES
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxina	- Altamente cancerígeno.
<i>Aspergillus parasiticus</i>		- Produce toxicidad y cáncer del hígado. - Detectado en diferentes cultivos en el campo, cosecha, transporte, almacenamiento y en el hogar. - Productos contaminados con facilidad: maní y maíz.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxina	Causa Nefropatía crónica o intoxicación del riñón en cerdos y aves.
<i>Fusarium sp.</i>	Zearelenona Toxina T2 Vernotoxina	- Produce efectos estrogénicos en animales, vómitos y muerte.
<i>Penicillium sp</i>	Citrinina Tremorgenos Patulina	- Causa enfermedad en los riñones - Causa temblores

TABLA Nº 4: MICOTOXINAS IMPORTANTES Y HONGOS QUE LAS PRODUCEN

La presencia de micotoxinas en los productos alimenticios, depende de cepas específicas de hongos y ellas están sujetas a la influencia de factores ambientales como la humedad y la temperatura. Por lo tanto, la contaminación micotóxica de los productos alimenticios puede variar según las condiciones geográficas, climáticas, métodos de producción, tipos de almacenamiento y también según el tipo de alimento. Algunos productos alimenticios son sustratos más aptos que otros para el crecimiento de los hongos y producción de toxinas (9).

Los hongos que producen micotoxinas se encuentran en todas partes. Aunque no haya presencia visible de hongos, ni cambios de aspecto, olor o sabor en el producto, este puede estar contaminado (9).

No todos los hongos producen micotoxinas, ni todos los granos contaminados con hongos son tóxicos. El mejor método de saber que el grano está sano, es cosechándolo temprano, secándolo bien y así prevenir rápidamente el desarrollo de hongos durante el almacenamiento (9).

La invasión de *Aspergillus flavus* y producción de aflatoxinas ocurre frecuentemente en el campo, cuando el maíz es atacado por gusanos de la mazorca. Los años con fuerte incidencia de gusanos producen mayores problemas de *A. flavus* y sus micotoxinas. Los productores deben realizar una buena selección de mazorcas especialmente durante estos años (6).

Un problema adicional causado por las micotoxinas, es la reducción de la productividad en animales que han consumido grano contaminado, si la pérdida económica es considerable es imposible que permanezca ignorada (6).

2.9 CONTROL DEL HONGO ANTES Y DURANTE LA COSECHA

Es claro que la presencia de microorganismos causantes de micotoxinas en los granos y alimentos representa un peligro considerable. Dejarlos crecer libremente puede traducirse en la producción de micotoxinas y micoxotoxicosis con todos los efectos (11).

Las pérdidas económicas causadas por el rechazo de granos contaminados son considerables. Pero son más importantes las pérdidas no detectadas, debido a la reducción de la productividad en la explotación de animales (11).

El mejor método para disminuir la contaminación de granos con micotoxinas, es la adopción de medidas preventivas para el control de hongos (11).

2.9.1 CONTROL ANTES DE LA COSECHA

La prevención mediante el control antes de la cosecha es el primer paso para asegurar un producto final inocuo. Aunque se reconoce desde hace tiempo que existe una conexión entre la contaminación por micotoxinas y unas condiciones inadecuadas de almacenamiento, los estudios han revelado que algunas semillas se contaminan con micotoxinas en el campo. La invasión de *Aspergillus flavus* y producción de aflatoxinas ocurre frecuentemente en el campo, cuando el maíz es atacado por gusanos de la mazorca. Una vez infectado el cultivo en las condiciones reinantes en el campo, la proliferación de los hongos proseguirá durante las etapas posteriores a la cosecha y el almacenamiento. Por consiguiente, el control antes de la cosecha está orientado a afrontar factores críticos que potencian la producción de micotoxinas. Algunas de las principales estrategias utilizadas son las siguientes (12):

- a. Manejo adecuado de riego y el estado del suelo (Temperatura y una humedad relativa elevadas son esenciales para la germinación de las esporas y la proliferación fungosa) (12).
- b. Uso de variedades que se cosechen cuando no exista mucha lluvia o modificar la fecha de la siembra para que cuando se cultive no haya mucha humedad (12).
- c. Manejo adecuado de los rastrojos o residuos agrícolas, destrucción de malezas (medio apropiado para la supervivencia de esporas de hongos) y rotación de cultivos (prevención de la contaminación) (12).
- d. Control de la infestación por insectos de los granos y prevención de daños mecánicos de los productos (Ayuda a prevenir la proliferación de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y la posterior producción de

aflatoxinas). Cosecha pronta y evitar que el grano permanezca mucho tiempo en el campo (12).

2.9.2 CONTROL DURANTE LA COSECHA

Durante la cosecha es importante controlar, entre otras cosas, si el producto agrícola se ha desarrollado en el plazo previsto y si está limpio y seco. Este control es esencial para prevenir la formación de micotoxinas durante el almacenamiento. Algunos estudios han indicado que los cultivos que se dejan en el campo durante más tiempo presentan niveles más altos de contaminación por toxinas. También es esencial que el producto esté suficientemente seco para evitar la proliferación de hongos durante el almacenamiento (12).

2.9.3 CONTROL DURANTE EL ALMACENAMIENTO

- Limpiar cuidadosamente el producto de sustancias extrañas antes del secamiento y almacenamiento, ya que puede contaminar el fruto con esporas. Es importante no prolongar el tiempo de contacto con éstas (11).
- Secar el grano lo más pronto posible después de la cosecha (11).
- Almacenar con contenidos de humedad mínimos que impidan el desarrollo de hongos en el almacén (11).
- Almacenar los productos en condiciones adecuadas. Las estructuras de almacenamiento tienen que estar secas para no permitir la entrada del agua. Adicionalmente, deben estar limpias y en buen estado físico (11).
- Mantener el lugar del almacenamiento a temperaturas y humedades relativas desfavorables para el desarrollo de los hongos (11).
- Asegurar que los granos almacenados esten secos, frescos y libres de insectos (11).

El problema de la contaminación de los granos con microorganismos y micotoxinas es grande y complejo. Es importante que se introduzcan sistemas de vigilancia de contaminación y se tomen medidas preventivas para disminuir su incidencia (11).

El desconocimiento de estos problemas es amplio entre la población y es necesario dar énfasis a programas de educación para personas que trabajan en la producción y comercialización de productos agrícolas. Estas medidas seguramente tienen implicaciones favorables, y lo más importante es que mejoran la salud humana y animal (11).

En general, un buen sistema de prevención del ataque de hongos evitará casi por completo la presencia de micotoxinas (11).

2.10 CONTROL DESPUÉS DE LA COSECHA Y DESCONTAMINACIÓN

Aunque la prevención es la mejor estrategia de control, terminará produciéndose una contaminación por micotoxinas. Por consiguiente, los procedimientos de control después de la cosecha y de descontaminación representan un medio importante para evitar la exposición a las aflatoxinas de los consumidores. Se han propuesto varias estrategias de descontaminación para las diversas micotoxinas. Algunos métodos tradicionales de elaboración son útiles para separar físicamente las toxinas o para desactivarlas químicamente. Sin embargo, la eficacia de cada método de elaboración deberá evaluarse para el producto en cuestión y para la toxina presente en el sistema. Los siguientes son algunos criterios específicos para la evaluación y aceptación de determinados procedimientos de reducción de las micotoxinas o de descontaminación (12):

- a. Inactivar, destruir o eliminar las toxinas (12).
- b. No producir ni dejar residuos tóxicos en los alimentos/piensos (12).

- c. Conservar el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto para alimento o pienso (12).
- d. No alterar de modo apreciable las propiedades tecnológicas del producto (12).
- e. Destruir si es posible, las esporas de los hongos (12).

A continuación, se indican algunas estrategias habituales para después de la cosecha (12):

2.10.1 MÉTODOS FÍSICOS DE ELIMINACIÓN DE MICOTOXINAS

Una vez que el producto contaminado llega a las instalaciones de elaboración, las primeras alternativas de control son su limpieza y segregación. Estos procedimientos no suelen ser invasivos y, con la excepción de la molienda, no alteran apreciablemente el producto. En algunos casos, son los métodos mejores para reducir la presencia de micotoxinas en los productos finales. Por ejemplo, cuando se procesa el maní, es posible eliminar una cantidad considerable de aflatoxinas mediante la clasificación electrónica y la selección manual (12).

2.10.2 MÉTODOS FÍSICOS DE DESCONTAMINACIÓN

Cuando forma parte de procesos industriales, la inactivación térmica permite reducir en cierto grado determinadas micotoxinas; sin embargo, algunas de las micotoxinas son químicamente estables y no se destruyen por completo a las temperaturas aplicadas durante la elaboración. Así pues, la inactivación térmica de una determinada toxina deberá evaluarse en función de las temperaturas de un proceso concreto. El tueste se considera un buen método para productos como el maní y el café (12).

La irradiación ha sido considerada también como una opción para el control de micotoxinas. No se ha encontrado un método plenamente satisfactorio para

destruir las micotoxinas ya formadas, pero la irradiación puede ser tomada en consideración como método para controlar micotoxinas que producen mohos en ciertos productos (12).

Un nuevo sistema para la prevención de la intoxicación con aflatoxinas es la inclusión en la alimentación de arcillas de reacción selectiva a las aflatoxinas que aglutinan firmemente esas sustancias venenosas en el aparato digestivo de los animales, reduciendo de modo apreciable su biodisponibilidad y la toxicidad asociada. Estos métodos tienen por objeto poner fin a los efectos perjudiciales de las micotoxinas mediante la retención de éstas en diversos materiales sorbentes en el aparato digestivo, modificando de ese modo su absorción y su afluencia a la sangre y a los órganos a que están destinadas. En estudios innovadores se observó que una arcilla filosilicatada que se utilizaba habitualmente para reducir la aglutinación en piensos, llamada NovaSil o arcilla de silicoaluminato hidratado de sodio y calcio (SAHSC):

- a) Adsorbía la aflatoxina B₁ de alta afinidad y gran capacidad en soluciones acuosas (inclusive leche).
- b) Reducía notablemente la biodisponibilidad de aflatoxinas radiomarcadas en aves de corral.
- c) Disminuía en gran medida los efectos de las aflatoxinas en animales jóvenes (ratas, pollos, pavos, corderos y cerdos).
- d) Disminuía la concentración de aflatoxina M₁ en vacas y cabras lactantes. Los datos disponibles indican que las aflatoxinas pueden reaccionar a las partículas de SAHSC en múltiples sitios, entre ellos la región de las capas intermedias, los bordes y las superficies basales (12).

Los adsorbentes de micotoxinas basados en las arcillas son efectivos contra las aflatoxinas. Sin embargo, no ligan suficientes cantidades de otras micotoxinas, como la zearalenona o las fumonisinas (12)

También se ha estudiado la capacidad del carbono activado granulado para aglutinar aflatoxinas, tanto “in vivo” como in vitro”. Los resultados de estos estudios variaron considerablemente en función del tipo de carbono activado utilizado. El carbón vegetal activado ha demostrado también ser eficaz para reducir la patulina en zumos de fruta contaminados por causas naturales (12).

En conclusión, las arcillas y los minerales zeolíticos comprenden una amplia familia de silicoaluminosilicatos funcionalmente diversos. Aunque se ha comprobado que estos agentes tienen efectos prometedores sobre la aglutinación de micotoxinas, puede que haya importantes riesgos asociados con la inclusión de arcillas no selectivas (u otros adsorbentes) en la alimentación. Será necesario someter a ensayos rigurosos los adsorbentes de las aflatoxinas, prestando especial atención a su eficacia e inocuidad en animales sensibles a las aflatoxinas y a su capacidad potencial de interacción con los nutrientes. Además, es importante señalar que en los Estados Unidos el único uso aprobado para esos materiales adsorbentes es como antiaglutinantes y no está autorizado su uso para la eliminación de aflatoxinas (12).

2.10.3 DESCONTAMINACION BIOLÓGICA

Se han estudiado métodos biológicos como opciones para la descontaminación de micotoxinas. En la industria de los fermentos, se observó que las aflatoxinas no se degradaban durante la fermentación, pero la toxina estaba ausente de la fracción alcohólica después de la destilación. La aflatoxina suele concentrarse en los granos residuales. Por tanto, cuando se utilizan productos contaminados para la fermentación, es importante determinar el uso final de los subproductos contaminados. Cabe señalar que los métodos biológicos

que muestran propiedades efectivas de descontaminación, son por lo general el resultado de compuestos específicos producidos por determinados microorganismos. Cuando se observa que un compuesto concreto es un buen agente descontaminante, suele ser más eficaz y económico añadir directamente el agente activo. Los estudios indican que ciertos hongos, en particular *Aspergillus parasiticus*, degradan las aflatoxinas, posiblemente mediante peroxidasas fungosas (12).

2.10.4 INACTIVACION QUIMICA

En numerosos estudios se han evaluado sustancias químicas para determinar su papel en la inactivación y reducción de riesgos de determinadas micotoxinas. Sin embargo, casi todos ellos se han centrado en las aflatoxinas relacionadas con los piensos. La amoniación es el método químico al que las investigaciones han prestado más atención. Los resultados de una amplia evaluación de ese procedimiento demuestran la eficacia e inocuidad de la amoniación como solución práctica para descontaminar piensos contaminados por aflatoxinas. Este proceso, eficaz en más del 99 por ciento de las veces, se ha utilizado con éxito de manera selectiva en los Estados Unidos, Francia, Senegal, Sudán, Brasil, México y Sudáfrica, en algunos casos durante casi veinte años. Aunque lo está examinando, la FDA no ha dado todavía su aprobación final al procedimiento de amoniación. Los dos procedimientos de amoniación utilizados principalmente para la contaminación por aflatoxinas en el maíz, el maní, las semillas de algodón y las harinas, son i) el tratamiento a alta presión/alta temperatura, y ii) el tratamiento a presión atmosférica/temperatura ambiente. El primero de ellos se aplica en las fábricas de piensos, mientras que el segundo se utiliza principalmente en las explotaciones agrícolas. El tratamiento a presión atmosférica/temperatura ambiente se limita a las semillas/nueces enteras y a las aflatoxinas. Sin embargo, para el control de las aflatoxinas, las aplicaciones prácticas, unidas a los resultados de las investigaciones, respaldan firmemente la utilización del tratamiento con amoníaco. Se ha informado sobre otros

procedimientos químicos en los que se utilizan, por ejemplo, monometilamina: cal o urea/ureasa (12).

Otros métodos químicos que han dado resultados prometedores para el control de las aflatoxinas son la utilización de cloruro sódico durante el tratamiento térmico, el bisulfito sódico a diversas temperaturas y la ozonización (12).

2.11 CARACTERISTICAS DE LA CASTAÑA (*Bertholletia excelsa*)

La castaña es la semilla de un árbol (*Bertholletia excelsa*) del bosque tropical húmedo de la cuenca amazónica. Estos árboles de gran tamaño necesitan luz y por lo tanto emergen hasta 30 m sobre el dosel del bosque; algunos de ellos pueden alcanzar de 100 a 500 años de edad y llegan a tener de 2 a 3 m de diámetro en la base (Figura 7). Los árboles tienden a crecer en claros del bosque y a los lados de los caminos. La castaña se recolecta en el bosque, donde la densidad promedio es de alrededor de un árbol por hectárea, pero con excepciones en las que se encuentran grupos de hasta 13 árboles por hectárea (figura 8). Los recolectores generan la mayoría de sus ingresos mediante esta actividad. La castaña tarda aproximadamente 25 años para dar frutos y no puede ser cultivada en plantaciones ya que necesita de otras especies del bosque para la polinización y producción de frutos. Los árboles miden de 40 a 50 m de altura, emergen del dosel y sus frutos caen durante la época de lluvias, que se extiende de diciembre a marzo. Los frutos son esféricos y pesados; cada uno contiene entre 15 y 35 semillas (fig. 9). En las áreas donde las condiciones del bosque han sido alteradas, la producción de castaña decae rápidamente debido a la dependencia de los árboles con la biota asociada para la polinización y formación de frutos. La castaña constituye menos del 1% del comercio mundial de nueces comestibles, y se la usa mayormente como una nuez de relleno en las mezclas de nueces que se venden en Europa y Norteamérica (14).

La castaña tiene varias características interesantes desde el punto de vista nutritivo. Primero, el aceite es de alta calidad y apto para el uso comestible. Segundo, la semilla contiene casi un 17% de proteínas, es rica en aminoácidos esenciales y especialmente rica en metionina (14).

También, la castaña es uno de los pocos productos comestibles con un alto contenido del micronutriente selenio. Por lo tanto, a esta nuez se la puede considerar como una parte importante de la dieta humana (14).



FIGURA N° 7: PLANTA JUVENIL DE CASTAÑA (22)



FIGURA N° 8: ARBOL DE CASTAÑA (22)

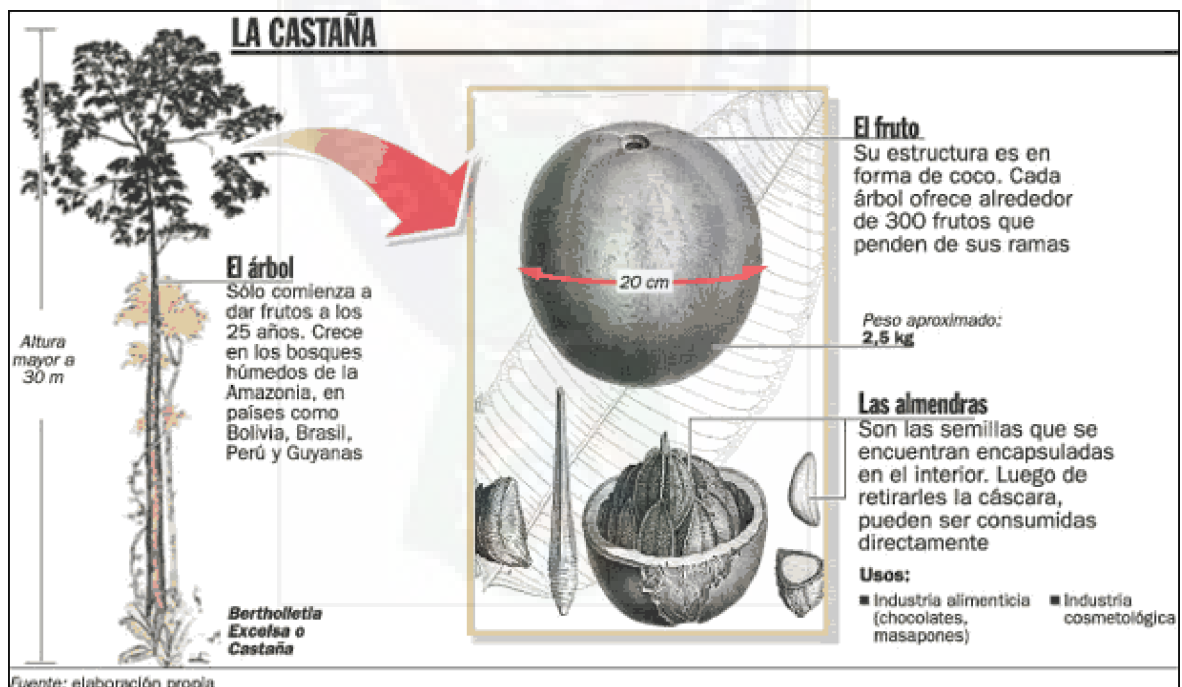


FIGURA N° 9: CARACTERÍSTICAS DEL ÁRBOL DE LA CASTAÑA (20).

2.11.1 CONTEXTO AMBIENTAL

Un 15% del norte de Bolivia está cubierto por bosques tropicales, La actividad de la explotación y beneficiado de la castaña representa más del 75% del movimiento económico de la zona norte de Bolivia, que comprende la totalidad del Departamento de Pando, la provincia Vaca Diez del Beni y la provincia Iturralde del Departamento de La Paz (Fig. 10). Para su preservación, el gobierno boliviano, algunas iniciativas locales y la comunidad internacional están trabajando intensamente, de ahí que sólo un 4% de dicha área se ha degradado. Uno de los principales factores que contribuyen a este alto estado de conservación es el aprovechamiento tradicional de los bosques, con una intensidad que mantiene la biodiversidad y preserva el área como un importante sumidero de dióxido de carbono, contribuyendo así a la disminución del calentamiento global. Las principales actividades económicas que han permitido su conservación han sido la recolección de castaña y, hasta principios de siglo, la de caucho. Actualmente la industria castañera es responsable del 70% de la actividad económica de la región y ha sido el motivo principal para la preservación del ecosistema. Los intentos de desmontar el bosque y dejar árboles de castaña entre pastizales, han demostrado que la castaña depende de otras especies del bosque para mantener las poblaciones de sus polinizadores. Por lo tanto, este árbol sumado a la economía que sustenta, son factores clave para la conservación de los bosques. Sin la industria castañera, existen pocos incentivos para que los habitantes de la región preserven el bosque, y sería difícil que el gobierno boliviano evite la deforestación una vez que la gente busque otras fuentes de ingresos (14. 21).

El grado de deforestación en las zonas aledañas del Perú y Brasil, en las que no existe una industria castañera considerable, constituye un lúgubre pronóstico de lo que sería la región si esta industria fracasa. La economía de la castaña, y por consiguiente el medio ambiente, se verán extremadamente amenazados como resultado de las estrictas regulaciones que se aplicarán en los principales mercados de este producto (14).



FIGURA Nº 10: ZONA CASTAÑERA DE MAYOR PRODUCCIÓN (19).

2.11.2 REGULACIONES

En 1999, la Unión Europea revisó las regulaciones con respecto al contenido de una micotoxina que se presenta en la mayoría de los productos alimenticios. Las nuevas regulaciones entraron en vigencia a partir de enero de 1999 y prohíben la importación de alimentos que puedan estar contaminados con aflatoxinas, si el nivel de éstas excede las 4 ppb (partes por billón). En las regulaciones se estipula un protocolo de muestreo uniforme para todas las mercancías, el cual no toma en cuenta productos o embalajes especiales, tales como los paquetes sellados al vacío que se usan en el comercio internacional de castaña. El plan europeo de muestreo actualmente no es apto para la castaña y preocupa a los productores bolivianos debido a las consideraciones económicas, además de la posibilidad de pérdida del producto en los paquetes sellados al vacío que sean abiertos para el muestreo. Ciertamente, todo el aspecto de certificación y muestreo en las nuevas regulaciones de la UE será modificado en

el futuro, a medida que éstas sean implementadas. Las regulaciones de la UE incluyen negociaciones en caso de que el embalaje u otros factores sugieran que éstas son necesarias (14).

Actualmente, en caso de que un embarque no cumpla con los requerimientos citados, no existe una opción para que la mercancía sea procesada de modo que se reduzcan los niveles hasta un grado aceptable. Las regulaciones de la UE requieren que los embarques sean devueltos a su lugar de origen o destruidos. Por consiguiente, el no lograr los niveles requeridos constituye una preocupación importante (14).

Se ha intentado suavizar estas regulaciones o que se las implemente de manera gradual, para permitir que la industria desarrolle tecnologías apropiadas a fin de cumplir las normas; pero se debe suponer que dichos intentos no tendrán éxito y que la industria deberá cumplir estos requerimientos en el futuro inmediato (14).

2.11.3 LAS AFLATOXINAS EN LA CASTAÑA

La toxina se forma cuando estos ubicuos hongos invaden la castaña. Lamentablemente, esta nuez constituye un substrato en el cual los hongos producen altos niveles de aflatoxinas, y el ambiente en el que se procesa es propicio para la contaminación (14).

La contaminación por aflatoxinas, a menudo se caracteriza porque las semillas pueden estar exentas de hongos y toxinas, o significativamente contaminadas. Es común que un pequeño porcentaje de semillas de una muestra contenga una alta proporción de la toxina; esto significa que la eliminación de las semillas contaminadas tiene un impacto considerable en la concentración global de la toxina en la muestra. Este hecho es la base de la mayoría de los métodos de remoción física para el manejo de la contaminación en los productos susceptibles. Sin embargo, también crea un problema considerable para la detección de

aflatoxinas, pues el que una sola semilla contaminada esté incluida en una muestra para análisis, tiene un gran impacto sobre el contenido de aflatoxinas a medirse (14).

Este problema se hace más agudo cuando el producto consiste en semillas grandes, ya que la tendencia natural es tomar muestras sobre la base de semillas individuales (14).

2.11.4 RIESGOS PARA LA SALUD CAUSADOS POR LAS AFLATOXINAS EN LA DIETA

Por más de treinta años se ha deliberado sobre los riesgos para la salud a causa de la presencia de aflatoxinas en la dieta humana y se ha llegado a la conclusión de que existen riesgos causados por la exposición a esta toxina. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud ha determinado que existe suficiente evidencia para clasificar la aflatoxina B₁ y aflatoxina G₁ como probables carcinogénicos para humanos. No obstante, debido a que estos compuestos se producen naturalmente, no hay forma de evitarlos (14).

No existe un “nivel sin efecto” que sirva como base para regulaciones gubernamentales al respecto, de modo que todos los países encararan de diferente manera el problema de regular el contenido de aflatoxinas en los alimentos para la venta (14).

Por lo tanto, la UE tiene sus normas, Japón otras, los Estados Unidos otras, Canadá otras, y así sucesivamente (14).

La Comisión del Codex Alimentarius de la FAO/OMS cuenta con un comité experto en aditivos de los alimentos, que también tiene a su cargo la contaminación por aflatoxinas. Este comité evaluó el tema de la influencia de las aflatoxinas en una reunión realizada en junio de 1997. En ésta, se llegó a la

conclusión de que las aflatoxinas deben tratarse como contaminantes carcinogénicos y que su consumo debe ser lo más bajo posible (14).

El Gobierno de Bolivia expresó su preocupación a la Organización Mundial de Comercio, con respecto a las regulaciones de la UE y sus efectos sobre el comercio (14).

Las conclusiones sobre los riesgos de cáncer que se presentan en el informe del Codex indican que la disminución del contenido permisible de aflatoxinas en alimentos de 20 a 10 ppb, no tendría un efecto mensurable en cuanto a la incidencia de riesgo de cáncer del hígado en Europa. Esta conclusión se basó en el bajo consumo de aflatoxinas de la dieta promedio europea. Sin embargo, el riesgo de cáncer por influencia de las aflatoxinas, combinado con la hepatitis B en Africa y Asia podría ser significativo en poblaciones con alto consumo de estas toxinas; en vista del consumo limitado de castaña en la dieta de los países desarrollados y la índole única de esta nuez, se deberían crear regulaciones especiales para aflatoxinas, que se apliquen específicamente para este producto en dichos países. Es poco probable que, aún con concentraciones de 50 ppb, el consumo de castaña aumente el riesgo de cáncer, además de que los efectos benéficos del selenio que se encuentran en ésta contrarrestarían cualquier efecto adverso (14).

2.11.5 ASPECTO SOCIO-ECONÓMICOS

Los beneficios sociales del comercio de castaña son especialmente significativos en la región norte de Bolivia, pues alrededor del 70% de las fuentes de empleo está relacionado con esta industria, además de existir pocas alternativas laborales para la población. El colapso de la industria castañera tendría un enorme costo social. La recolección de castaña es la única fuente de ingresos de la mayoría de los habitantes del bosque, y el procesamiento de este producto en las beneficiadoras proporciona empleo a gente de bajos recursos

económicos de las zonas urbanas. No existen otras fuentes sostenibles de ingresos disponibles a la población en toda la región (14).

La supremacía brasilera en cuanto a la exportación de castaña fue hasta el año 1995, cuando Brasil exportó 9 mil toneladas contra 7.5 mil toneladas de Bolivia. A partir del año 1996 Bolivia se convierte en el primer productor mundial de castaña, superando a Brasil (21).

El año 1999 Bolivia exportó 10,880 tn contra 2,500 tn del Brasil, representando para nuestro país el 73% del mercado mundial de castaña (21).

Prácticamente el 99 % de la producción nacional se destina al mercado de exportación. En términos monetarios, la producción de castaña pasó de 15.6 millones de dólares en 1990 a 31.3 millones en 2000 (21).

2.11.6 INFRAESTRUCTURA

La infraestructura disponible en Bolivia para el apoyo a la industria castañera es mínima. En las zonas de recolección, ubicadas en el bosque, existen pocos caminos y la mayoría de la cosecha la transporta el recolector en sacos por varios kilómetros, hasta llegar a cobertizos donde se completa la primera etapa del proceso de recolección. No se utiliza el secado mecánico y en los cobertizos y las bodegas las nueces se voltean manualmente para acelerar el secado. El transporte de la castaña de este primer almacenamiento hasta la siguiente etapa generalmente se hace efectivo mediante tractores u otros vehículos motorizados, sobre caminos que son simplemente sendas abiertas a través del bosque. Durante esta etapa del proceso de acopio y transporte, se entrega el producto en bodegas ubicadas a lo largo de ríos, que se constituyen en único modo de transporte en la región. De esta etapa en adelante, la castaña se transporta en barcazas a los pueblos, donde se la procesa para su exportación a los mercados de Europa y Norteamérica (14).

Los pueblos y ciudades donde se encuentran los centros de procesamiento son pequeños y dependen del comercio de castaña para su existencia económica. Los pueblos proporcionan las instalaciones para el comercio y en éstas se encuentra una serie de plantas donde se procesa, clasifica y empaqueta las nueces. Las beneficiadoras son generalmente, pequeñas y funcionan sin maquinaria moderna para el procesamiento; dependen, en su mayoría, de la mano de obra local para gran parte de su funcionamiento. Las instalaciones varían desde plantas en las que se usa maquinaria para pelar las nueces y clasificarlas por tamaño, hasta beneficiadoras donde todos los procesos son manuales. En algunas plantas se realizan inspecciones visuales únicamente para la clasificación por calidad, y en otras la clasificación por tamaño y calidad está a cargo de la misma persona. Entre los recursos tecnológicos comúnmente utilizados en las beneficiadoras se incluyen empacadoras al vacío, hornos de secado y autoclaves para separar las semillas de la cáscara (14).

2.11.7 PRODUCCION

El árbol de la castaña produce desde el mes de noviembre recién que es cuando se encuentran los primeros frutos, pero es recomendable iniciar la zafra en la segunda quincena de diciembre. Hasta este momento, ya han caído alrededor del 80% de los frutos, lo que permite recolectar la mayor parte de la producción (21).

La zafra se prolonga hasta el mes de marzo, y se expande hasta las zonas más alejadas; en algunos casos se vuelve a recorrer los lugares por donde se cosecho en diciembre (21).

Este período de cosecha o zafra está marcado fuertemente por la época de lluvias, aspecto que dificulta el trabajo de recolección notablemente, debido a que familias enteras se trasladan al bosque y tienen que enfrentar un sin número de dificultades y peligros (21).

A pesar de las condiciones adversas, más de 15,000 familias se internan al bosque y no vuelven sino hasta febrero o marzo. Desde marzo hasta diciembre se procede al beneficiado; la mano de obra que participó en la recolección se traslada a las plantas beneficiadoras, donde se requiere más de cinco mil puestos de trabajo (21).

El proceso de recolección consiste en el recojo y recolección de los cocos que se encuentran bajo los árboles; los cocos se desprenden de los árboles por maduración natural (21).

Posteriormente, se procede a cortar la parte superior de cada coco por donde se extraen las semillas, el corte se hace a mano con ayuda de un machete (21).

Una vez terminado este proceso, se reúnen las castañas con cáscaras y se las coloca en bolsas para ser transportadas a los payoles que son precarios y rústicos galpones que sirven para protegerlas de la lluvia. Algunas explotaciones no cuentan con payoles, por lo que se deja las semillas a la intemperie, bajo la lluvia que ocasiona serios problemas de deterioro y contaminación del producto (21).

La castaña se la transporta por diversos medios hasta las instalaciones de almacenamiento de las beneficiadoras. Las condiciones climáticas son el principal obstáculo para hacer una buena recolección de la castaña, que debe ser trasladada lo antes posible a depósitos y silos con condiciones de almacenamiento controladas. Las mayores pérdidas de la semilla se producen en este proceso, que se debe mejorar en cada zafra para obtener castaña de excelente calidad (21).



FIGURA Nº 11: SEMILLAS DE CASTAÑA (21).

2.11.8 MERCADEO

El mercado de la castaña se encuentra en descenso debido a una serie de factores. La industria requiere la investigación necesaria para brindar datos promocionales y promoción para cambiar la imagen del producto. La castaña tiene varios puntos a favor para su comercialización, incluyendo su valor “verde” para la preservación de la biodiversidad y el medio ambiente (específicamente el bosque amazónico), la reducción del calentamiento global, además de los posibles beneficios para la salud. Estas ventajas deberán ser explotadas plenamente (14).

2.11.9 CERTIFICACION DE CALIDAD

El Gobierno de Bolivia ha estado apoyando la certificación de calidad de la castaña mediante el análisis de partidas destinadas a la exportación. El motivo principal de estas pruebas ha sido la calidad por tamaño, habiéndose usado el mismo muestreo para los análisis de aflatoxinas. Este método ha demostrado no ser fiable para determinar el contenido de aflatoxinas y se han determinado diferencias significativas entre los resultados de los análisis realizados en Bolivia y los de los laboratorios contratados por los importadores de castaña. Dichas diferencias eran de esperarse en vista del sistema utilizado para el muestreo,

combinado con la falta de programas de garantía de calidad en las plantas procesadoras. Los laboratorios que actualmente prestan servicios no están acreditados por la UE o los EE.UU. para el análisis de aflatoxinas, y sus resultados no son aceptados por las entidades reguladoras europeas y norteamericanas (14).

2.11.10 ALMACENAMIENTO

La industria castañera debe estar consciente de que los hongos que producen aflatoxinas se desarrollan cuando el producto se almacena en condiciones inadecuadas. Se han observado en las beneficiadoras nueces que estuvieron almacenadas en sacos y que se encontraban cubiertas de moho, además de que muchos de los sacos contenían castaña que ya no servía. Esto representa pérdida para la industria y podría ser un factor importante en la rentabilidad de la operación. El objetivo deberá ser secar el producto lo mejor y antes posible y mantenerlo así (14).

Se deberán eliminar los factores que obstaculizan el secado del producto. Un punto importante que se debe considerar, es el reemplazo de los sacos de polipropileno por el almacenamiento a largo plazo, con el fin de mantener las condiciones necesarias de sequedad (14).

Los productores deberán experimentar con otro tipo de recipientes y formas de almacenamiento y compararlas con el almacenaje en bolsas de propileno (14).

Sobre la base de la experiencia previa en embalaje se podrían considerar otros métodos de almacenamiento que sean efectivos para preservar la calidad (14).

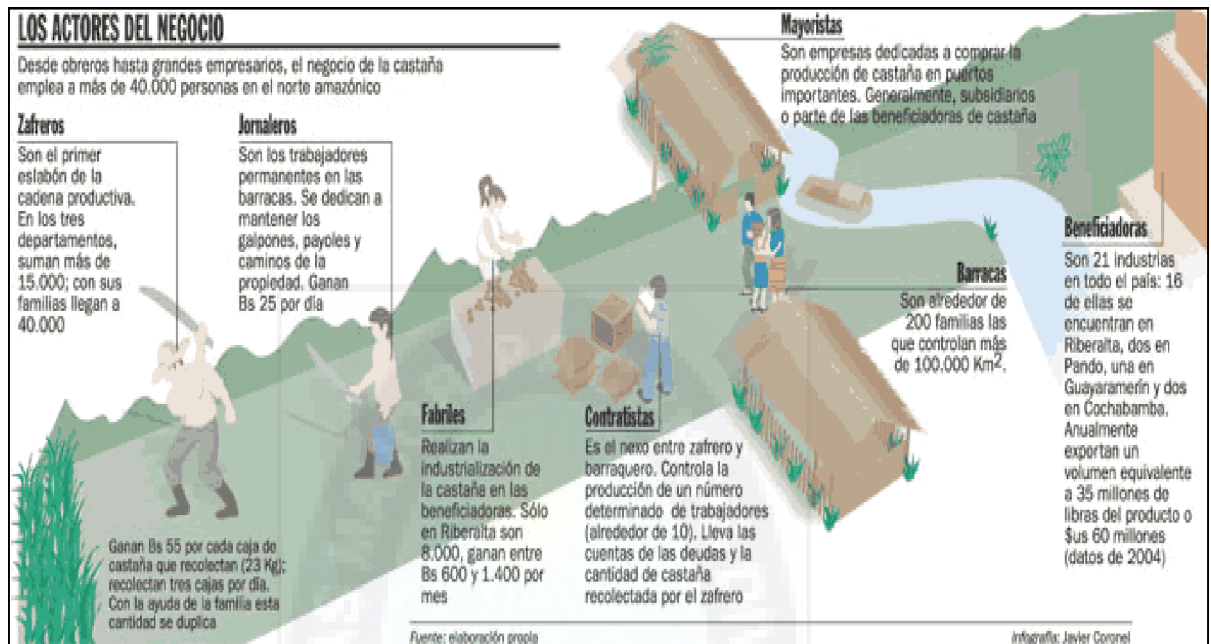


FIGURA Nº 12: CADENA PRODUCTIVA DE LA CASTAÑA. (22)

2.12 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuyo principio se basa en la amplificación del ADN por actividad de una polimerasa, se caracteriza por su especificidad del 100% y elevada sensibilidad debido a la capacidad que tiene de amplificar el ADN a partir de una molécula en millones de copias idénticas de ADN. Actualmente es una de las técnicas moleculares más utilizadas en estudios de tipo diagnóstico y epidemiológico. (16)

En la corta historia de la biología molecular, el surgimiento de una nueva técnica siempre ha transformado la manera en que pensamos acerca del aprovechamiento de los problemas biológicos fundamentales y aplicados. (17)

En los pocos años desde su introducción, la PCR ha llegado a ser una técnica de investigación ampliamente distribuida. Esta popularidad se debe primeramente a su aparente simplicidad y elevada probabilidad de éxito. (17)

En la evolución de la PCR, dos mejoras han simplificado enormemente el procedimiento:

- Automatización de la temperatura de los ciclos. (17)
- Uso de una termoestable DNA polimerasa. (17)

El método original usando el fragmento de Klenow, DNA polimerasa de *Escherichia coli* era muy tedioso a causa de la labilidad de la enzima. (17)

Debido a que el fragmento de Klenow se desnaturalizaba irreversiblemente cada vez que la temperatura de la muestra se incrementaba (94 °C -95 °C), la enzima tenía que ser repuesta cada ciclo después de que la temperatura de la muestra era restaurada a 37 °C de manera de extender los primers alineados. (17).

El uso de la Taq polimerasa no sólo simplificó el procedimiento de la PCR, si no que incrementó significativamente la especificidad y el rendimiento de la reacción. (17)

Debido a que la Taq polimerasa puede soportar repetidas exposiciones a elevadas temperaturas necesarias para la separación de las hebras, el tedio y los frecuentes malos resultados y el tedio de tener que añadir DNA polimerasa de *E. coli* después de cada ciclo se ha minimizado. (17)

La cepa de *Thermus aquaticus* YT1, una bacteria termofílica, fue aislada de una vertiente caliente en el Parque Nacional Yellowstone y fue descrita por primera vez hace 20 años. (17)

Uno de los aspectos más poderosos de la PCR es la relativa facilidad con que puede obtenerse la información genética. (15)

Por ejemplo, el mismo procedimiento que permite la detección de un organismo patógeno en una muestra, puede también proveer información acerca del genoma del patógeno que permite su clasificación al nivel de género, especie o colonia. (15)

2.12.1 BASES MOLECULARES DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMARASA (PCR)

El principio fundamental de la PCR es la amplificación de un fragmento específico de ADN a través de sucesivos ciclos de multiplicación exponencial hasta que suficiente producto se haya acumulado para ser visualizado.

De esta manera, una sola molécula puede generar más de un billón de copias de sí misma después de la replicación exponencial. (15)

Cada ciclo de amplificación típicamente consiste de tres temperaturas a las cuales los ingredientes de la mezcla de reacción de la PCR sobrellevan diferentes procesos físicos y bioquímicos (denaturación, alineado y extensión) del DNA molde a ser replicado. (15)

El primer paso es una incubación a 94 °C para permitir la denaturación de las dos hebras del ADN molde, esto es seguido por un paso de alineado para permitir la hibridización de los primers con sus secuencias complementarias en el DNA blanco. (15) (Fig. 13)

Finalmente el ciclo se completa durante un paso de extendido a 72°C cuando la polimerasa se extiende desde el primer en dirección 5' a 3' replicando la hebra molde (Fig 14). En el primer ciclo, los primers se alinean a sus secuencias complementarias en hebras opuestas de la doble hélice desnaturalizada y la polimerasa replica el molde. (15).

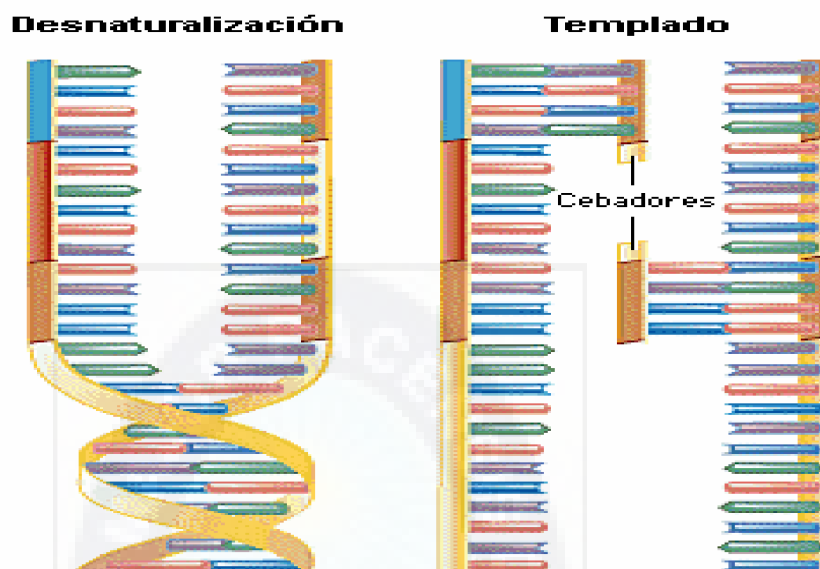


FIGURA Nº 13.- DESNATURALIZACIÓN Y TEMPLADO DE UN FRAGMENTO DE DNA POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA; PRIMEROS DOS CICLOS DE LA TÉCNICA (18).

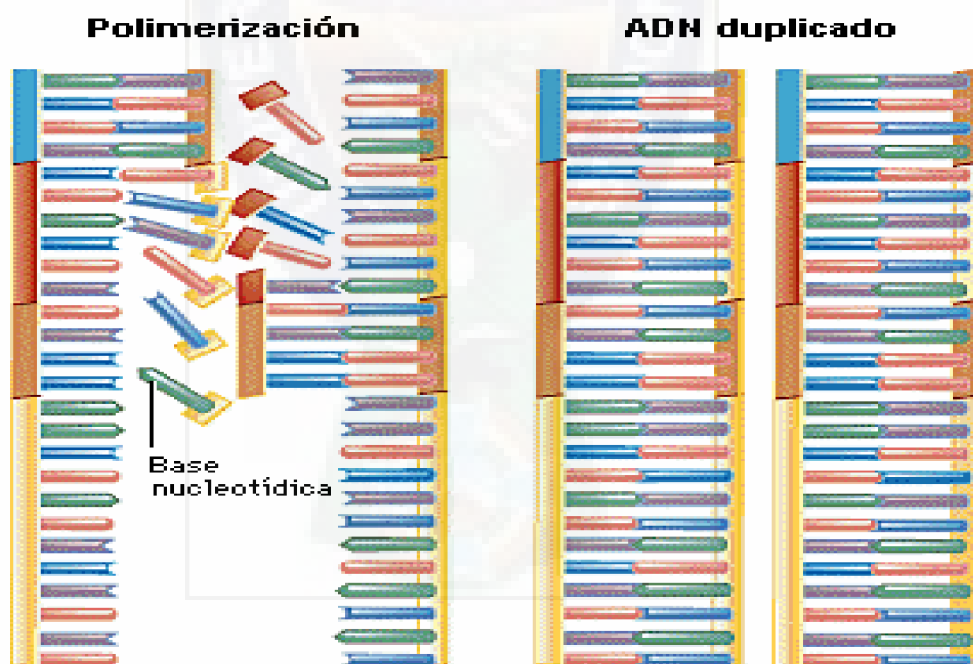


FIGURA Nº 14.- POLIMERIZACIÓN DEL SEGMENTO DE DNA POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, ÚLTIMO CICLO DE LA TÉCNICA. OBSÉRVESE LA FORMACIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE DNA IDÉNTICOS (18).

En el segundo ciclo cada una de las nuevas hebras sintetizadas de igual manera que las hebras originales, sirven como molde para la siguiente ronda de síntesis. (15).

El concepto clave es que una secuencia específica de ADN de una longitud definida se replica exponencialmente, de manera que puede ser fácilmente detectable cuando es sembrada en un gel de agarosa y teñida con bromuro de etidio.(15)

2.1.2.2 TÉCNICA DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA *Aspergillus flavus*

La capacidad de distinguir entre las varias especies de *Aspergillus* puede tener un valor para el diagnóstico. Un método para identificar especies de *Aspergillus* y diferenciarlas de otros patógenos auténticos y oportunistas, es utilizando los Primers para genes de rRNA 18s y 28s. La región continua de los espacios internos transcritos (ITS), ITS₁ – 5.8s – ITS₂ de cultivos de referencia y aislamiento clínico de los *Aspergillus* se registraron por tamaño de 565 a 613 pb. Comparando las secuencias del gen Bank y los cultivos de referencia, se demostró que ambas regiones ITS 1 e ITS 2 necesitaron para su identificación de diferentes especies de *Aspergillus*. Las variaciones intraespecies entre las clínicamente aisladas y los cultivos de referencia son mínimas. Entre otros 16 patógenos se demostró menos similitud, 89% con secuencias ITS₁ e ITS₂ de *Aspergillus* (24).

La identificación de *Aspergillus* basadas en los métodos morfológicos requiere de un adecuado desarrollo para evaluar las características de las colonias y características microscópicas. Un cultivo requiere de un tiempo de cinco días o más para la identificación de formas anamórficas de *Aspergillus*. Se utilizan varios estudios moleculares para la detección de *Aspergillus* del medio ambiente y de muestras clínicas. El blanco para el nivel de detección del género

Aspergillus incluye el gen rRNA 18s, DNA mitocondrial, la región espacial intergenica y los ITS. Los ITS están localizados entre los genes rRNA 18s y 28s y existen aproximadamente 100 copias por genoma. El gen rRNA para 5.8s separa las dos regiones ITS (24).

Las regiones de los Primers ITS son (24):

Primer 1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

Primer 2: 5' TCCTCCGCTTATTGATATG 3'



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

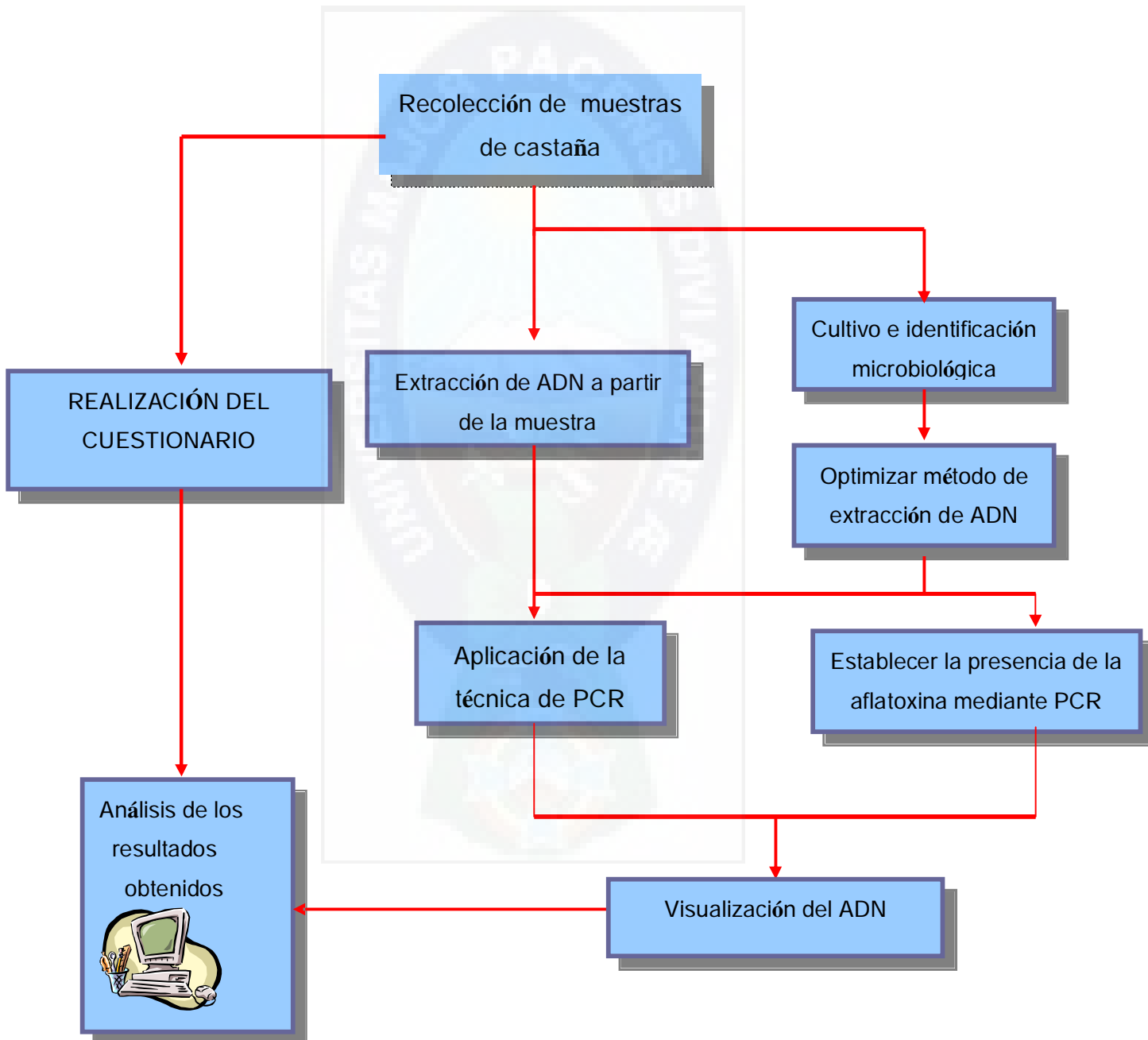
Determinar la presencia del gen codificador de la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* en la castaña (*Bertholletia excelsa*), mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de *Aspergillus flavus* en muestras de castaña, mediante el método microbiológico por observación macroscópica y microscópica.
2. Validar la técnica de extracción de ácidos nucleicos a partir de cultivos y muestras para la identificación de *Aspergillus flavus*.
3. Validar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la identificación de *Aspergillus flavus*.
4. Evaluar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico molecular a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

4. DISEÑO METODOLOGICO

4.1 FLUJOGRAMA



4.2 CEPAS

Las cepas de referencia de *Aspergillus flavus* fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) y por el laboratorio de Microbiología de Alimentos, estas; cepas fueron sembradas en Agar Patata Dextrosa (APD), se las conservó a 25°C y se las selló a fin de evitar contaminación con otros hongos para su posterior empleo en las técnicas moleculares.

4.3 MUESTRAS

La recolección de muestras se realizó en los diferentes mercados de la ciudad de La Paz, principalmente: Mercado Rodríguez, Mercado Villa Fátima, Pasaje Tumusla; se recolectaron en total 40 muestras de castaña sin corteza con presumible riesgo de contaminación por *Aspergillus flavus*; las muestras provenían de las zonas productoras en las regiones tropicales de Bolivia (departamentos de La Paz, Beni y Pando). De cada muestra se recolectaron aproximadamente 250 gramos en bolsas de polietileno estériles para así evitar contaminaciones posteriores, luego se las conservó en un lugar limpio libre de contaminación hasta su procesamiento.

Cod.	Fecha	Lugar	Procedencia
01	02/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
02	02/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
03	12/01/05	Mercado Rodríguez	Beni (Riberalta)
04	12/01/05	Mercado Rodríguez	Pando
05	15/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Riberalta)
06	20/01/05	Mercado Rodríguez	Pando
07	20/01/05	Mercado Villa Fátima	Pando

08	20/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni(Prov. Vaca Diez)
09	30/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
10	30/01/05	Mercado Rodríguez	La Paz (prov. Iturralde)
11	05/02/05	Mercado Villa Fátima	Pando
12	05/02/05	Mercado Villa Fátima	La Paz (Prov. Iturralde)
13	05/02/05	Mercado Rodríguez	La Paz (Prov. Iturralde)
14	05/02/05	Mercado Rodríguez	Pando
15	18/02/05	Pasaje Tumusla	Beni (Prov. Vaca Diez)
16	18/02/05	Pasaje Tumusla	La Paz (Prov. Iturralde)
17	18/02/05	Pasaje Tumusla	Pando
18	03/03/05	Mercado Lanza	Beni (Prov. Vaca Diez)
19	03/03/05	Mercado Lanza	La Paz (Prov. Iturralde)
20	23/03/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
21	23/03/05	Pasaje Tumusla	Beni (Prov. Vaca Diez)
22	30/03/05	Mercado Rodríguez	Beni (Riberalta)
23	30/03/05	Mercado Rodríguez	Pando
24	08/04/05	Pasaje Tumusla	La Paz (Prov. Iturralde)
25	08/04/05	Mercado Lanza	Pando
26	08/04/05	Mercado Rodríguez	Pando
27	08/04/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
28	05/05/05	Pasaje Tumusla	Beni (Riberalta)
29	05/05/05	Mercado Rodríguez	La Paz (Prov. Iturralde)
30	05/05/05	Mercado Lanza	La Paz (Prov. Iturralde)
31	15/05/05	Mercado Rodríguez	Beni (Riberalta)
32	15/05/05	Mercado Rodríguez	Beni (Riberalta)
33	27/05/05	Mercado Lanza	Pando
34	27/05/05	Pasaje Tumusla	Pando
35	03/06/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
36	03/06/05	Mercado Rodríguez	La Paz (Prov. Iturralde)

37	16/06/05	Mercado Lanza	Pando
38	16/06/05	Mercado Rodríguez	Beni (Prov. Vaca Diez)
39	02/07/05	Pasaje Tumusla	Beni (Prov. Vaca Diez)
40	02/07/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Riberalta)

TABLA N ° 5 MUESTRAS RECOLECTADAS EN LOS DIFERENTES MERCADOS DE LA CIUDAD DE LA PAZ

4.3. 1 CREACION DE LA BASE DE DATOS Y DISEÑO DEL CUESTIONARIO DE LA RECOLECCION DE MUESTRAS

La base de datos de la recolección de muestras fue diseñada tomando en cuenta las causas más frecuentes de contaminación del alimento. (Anexo 1).

Con la ayuda del programa Epi Info versión 3.3.2, se creó el cuestionario para recolección de muestras donde se recopilaron varios datos importantes para el análisis de los resultados, y en el programa EXCEL se introdujeron los datos de cada cuestionario y posterior análisis estadístico.

4.4 CULTIVO DE LAS MUESTRAS

4.4.1 PREPARACION DE AGAR PATATA DEXTROSA (APD)

Se añadió 31,2 g. de Agar Patata Dextrosa (APD) a un erlenmeyer que contenía 800 ml de agua destilada, se calentó en una estufa hasta disolver la mezcla por completo, luego se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se añadió 14,4 ml de ácido tartárico estéril dilución 1:10, se homogenizó la mezcla y se procedió a llenar las cajas petri, aproximadamente 20 ml en cada caja; se conservaron debidamente rotuladas y envueltas en papel madera para su uso posterior.

4.4.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras recolectadas fueron procesadas previamente al cultivo. De los 250 g. de muestra recolectada se tomó 50 g. y se los disolvió en 250 ml de cloruro de sodio al 0,9% p/v, luego se agitó vigorosamente. Este proceso se realizó para lavar las castañas y para que las esporas fúngicas se floten en la superficie lo cual facilitó que el hongo este libre y pueda recolectarse para su posterior cultivo.

4.4.3 SEMBRADO DE LAS MUESTRAS EN EL MEDIO DE CULTIVO

Luego de tratar las muestras con solución de cloruro de sodio, se tomó 0,5 ml del sobrenadante, se sembró en el medio de cultivo Agar Patata Dextrosa y se extendió en toda la superficie. El sembrado se realizó en un lugar estéril con la ayuda del mechero para evitar contaminaciones en el momento del sembrado.

Después de sembrar las muestras, se las incubó en una estufa a 18°C por el lapso de cinco a siete días debidamente rotuladas. Una vez desarrollados los hongos, se procedió a la identificación macroscópica y microscópica.

4.4.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS SIN CULTIVAR

Las muestras recolectadas que fueron separadas al azar para que se realice la extracción de ADN sin cultivar que tuvieron el mismo tratamiento. Se tomaron 50 g. de castaña y se disolvieron en 250 ml de solución de cloruro de sodio al 0,9% p/v; la mezcla se agitó vigorosamente, se tomo 0,5 ml del sobrenadante y se lo conservo en un tubo de microcentrifuga a 4°C, para su posterior análisis de extracción de ADN.

4.5 IDENTIFICACION MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

4.5.1 VALIDACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Aspergillus flavus*

Aislamiento de ADN

De las 40 muestras recolectadas se escogieron 20 para realizar la identificación convencional, es decir por el método microbiológico, y posterior extracción de ADN y análisis molecular. En cambio las otras 20 muestras no se cultivaron y sólo se procedió directamente a la extracción de ADN y análisis molecular.

Aislamiento de ADN a partir del cultivo

Luego del crecimiento de la esporas fúngicas en Agar Patata Dextrosa (APD) se identificó microscópica y macroscópicamente a los hongos. Luego de identificar a *Aspergillus flavus*, se transfirieron micelios de este hongo a un tubo de microcentrífuga debidamente rotuladas, que contienen 700 ul de buffer de lisis y 8 ul de β mercaptoetanol. Se mezcló 10 segundos en vortex y se incubó en baño Maria a 60°C durante una hora. Posteriormente se añadió cloroformo – TE- fenol 200ul de cada reactivo, se mezcló por 10 segundos en vortex y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se tomó 350 ul de muestra y se la vació a otro tubo de microcentrífuga, se le añadió 25ul de acetato de sodio 2M y 200 ul de isopropanol y se mezcló con cuidado por inversión, luego se centrifugó a 4000 rpm durante un minuto, se decantó el sobrenadante evitando desprender el pellet, se recuperó el pellet con 100 ul de solución TE y se conservó a -20°C hasta su uso (Anexo 2).

Aislamiento de ADN a partir de la cepa de referencia

Las cepas de referencia proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del INLASA, fueron tratadas de la misma forma que los cultivos. Se tomaron micelios de *Aspergillus flavus* en un tubo de microcentrífuga que contenía 700 μ l buffer de lisis (Tris 50mM, pH 7.6, SDS 3%, EDTA 50mM) y 8 μ l de β mercaptoetanol, se mezcló por el lapso de 10 segundos en vortex y se incubó en baño María a 60°C durante una hora. Posteriormente se añadió cloroformo – TE-fenol 200 μ l de cada reactivo, se mezcló durante 10 segundos en vortex y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos. Del sobrenadante se tomó 350 μ l de muestra y se la vació a otro tubo de microcentrífuga; se añadió 25 μ l de acetato de sodio 2M y 200 μ l de isopropanol y se mezcló con cuidado por inversión, luego se centrifugó a 4000 rpm durante un minuto, se decantó el sobrenadante evitando desprender el pellet, el que lo recupero con 100 μ l de solución TE y se conservó a -20°C hasta su uso (Anexo 2).

4.5.2 REALIZACIÓN DE LA PRUEBA MOLECULAR (PCR)

4.5.2.1 PREPARACION DE LA MEZCLA DE REACTIVOS PARA LA TÉCNICA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación por PCR se empleó: 10X Buffer (100mM Tris pH 8.3; 500mM KCl); dNTPs (10mM c/u); Primer 1 (AS1), Primer 2 (AS2); MgCl₂ (25mM); H₂O bidestilada; *Taq polimerasa* (5 U/ μ L). Cada reacción de 12.5 μ l contiene 11 μ l de la mezcla de PCR y 1.5 μ l de la muestra.

De acuerdo con el número de muestras o reacciones se colocaron volúmenes exactos de los reactivos, teniendo siempre en cuenta el control positivo, control negativo, control agua cuarto blanco y control agua cuarto azul.

Luego de preparado el Master Mix en el cuarto blanco se pasó al cuarto azul, donde se encuentran las muestras de ADN extraídas, y se colocaron 1,5 μ l; posteriormente en el cuarto gris se colocaron los controles positivos y negativos.

4.5.2.2 AMPLIFICACIÓN

La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer (9600), donde el perfil termal aplicado fue: Desnaturalización inicial, 5 minutos; desnaturalización a 94°C 30 seg; hibridación a 62°C un minuto extensión a 72°C por dos minutos. Estos parámetros se repitieron por 34 ciclos y una extensión final a 72°C por 10 minutos, el producto amplificado fue conservado a -20°C para su posterior análisis.

4.5.2.3 REVELADO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

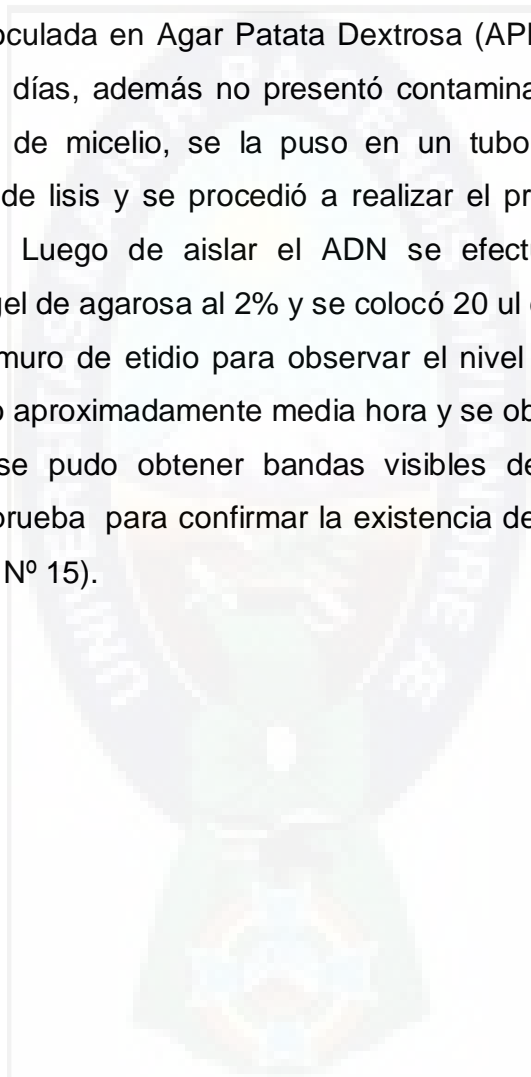
El análisis del producto se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % con buffer TBE 1X (Anexo 2) y bromuro de etidio. Las muestras amplificadas fueron mezcladas con azul de bromofenol aproximadamente 10 ul de la mezcla. Se sembraron en los pocillos del gel en el orden determinado, incluyendo el marcador de peso molecular. La corrida electroforética fue a 100 voltios/cm. por aproximadamente una hora.

Concluida la electroforesis, se observaron las bandas de ADN en el transiluminador Ficher Scientific (FBTI – 88) y se tomó una fotografía bajo luz Ultravioleta utilizando lentes de protección.

5. RESULTADOS

5.1 EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE LA CEPA DE REFERENCIA

La cepa que proporcionó el Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA) fue reinoculada en Agar Patata Dextrosa (APD) y se observó un buen desarrollo en siete días, además no presentó contaminación. Posteriormente, se tomó una porción de micelio, se la puso en un tubo de microcentrifuga que contenía el buffer de lisis y se procedió a realizar el protocolo de extracción de ADN ya validado. Luego de aislar el ADN se efectuó a realizar la corrida electroforética en gel de agarosa al 2% y se colocó 20 ul de muestra en cada pozo mezclado con bromuro de etidio para observar el nivel de la corrida. La corrida electroforética duro aproximadamente media hora y se observó en una lámpara de luz ultravioleta; se pudo obtener bandas visibles de ADN. Se realizó este procedimiento de prueba para confirmar la existencia de ADN sin importar el tipo específico (Figura N° 15).



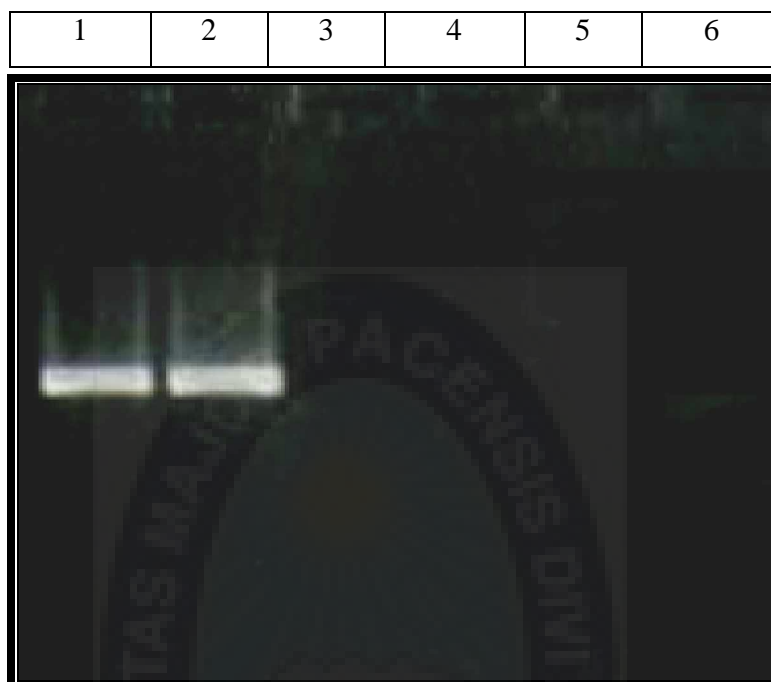


FIGURA N° 15 CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LA CEPA DE REFERENCIA

Posteriormente se efectuó la amplificación específica del gen codificador de la aflatoxina de *Aspergillus flavus*, usando primers específicos para este gen mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Comparando con un marcador de peso molecular se observó que el gen de esta aflatoxina tenía un peso de 595 pb (Figura N° 16).

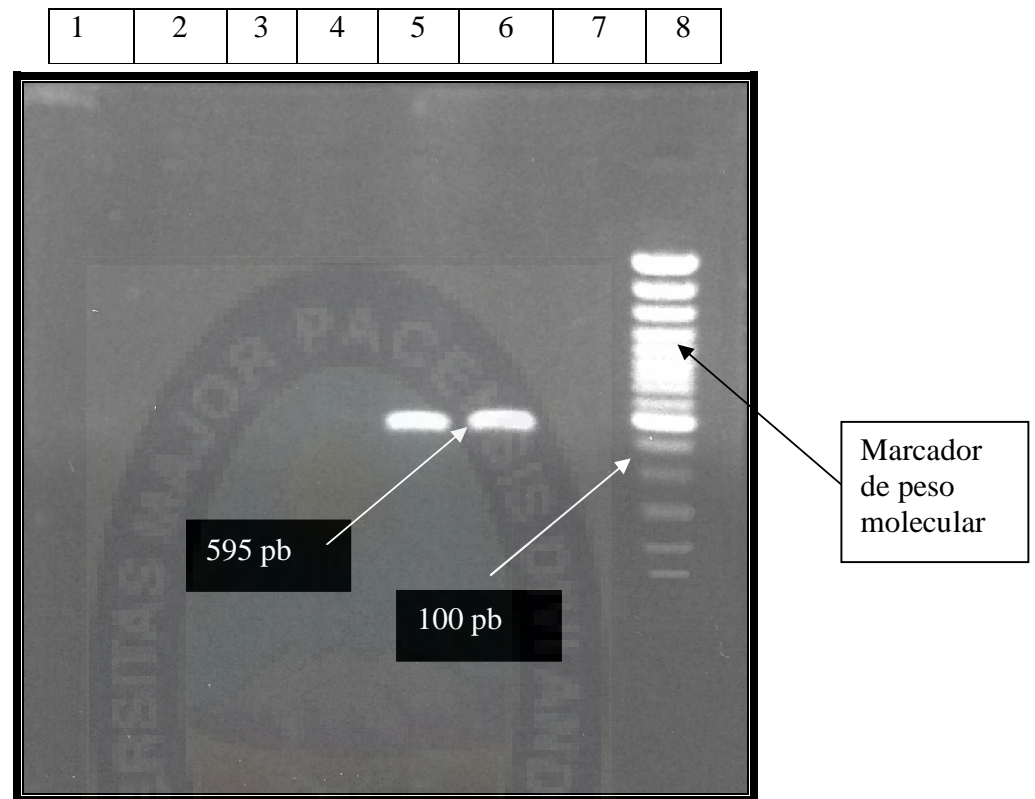


FIGURA N° 16 CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LA PCR DE LA CEPA DE REFERENCIA

(1) Control agua cuarto blanco, (2) Control agua cuarto azul, (3) Control negativo, (4) Cepa de referencia de *Aspergillus flavus*, (5) Cepa de referencia de *Aspergillus flavus*, (6) Control positivo de *Mycobacterium tuberculosis*, (7) Marcador de peso molecular.

5.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CODIFICADOR DE LA AFLATOXINA EN LAS MUESTRAS

Las primeras veinte muestras recolectadas fueron procesadas primeramente por el método convencional microbiológico, es decir cultivo en Agar Patata Dextrosa (APD), y posteriormente se realizó la técnica de extracción de ADN para luego efectuar el análisis molecular mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, amplificando el gen codificador de la aflatoxina con el uso de

primers específicos El proceso se ejecutó en el termociclador Perkin Elmer y duró aproximadamente tres horas. La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 2% y se visualizaron las bandas en lámpara ultravioleta; en esta fase se obtuvieron bandas muy nítidas de las muestras positivas comparando con el marcador de peso molecular de 100 pb cada banda (Figura N° 17).

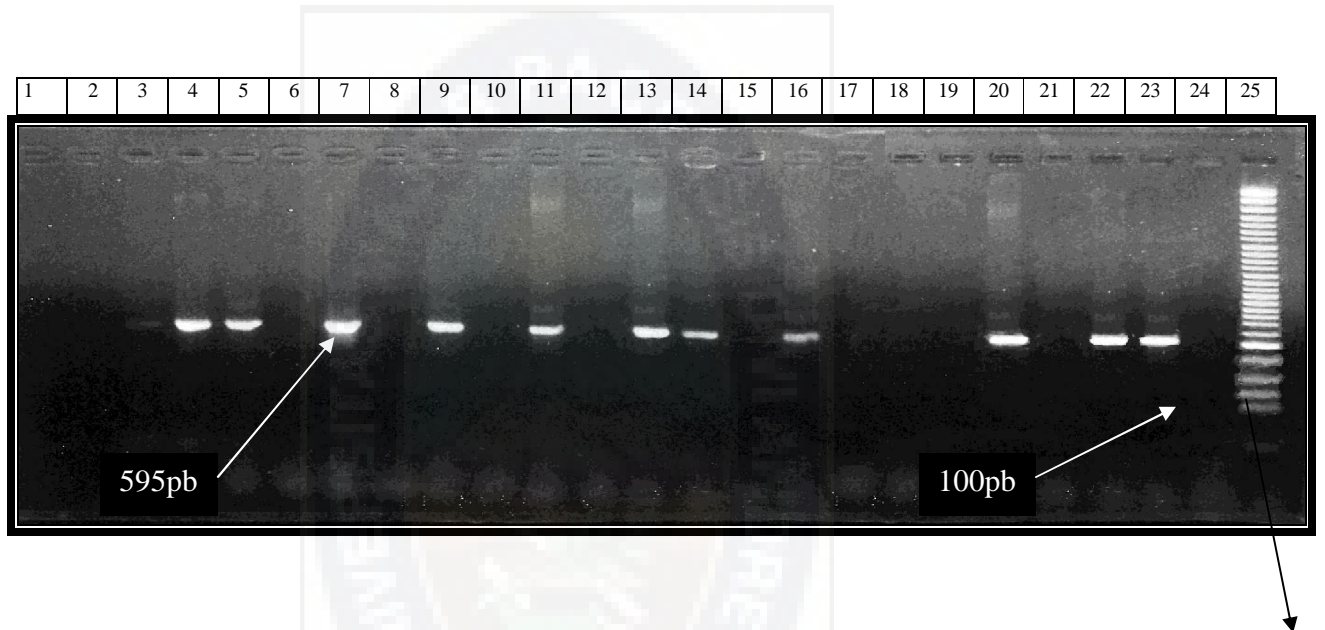


FIGURA N° 17 PCR DE LAS MUESTRAS CULTIVADAS

Marcador
de peso
molecular

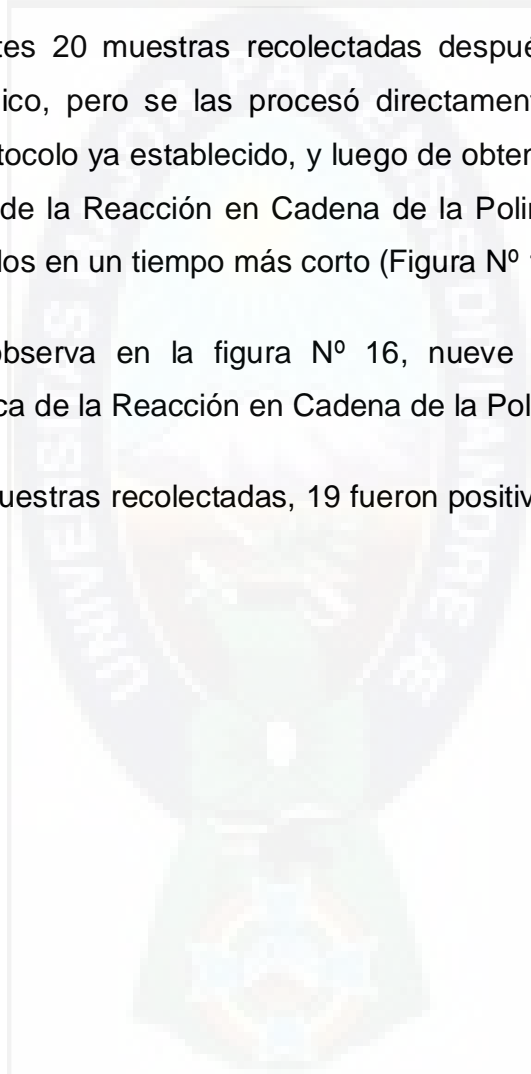
(1) Control agua cuarto blanco, (2) Control agua cuarto azul, (3) Control negativo, (4) Control positivo, (5, 7, 9, 11, 13, 14, 16, 20, 22, 23) Muestras de castaña que contienen el gen codificador de la aflatoxina, (6, 8, 10, 12, 15, 17, 18, 19, 21,24) Muestras de castaña que no contienen el gen codificador de la aflatoxina, (25) Marcador de peso molecular.

Como se observó en la figura, de las 20 muestras procesadas, 10 resultaron positivas, vale decir que contenían el gen codificador de la aflatoxina de *Aspergillus flavus*, mientras que las otras 10 muestras, no. Por lo tanto la técnica de la PCR no amplificó ningún gen diferente de la aflatoxina ya que éste es específico.

Las siguientes 20 muestras recolectadas después, no fueron llevadas a cultivo microbiológico, pero se las procesó directamente para la extracción de ADN mediante protocolo ya establecido, y luego de obtener el pellet se procedió a realizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), donde se obtuvieron resultados en un tiempo más corto (Figura N° 18).

Como se observa en la figura N° 16, nueve muestras resultaron ser positivas a la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

De las 40 muestras recolectadas, 19 fueron positivas a la técnica molecular validada.



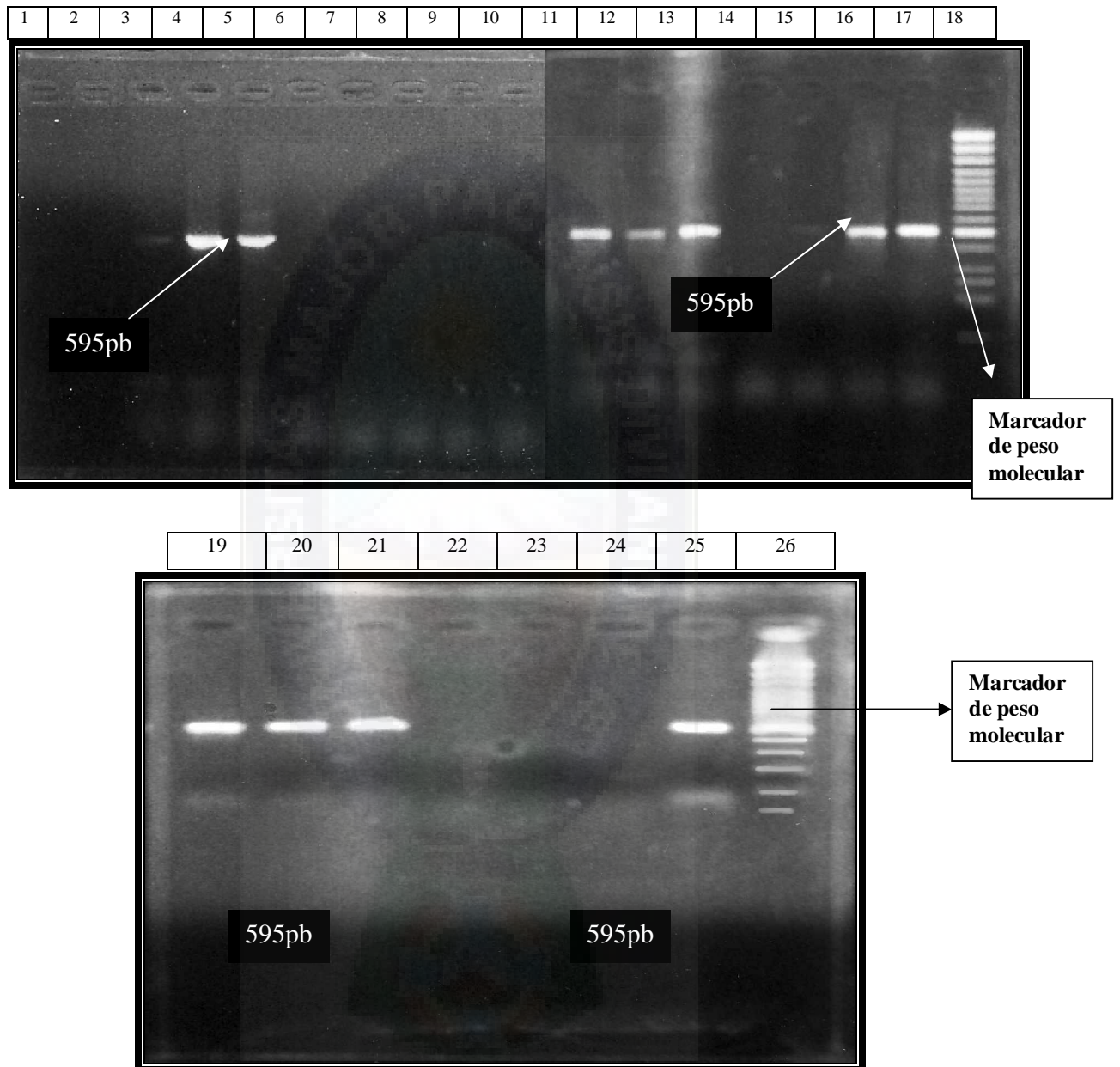


FIGURA N° 18 PCR DE LAS MUESTRAS SIN PORCESAR POR MÉTODO CONVENCIONAL

1) Control agua cuarto blanco, (2) Control agua cuarto azul, (3) Control negativo, (4) Control positivo, (5, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21) Muestras de castaña que contienen el gen codificador de la aflatoxina, (6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 22, 23, 24) Muestras de castaña que no

contienen el gen codificador de la aflatoxina, (25) Control positivo Cepa de *Aspergillus flavus*, (18, 26) Marcador de peso molecular.

En la siguiente tabla se detallan todas las muestras de castaña y los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Cod	Fecha	Procedencia	Mercado	Cultivo	PCR
01	02/01/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	(+)	(+)
02	02/01/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	(+)	(+)
03	12/01/05	Beni (Riberalta)	M. Rodríguez	(+)	(+)
04	12/01/05	Pando	M. Rodríguez	(-)	(-)
05	15/01/05	Beni (Riberalta)	M. Villa Fátima	(-)	(-)
06	20/01/05	Pando	M. Rodríguez	(-)	(-)
07	20/01/05	Pando	M. Villa Fátima	(+)	(+)
08	20/01/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	(+)	(+)
09	30/01/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	(+)	(+)
10	30/01/05	La Paz (Prov. Iturralde)	M. Rodríguez	(+)	(+)
11	05/02/05	Pando	M. Villa Fátima	(-)	(-)
12	05/02/05	La Paz (Prov. Iturralde)	M. Villa Fátima	(-)	(-)
13	05/02/05	La Paz (Prov. Iturralde)	M. Rodríguez	(+)	(+)
14	05/02/05	Pando	M. Rodríguez	(+)	(+)
15	18/02/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	P. Tumusla	(+)	(+)
16	18/02/05	La Paz (Prov. Iturralde)	P. Tumusla	(-)	(-)
17	18/02/05	Pando	P. Tumusla	(-)	(-)
18	0303/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Lanza	(-)	(-)

19	03/03/05	La Paz (Prov. Iturrealde)	M. Lanza	(-)	(-)
20	23/03/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	(-)	(-)
21	23/03/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	P. Tumusla	-----	(+)
22	30/03/05	Beni (Riberalta)	M. Rodríguez	-----	(-)
23	30/03/05	Pando	M. Rodríguez	-----	(+)
24	08/04/05	La Paz (Prov. Iturrealde)	P. Tumusla	-----	(-)
25	08/04/05	Pando	M. Lanza	-----	(+)
26	08/04/05	Pando	M. Rodríguez	-----	(-)
27	08/04/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	-----	(+)
28	05/05/05	Beni (Riberalta)	P. Tumusla	-----	(-)
29	05/05/05	La Paz (Prov. Iturrealde)	M. Rodríguez	-----	(-)
30	05/05/05	La Paz (Prov. Iturrealde)	M. Lanza	-----	(+)
31	15/05/05	Beni (Riberalta)	M. Rodríguez	-----	(-)
32	15/05/05	Beni (Riberalta)	M. Rodríguez	-----	(+)
33	27/05/05	Pando	M. Lanza	-----	(-)
34	27/05/05	Pando	P. Tumulsa	-----	(-)
35	03/06/05	Beni(Prov. Vaca Diez)	M. Villa Fátima	-----	(-)
36	03/06/05	La Paz (Prov. Iturrealde)	M. Rodríguez	-----	(+)
37	16/06/05	Pando	M. Lanza	-----	(-)
38	16/06/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	M. Rodríguez	-----	(+)
39	02/07/05	Beni (Prov. Vaca Diez)	P. Tumusla	-----	(+)
40	02/07/05	Beni (Riberalta)	M. Villa Fátima	-----	(-)

TABLA Nº 6 RESULTADOS DE TODAS LAS MUESTRAS A LA TÉCNICA CONVENCIONAL Y TÉCNICA MOLECULAR

En la figura N° 19 se muestra la distribución porcentual de todas las muestras de la prueba de la PCR, pero de acuerdo con el lugar de procedencia y como se puede observar, la región de donde se recolectó mayor cantidad de muestras fue del Beni, que resulta ser también de la que se obtuvieron más resultados positivos a la técnica de la PCR, más de la mitad de las muestras recolectadas. En tanto que de la región de Pando y La Paz no se recolectaron muchas muestras pero sin embargo, hay que recalcar algo muy importante, y es que en los resultados de la técnica de la PCR de las muestras dieron positivas una gran parte, como se observa en la gráfica, no obstante no fue más de la mitad.

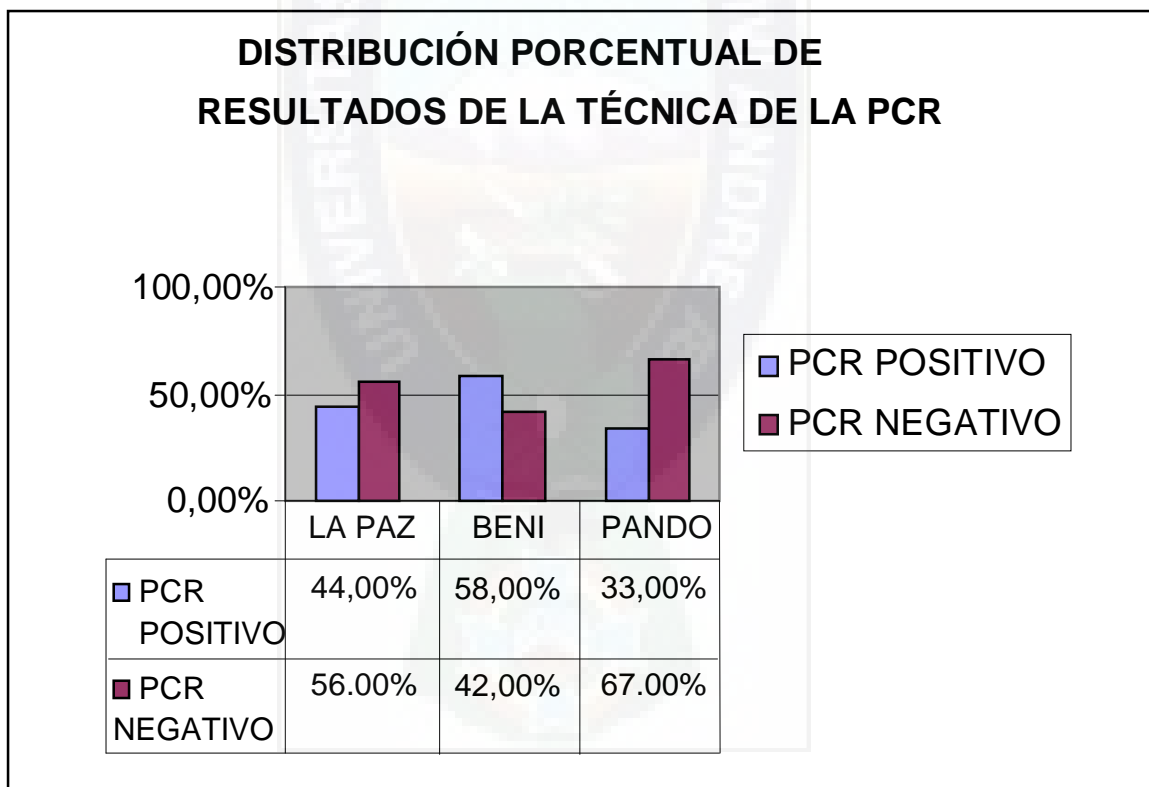
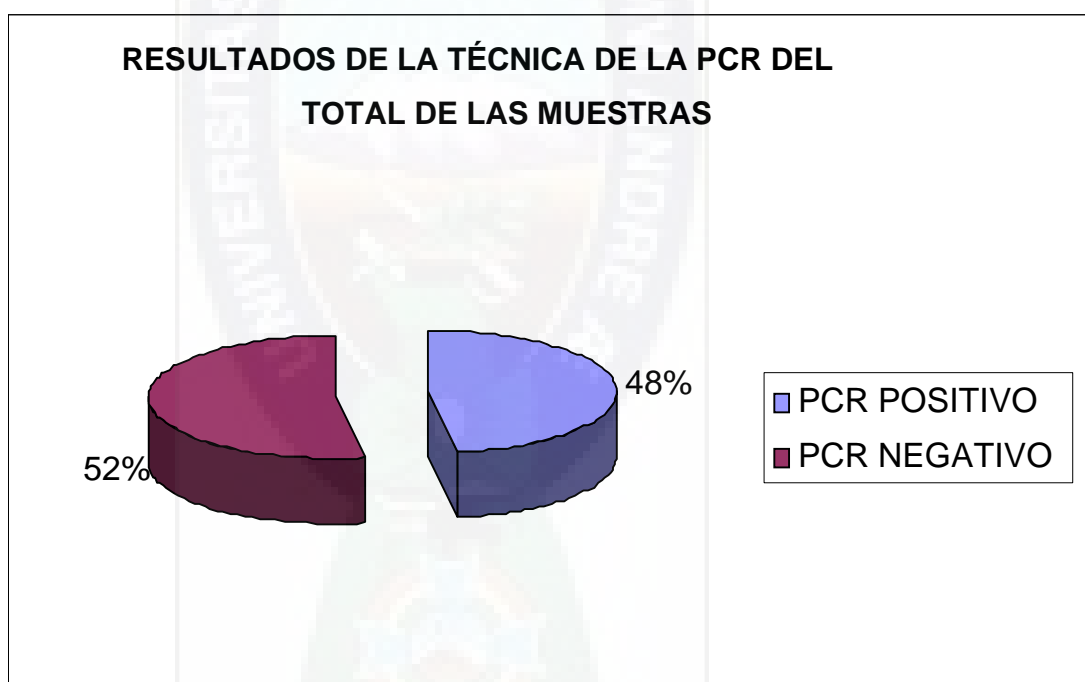


FIGURA N° 19 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE LA PCR DE TODAS LAS MUESTRAS DE ACUERDO CON LA REGIÓN DE PROCEDENCIA

En la figura N° 20 se observa la distribución porcentual de todas las muestras analizadas en general, es decir sin tomar en cuenta la región, y se puede observar que un gran porcentaje de las muestras analizadas por la técnica de la PCR presentan el gen codificador de la aflatoxina. Este dato es muy importante ya que permitirá tener una idea de que no existe un buen control de la exportación de algunos alimentos, o que pueda existir algún tipo de contaminación por parte del manipulador.



**FIGURA N° 20 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE RESULTADOS DE TODAS
LAS MUESTRAS DE LA TÉCNICA DE LA PCR**

5.3 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE *Aspergillus flavus*

Las 20 muestras escogidas para tratarlas convencionalmente, con carácter previo fueron cultivadas en un lugar estéril. Luego de siete días de desarrollo a 25°C, se observó formas características de *Aspergillus flavus* y desarrollo de hongos saprofitos, por lo que se volvió a resembrar para un mejor aislamiento del hongo que se desea encontrar por cinco o siete días más y posterior identificación.

En la Figura N° 21 se observa por microscopia una forma característica de *Aspergillus flavus* luego de una tinción con azul de metileno.



FIGURA N° 21 COLONIAS DE *Aspergillus flavus* OBSERVADAS EN MICROSCOPIO

En la figura N° 22 se observan colonias características de *Aspergillus flavus* en cultivo de Agar APD, luego de siete días de desarrollo sin contaminación. Estas colonias fueron aisladas de cultivos contaminados para poder identificarlas de mejor manera.

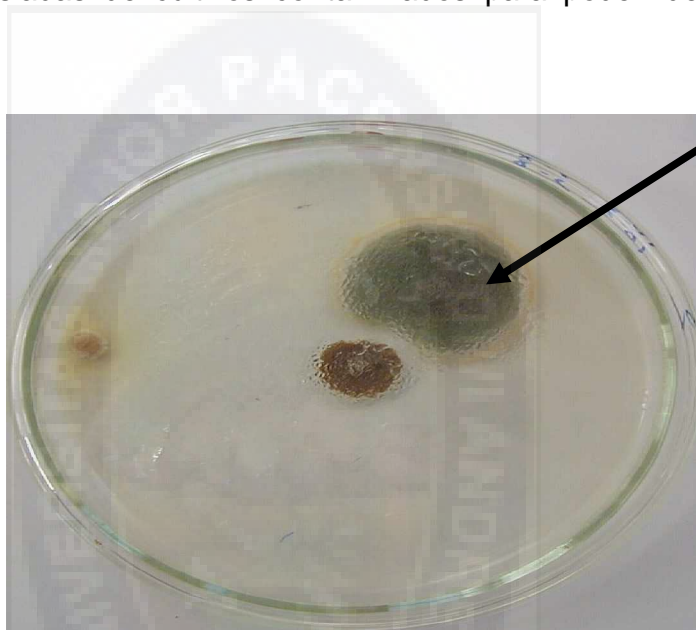


FIGURA N° 22 COLONIAS DE *Aspergillus flavus* EN AGAR PATATA DEXTROSA

En la figura N° 23 y 24 se observa crecimiento de otras formas de microorganismos, como ser *Penicillium* y *Fusarium*, que son hongos saprofitos. Estos cultivos estaban contaminados; pero también se encontraron colonias características de *Aspergillus flavus*.



FIGURA N° 23 CULTIVOS DE LAS MUESTRAS EN AGAR PATATA DEXTROSA LUEGO DE SIETE DÍAS DE DESARROLLO



FIGURA N° 24 OBSERVACION DE ALGUNOS CULTIVOS CONTAMINADAS CON HONGOS SAPROFITOS

La cepa de referencia proporcionada por el INLASA, fue cultivada nuevamente en Agar Patata Dextrosa (APD), y luego de siete días de desarrollo se pudo observar que no hubo contaminantes en el cultivo (Figura N° 25).

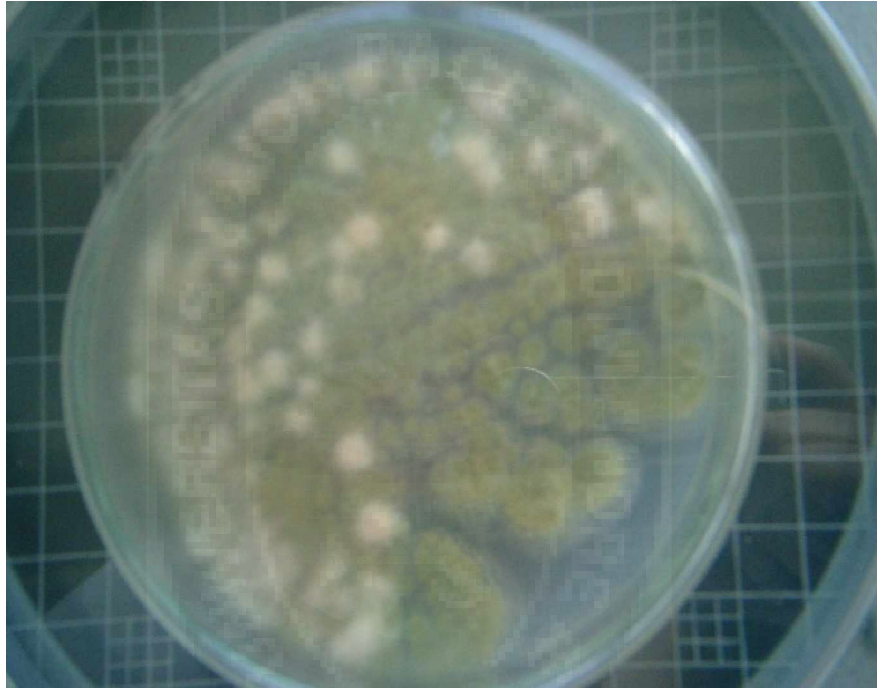


FIGURA N° 25 CULTIVO DE CEPA DE REFERENCIA DE *Aspergillus flavus*

De las 20 muestras cultivadas de forma convencional 10 presentaron colonias de *Aspergillus flavus*; y las otras 10 resultaron negativas, en la tabla N° 7 se observan las muestras que fueron positivas para cultivo; sin embargo, en todas las muestras sembradas se observó crecimiento de hongos saprofitos, debido a que el alimento ya estaba contaminado en el momento de su recolección para ser investigado, posiblemente a causa del contacto con otros alimentos contaminados.

Nº	Cod.	Muestra	Fecha	Lugar	Procedencia
1	01	Castaña	02/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
2	02	Castaña	02/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
3	03	Castaña	12/01/05	Mercado Rodríguez	Beni (Riberalta)
4	07	Castaña	20/01/05	Mercado Villa Fátima	Pando
5	08	Castaña	20/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni(Prov. Vaca Diez)
6	09	Castaña	30/01/05	Mercado Villa Fátima	Beni (Prov. Vaca Diez)
7	10	Castaña	30/01/05	Mercado Rodríguez	La Paz (prov. Iturralde)
8	13	Castaña	05/02/05	Mercado Rodríguez	La Paz(prov. Iturralde)
9	14	Castaña	05/02/05	Mercado Rodríguez	Pando
10	15	Castaña	18/02/05	Pasaje Tumusla	Beni(Prov. Vaca Diez)

TABLA Nº 7 CULTIVOS POSITIVOS PARA *Aspergillus flavus* A PARTIR DE LA MUESTRAS.

5.4 DATOS DE LEVANTAMIENTO DE MUESTRAS (ANEXO 2)

En la figura N° 15 se detalla la distribución porcentual de recolección de muestras de los mercados Rodríguez y Villa Fátima, 35% y 30% respectivamente, lugares donde se obtuvo la mayor cantidad de muestras. La razón por la cual se escogieron estos mercados es por que son los más frecuentados por la población, en vista de que los productos son mas baratos que en los otros mercados y por que tienen gran variedad para la canasta familiar. El mercado Lanza y el pasaje Tumusla no tienen porcentajes altos, y aunque se encuentran en lugares accesibles para la población, no son muy frecuentados por no tener variedad de productos, o porque los costos son más elevados (Figura N° 26).

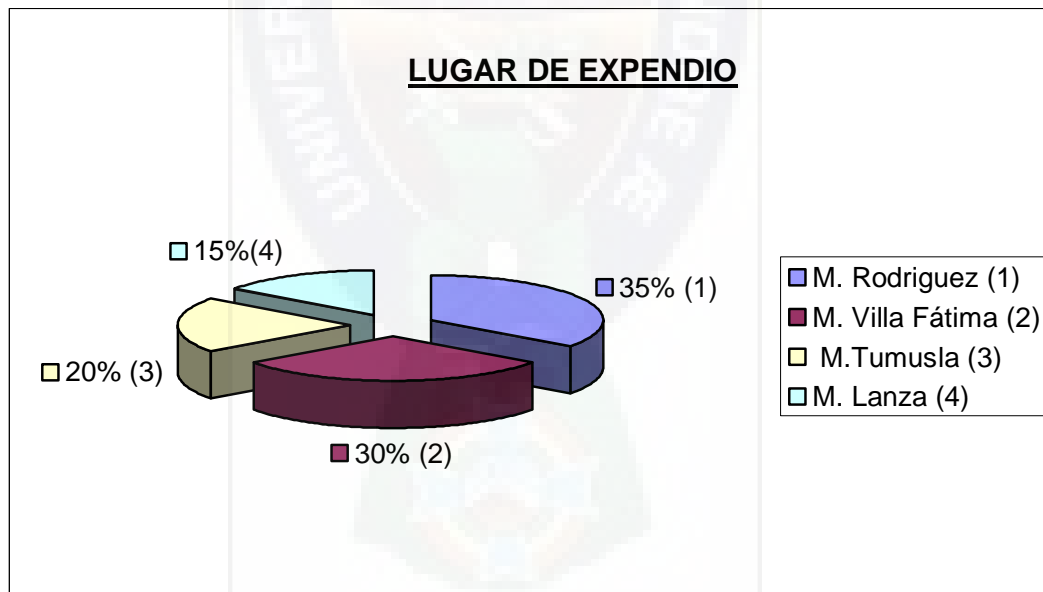


FIGURA N° 26 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS SEGÚN LUGAR DE EXPENDIO EN LOS MERCADOS DE LA CIUDAD DE LA PAZ.

El lugar de procedencia es también importante. Si bien la parte norte de nuestro país es una región muy importante en el cultivo de castaña, hay ciertas regiones que comercializan más este producto.

En la figura N° 27 se observa que la región del Beni es la que presenta mayor comercialización de castaña. El 47% del total de las muestras recolectadas corresponden a Beni, luego la región de Pando con un 30%, y finalmente La Paz con un 23%.

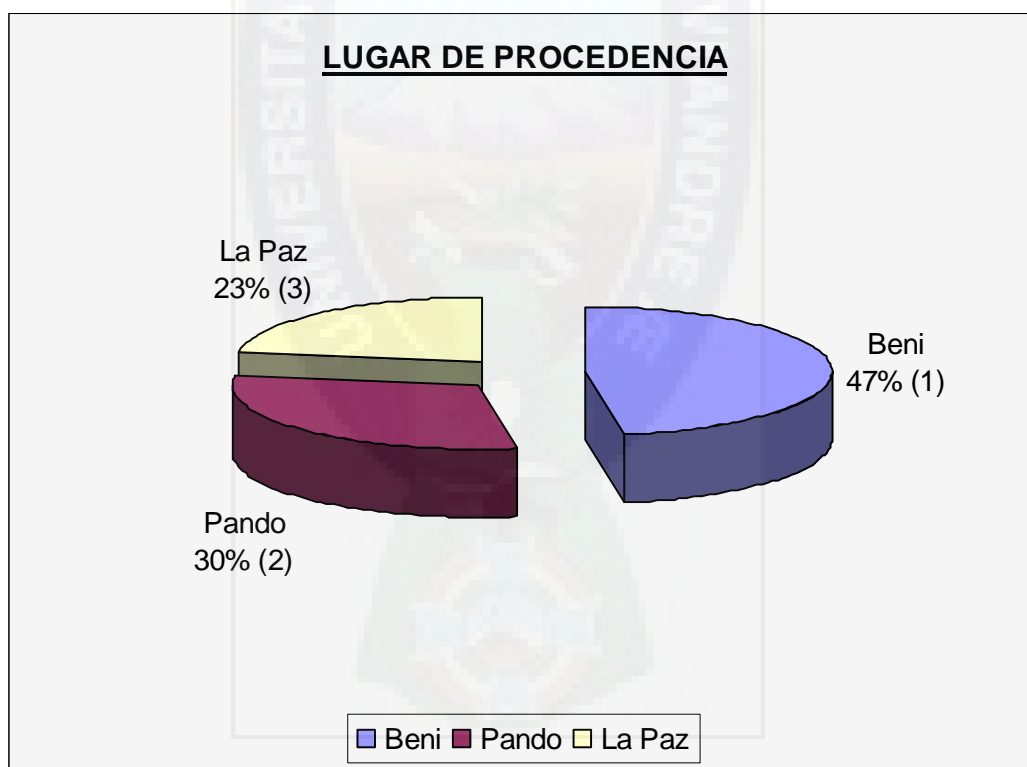


FIGURA N° 27 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL LUGAR DE PROCEDENCIA DEL PRODUCTO EN LA CIUDAD DE LA PAZ.

La mayoría de los vendedores de los mercados donde se recolectaron las muestras 87% ofrecían sus productos en mesas y mostradores expuestos al medio ambiente lo que los hacía susceptibles de cualquier contaminación medioambiental o por contaminación con otros productos, probablemente también contaminados, que estaban expuestos juntamente con la castaña. Esto permite que los hongos patógenos y no patógenos se diseminen fácilmente (Figura N° 28).

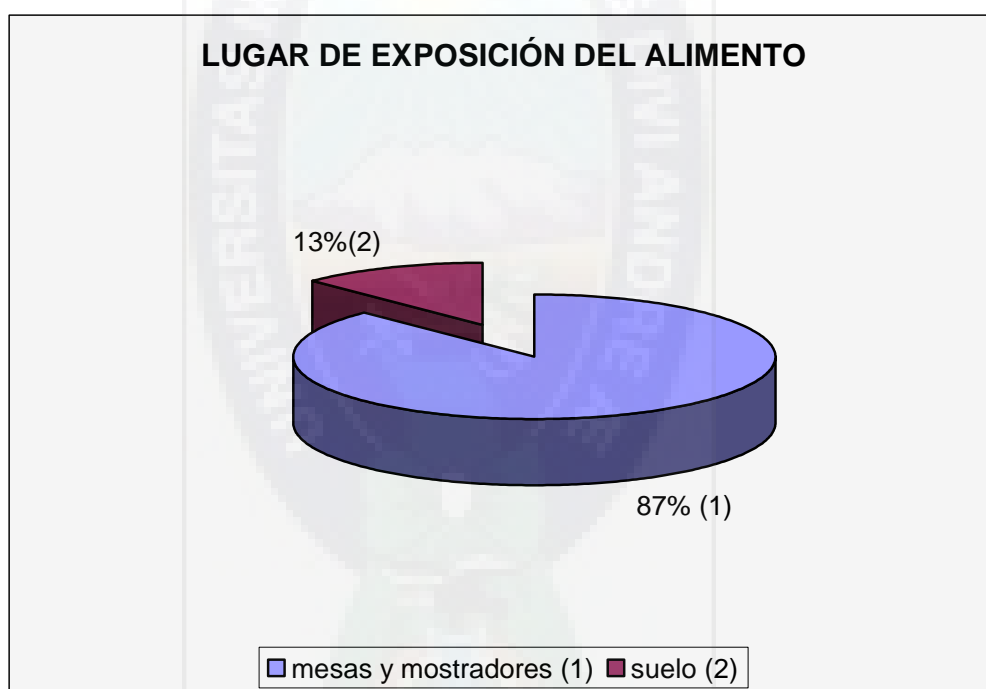


FIGURA N° 28 DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DEL LUGAR DE EXPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS SEGÚN LAS CONDICIONES HIGIÉNICAS

Las condiciones higiénicas del vendedor son muy importantes ya que influyen en la contaminación o no del alimento. Como se pudo observar la mayoría de las personas no tiene mucho cuidado en la manipulación de los productos, lo que provoca la diseminación de los elementos contaminantes en el medio ambiente.

Los vendedores no tiene las manos limpias en el momento de manipular los alimentos (22); el uso de anillos influye también en la contaminación, pues los hongos son fáciles de adherirse a estos y se transportan y contaminan a otros alimentos (15); el uso de utensilios no es muy frecuente en los vendedores; por comodidad, la mayoría usan las manos para manipular los alimentos (14); no todos los vendedores tienen la costumbre de utilizar uniforme (13), y si lo hacen no se encuentran muy limpios (16) (Figura N° 29).

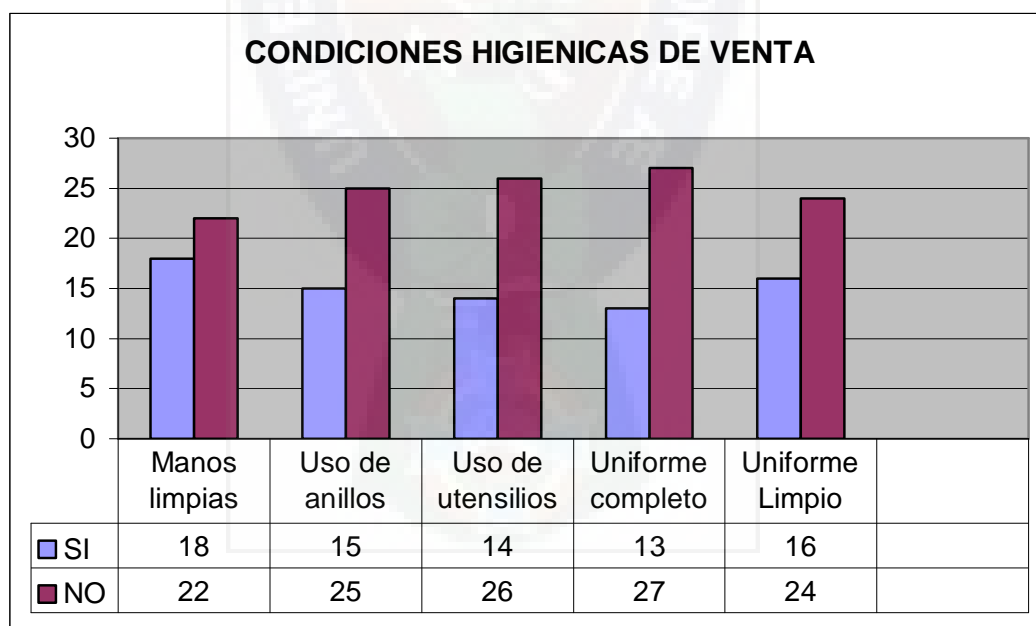


FIGURA N° 29 ASPECTOS HIGIÉNICOS DEL VENDEDOR

5.5 VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La determinación de los análisis estadísticos de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue la siguiente:

Test exacto de Fisher:

Cultivo	PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	9	0	9
Negativo	1	10	11
Total	10	10	20

En vista de que los valores esperados resultaron ser menor a 5 se optó por usar la prueba de test exacto de Fisher; para esta prueba se usó un cuadro de doble entrada, donde se observaron los resultados obtenidos por ambas técnicas: PCR y cultivo microbiológico. Esta prueba tuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), que quiere decir que la confiabilidad fue mayor a 95% (Anexo 3).

Sensibilidad: Capacidad de una determinada prueba para detectar casos positivos (Anexo 3).

En esta prueba se determinó la capacidad que tiene esta técnica molecular para detectar casos positivos de muestras que contenían la aflatoxina del gen codificador de *Aspergillus flavus*.

Sensibilidad = $[\text{Verdaderos positivos} / (\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})] * 100\%$

Sensibilidad (PCR) = 100%

Especificidad: Capacidad de una determinada prueba para detectar correctamente las muestras negativas.

Se determinó la proporción de muestras que no presentaban *Aspergillus flavus* en el cultivo.

Especificidad = $[\text{Verdaderos negativos} / (\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos})] * 100\%$

Especificidad (PCR) = 90%

Eficiencia: Capacidad de una prueba para detectar correctamente las muestras positivas y negativas.

Eficiencia = $[(\text{VP} + \text{VN}) / (\text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN})] * 100\%$

Eficiencia = 95%

Valores predictivos:

Valor predictivo positivo (VPP): Es la probabilidad de que una muestra que fue detectada como positiva lo sea realmente. Es decir que la muestra esté contaminada.

VPP = $[\text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})] * 100\%$

VPP = 90%

Valor predictivo negativo (VPN): Probabilidad de que una muestra que fue detectada como negativa lo sea realmente. Es decir que no este contaminada.

$$\text{VPN} = [\text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})] * 100\%$$

$$\text{VPN} = 100\%$$



6. CONCLUSIONES.

Se determinó la presencia del gen codificador de la aflatoxina en muestras de castaña mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las muestras escogidas para realizar ambos métodos fueron identificadas macroscópica y microscópicamente, pero con dificultad porque existían hongos saprobios que impedían en parte la identificación.

La validación de la técnica de extracción de ADN de *Aspergillus flavus* se realizó satisfactoriamente, tanto en muestras cultivadas como en las muestras de castaña sin cultivo.

La validación de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se realizó usando una cepa de referencia para la obtención de un buen resultado, y posteriormente se procesó con las muestras, donde se pudo identificar el gen codificador mediante esta técnica.

Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), obteniendo resultados satisfactorios.

7. DISCUSIONES

La innovación de una técnica molecular para la detección de un hongo muy importante en el crecimiento de la castaña, fue un gran avance con respecto a la detección rápida del gen codificador de la aflatoxina. Por estudios de investigación se sabe que esta aflatoxina causa daños en la salud del consumidor cuando éste aumenta el nivel establecido de consumo, y lesiona el hígado por ser muy tóxica.

La castaña es uno de los productos de mayor exportación en nuestro país pero por causa de la gran contaminación que existe por el *Aspergillus flavus* y por los rangos de aflatoxina que a veces son superiores a los establecidos, muchas beneficiadoras no pueden exportar.

La implementación de esta técnica molecular propone ser establecida y certificada para la exportación, ya que en nuestro país no existe una entidad certificada internacionalmente y el estudio de este producto es avalado por la Unión Europea, con sus respectivos rangos establecidos para la aprobación de la exportación.

La evaluación de las muestras recolectadas se hizo primero por el método convencional. Se cultivó y esperó siete días de crecimiento, luego se las identificó mediante tinción y finalmente se hizo la extracción de los ácidos nucleicos para analizarlos por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, obteniendo resultados satisfactorios. Asimismo se hizo el análisis molecular de las muestras sin realizar cultivo, con buenos resultados, ya que el tiempo de procesamiento fue más corto que el convencional.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del *Aspergillus flavus* tiene muchas ventajas, como ser el

tiempo; no es necesario cultivar, sólo se procesa la muestra ya que esta técnica es muy sensible y detecta mínimas cantidades, mientras que un cultivo requiere de varios días para su desarrollo y puede existir tanto contaminación del medio ambiente como del propio producto. Luego de observar las características macroscópicas se procede a la tinción para ya también las características microscópicas que muchas veces no se las puede identificar con certeza.

Sin embargo, la sensibilidad de la técnica molecular fue mayor que el método convencional pues en resultados negativos por este último, se obtuvieron resultados positivos mediante la técnica molecular, esto porque detecta mínimas cantidades de muestra, lo que el método microbiológico no puede.

En cuanto a la especificidad, se puede decir que usando primers específicos se detectó el gen codificador de la aflatoxina. En el cultivo no se puede saber si existe la presencia de la aflatoxina, sólo ésta presente el hongo, pero no se sabe si produce o no la toxina, aspecto que se puede saber con la técnica de PCR.

Uno de los factores importantes para producir esta toxina que se pudo verificar con las encuestas recolectadas, fue el mal manipuleo de los alimentos y condiciones poco higiénicas del manipulador. Estos factores influyen en gran manera para que la contaminación sea de un alimento a otro, es decir que otros cereales puedan contaminarse con este hongo.

La identificación de este hongo mediante una técnica molecular es una gran ventaja para identificar específicamente a una especie por medio de la amplificación del gen que codifica a la aflatoxina.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se pudo constatar que se encontró muestras positivas que por medio de cultivo y tinción fueron negativas, por lo que podemos decir que este trabajo de investigación es un gran aporte para la aplicación de una nueva técnica en la identificación de este hongo tan importante.

Este estudio pretende ser una contribución para el control más estricto en la exportación de la castaña y que esta técnica pueda ser certificada y sea una prueba de rutina para todas las beneficiadoras y empresas exportadoras de castaña. De este modo se evitará la contaminación que causan mucho daño a la salud del consumidor.



8. RECOMENDACIONES

En posteriores investigaciones se recomienda continuar con la cuantificación de la aflatoxina, en vista de que la Unión Europea permite un rango de esta que no alcance niveles tóxicos para el consumidor. Además sería un gran aporte cuantificar la aflatoxina en el producto analizado, así como de acuerdo con la ingesta diaria media del consumidor para que no cause daño.



9. BIBLIOGRAFIA

1. La contaminación por micotoxinas, <http://www.consumaseguridad.com>
2. Las micotoxinas: problema permanente, N° 3, Notas científicas, Ilender Corp., 1998.
3. ESCALONA R., Armando, Micotoxinas, abril de 2005, <mailto:escalona@udg.co.cu>
4. DE LUCA, Leonardo J., Micotoxinas, Universidad Nacional de Zamora (B.A.), 2005.
5. CARRILLO, Leonor, Los hongos de los alimentos y forrajes, Pag. 1-24, 44-60 Universidad Nacional de Salta, www.unsa.edu.ar/matbid/micologia.htm.
6. DEKKER, Marcel, Mycotoxins in Ecological Systems. pp. 23-58, www.sistemaecologico.com
7. BASUALDO, Juan a., et al. Microbiología Biomédica, Ed. Atlente srl, Buenos Aires, 1996, ISBN 950-9539-30-9.
8. Respuesta de la salud pública a las armas biológicas y químicas: toxinas, <http://www.bt.cdc.gov/HealthProfessionals/index.as>.
9. PALACIOS H., Teresa de Jesús, Hongos y micotoxinas, contaminantes naturales de gran riesgo para la salud, Año 9, 2004, phtere@yahoo.com.mx.
10. Micotoxinas en ambientes laborales, www.postcosecha.org.
11. Peligros ocultos en los alimentos, www.micotoxinas.com

12. Temas de actualidad micotoxinas: aflatoxinas (Parte II), Volumen 1 N° 3 año 2002, www.postcosecha.org.ni/documentos/micotoxinas.doc
13. Temas de actualidad micotoxinas: aflatoxinas (parte I), Volumen 1 N° 2 año 2002, <http://www.acontece.com.ar>
14. Informe sobre el problema de aflatoxinas de la castaña (Bertholletia excelsa) en Bolivia, Enero, 1999, USAID/Bolivia Proyecto de Manejo Forestal Sostenible BOLFOR, bolfor@bibosi.scz.entelnet.bo
15. HARRIS, Eva. A Low Cost to Approach PCR. Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. Oxford University Press. 1998.
16. REVOLLO, Susana y colaboradores. Manual de Diagnóstico Molecular, SELADIS. 1997.
17. ERLICH H., Henry. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press. 1989.
18. "Reacción en Cadena de la Polimerasa", Enciclopedia Microsoft Encarta 2000.
19. Zona castañera de mayor producción, www.debernacional.htm
20. Características del árbol de la castaña, www.brazilnuts.htm
21. CASTEDO, Especificaciones Técnicas. Castañas – Brasil Nuts, Santa Cruz-Bolivia, <http://www.geocities.com/quinua2002/brasilnuts.html>
22. Sistema de Información de la Diversidad Biológica y Ambiental de la Amazonía Peruana, Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana – IIAP, 2002, www.siamazonia.org.pe

23. *Aspergillus flavus*,

<http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>

24. TRAVIS, Henry, et al., Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2, Vol. 38, N° 4, pag. 1510-1515, Journal of Clinical Microbiology, Apr. 2000.



ANEXO 1

IDENTIFICACIÓN DE LA AFLATOXINA PRODUCIDA POR *Aspergillus flavus* EN LA CASTAÑA

Nº: 00/2005

A. IDENTIFICACIÓN

Departamento:

Localidad:

Fecha:

B. DATOS DE LA MUESTRA

Zona de expendio

Ciudad de La Paz

Mercado Rodríguez

Mercado Villa Fatima

Pasaje Tumulsa

Mercado Lanza

Condiciones de higiene y transporte

Condiciones higiénicas del vendedor

Aseo personal

Manos limpias

si

no

Usa anillos si no

Uniforme completo si no

Uniforme limpio si no

Uso de utensilios si no

Ejecución de cualquier acto que pueda provocar la contaminación del alimento

Si no

Lugar de exposición del alimento

Mesas y mostradores suelo

Superficie de contacto con los alimentos

Limpio sucio

C. RESULTADOS DE ANÁLISIS

Cultivo:

Microscopia

PCR:

ANEXO 2

PREPARACION DE REACTIVOS

BUFFER DE LISIS

✓ TRIS 50 mM

Para 25 ml se pesa 0,151 gr. De Tris y se disuelve en 25 ml de agua destilada estéril ajustando el pH a 7,2 con ácido clorhídrico, y guardar a una temperatura de 4°C.

✓ EDTA 50 mM

Para 25 ml. Se pesa 0,465 gr. de EDTA, se disuelve en 25 ml de agua destilada estéril, mezclar vigorosamente, ajustar a pH 8 con hidróxido de sodio (NaOH) filtrar y guardar a una temperatura de 4 °C.

✓ SDS 3% (SULFATO DODECIL DE SODIO)

Para 25 ml se pesa 0,75 gr. calentar a 65°C para disolver la mezcla guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

TE

✓ TRIS 20 mM

En 25 ml de agua destilada estéril se disuelve 0,06 gr. de Tris, se ajusta el pH a 7,2 con ácido clorhídrico y se guarda a una temperatura de 4 °C.

✓ EDTA 2mM

En 25 ml de agua destilada estéril se disuelve 0.018 gr. de EDTA, mezclar vigorosamente, ajustar a pH 8 con hidróxido de sodio (NaOH), filtrar y guardar a una temperatura de 4 °C.

FENOL

Pesar 20 gr. de fenol, calentar sin pasar de 68°C en ese estado se forma un color amarillo y ya no se cristaliza, luego añadir 0,2 gr. 8-hidroxiquinolona, se añade Tris-HCl 1M ajustando el pH a 8.

Toda la mezcla se coloca en un embudo de separación para que se separe la fase fenólica y volver a agregar Tris-HCl 1M, repetir varias veces hasta que la fase acuosa llegue a un pH mayor a 7,6, guardar en frasco ámbar a una temperatura de 4°C.

ACETATO DE SODIO 3M

Se pesa 20,4 gr. de acetato de sodio y se disuelve en 50 ml de agua destilada estéril, ajustar el pH a 5,5 con ácido acético, conservar a una temperatura de 4°C.

TAMPON TBE 10x

Pesar 108 gr. de Tris, 55 gr. de ácido bórico y disolverlos en 1000 ml de agua destilada, luego agregar 7,44 ml de EDTA 0,5 M pH 8 autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

ANEXO 4

FOTOGRAFÍAS



FOTOGRAFIA N° 1 CAMARA DE LUZ U.V. PARA LA PREPARACION DE LA MEZCLA DE REACTIVOS PARA PCR (CUARTO BLANCO)



FOTOGRAFIA N° 2 HELADERA DONDE SE CONSERVAN LOS REACTIVOS A -20°C PARA LA REALIZACION DE LA TECNICA DE PCR(CUARTO BLANCO)



FOTOGRAFIA N° 3 CENTRIFUGA EPPENDORF 5410C (CUARTO AZUL)



FOTOGRAFIA Nº 4 TERMOCICLADOR PERKIN ELMER (CUARTO GRIS)



FOTOGRAFIA Nº 5 CENTRIFUGADORA JOUAN MR-1822 (CUARTO GRIS)



FOTOGRAFIA Nº 6 HORNO DE INCUBACION (CUARTO GRIS)



FOTOGRAFIA Nº 7 CAMARA ELECTROFORETICA (CUARTO NEGRO)



FOTOGRAFIA Nº 8 TRANSILUMINADOR (CUARTO NEGRO)