

Control de micotoxinas emergentes. Situación legislativa actual

Vicente Sanchis, Sonia Marín y Antonio J. Ramos

Unidad de Microbiología, Departamento de Tecnología de Alimentos, CeRTA. Universidad de Lleida, Lleida, España

Resumen

Dada la creciente importancia de las llamadas micotoxinas emergentes, por su elevada incidencia en materias primas base para la alimentación humana y animal, así como por su implicación en diversas patologías, se hace necesario un control de las mismas. Dicho control en pre y post-cosecha, ante la creciente oposición a la descontaminación de los productos por métodos químicos, debe ir encaminado a acciones preventivas, como el control del crecimiento de los mohos micotoxigénicos y de la acumulación de micotoxinas en los substratos (mediante técnicas tales como la reducción de la a_w y la modificación de otras condiciones de almacenamiento), y la detección precoz de dichas micotoxinas, mediante técnicas de análisis sencillas y rápidas. Paralelamente, el estudio del efecto de los procesos industriales sobre la concentración de toxina presente en la materia primera, puede ser de ayuda, dado que dichos procesos pueden contribuir a la reducción de la concentración. Finalmente, todo ello pasa por el establecimiento de unos límites máximos permitidos de las diferentes micotoxinas para los productos destinados a la alimentación tanto humana como animal.

Palabras clave

Micotoxinas, Fumonisin, Control, *Fusarium*, a_w

Emerging mycotoxin control. Current limits and regulations

Summary

Emerging mycotoxins are of a great importance due to their high occurrence in foods and feeds and their implication in pathologies. There is a need to control them both in pre- and post-harvest. However, the increasing drawbacks of chemical decontamination methods, makes the use of preventive methods more attractive. These are based on avoiding growth of mycotoxigenic fungi and mycotoxin accumulation in these substrates (by using reduced a_w levels, and modifying other storage conditions) and the early detection of these mycotoxins by using simple and fast analysis techniques. At the same time, it is important to know the effect that industrial processing has on mycotoxin concentration in foods and feeds, because it may reduce the toxin content. Finally, maximum limits of mycotoxin concentration should be established for both foods and feeds.

Key words

Mycotoxins, Fumonisin, Control, *Fusarium*, a_w

Las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico caracterizadas por presentar una elevada toxicidad tanto para el hombre como para los animales, toxicidad que puede comprender desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, teratogénicas o mutagénicas hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor. Los mohos productores de micotoxinas se encuentran en la mayoría de hábitats y pueden contaminar los alimentos, principalmente los productos agrícolas, y como resultado de su actividad metabólica acumular en éstos las toxinas.

Debido al daño potencial que las micotoxinas pueden ejercer sobre la salud humana y animal, desde el descubrimiento de las aflatoxinas en la década de 1960, y con mayor o menor prontitud, muchos países han establecido reglamentos para su control, centrados básicamente en las aflatoxinas. No obstante, otras micotoxinas como las fumonisin, ocratoxina A y los tricotecenos podrían adquirir, en breve, una mayor importancia para el sector agroalimentario debido a que éste puede verse forzado a controlar su presencia en los alimentos. Estas micotoxinas conocidas desde hace tiempo y que se prevee van a ser objeto de control en un futuro son las denominadas micotoxinas emergentes.

Dirección para correspondencia:

Dr. Vicente Sanchis
Unidad de Microbiología
Dpto. Tecnología de Alimentos, CeRTA
Universidad de Lleida, Alcalde Rovira Roure, 177
25198 Lleida, España

Dentro de las micotoxinas emergentes, vamos a hacer especial mención a las fumonisinas, debido a que nuestro grupo de investigación ha estado trabajando, principalmente, en estas micotoxinas durante los últimos seis años.

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas producidas por *Fusarium* que fueron caracterizadas en 1988, y que han demostrado estar presentes en maíz y sus derivados, causando una serie de enfermedades en équidos y cerdos, pareciendo que están también relacionadas con el cáncer esofágico en humanos [1,2].

Estudios previos realizados en nuestro país han demostrado que las fumonisinas se encuentran contaminando muestras de maíz y sus derivados, como cereales de desayuno, aperitivos, cervezas y piensos, destinados no sólo al consumo animal sino también al humano (Tabla 1). Además, *Fusarium moniliforme* Sheldon y *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, que son las especies toxigénicas de las fumonisinas, forman parte de la micoflora predominante de nuestro maíz. Existe además el agravante de que un elevado porcentaje, más del 90% de las cepas aisladas pertenecientes a estas dos especies, son capaces de producir fumonisinas bajo condiciones de laboratorio [3-5].

Tabla 1. Contaminación por fumonisinas en alimentos españoles destinados al consumo humano y animal.

Producto	Incidencia (positivos*/total)	Intervalo concentración (ng g ⁻¹)
Maíz	12/17	0-2200
Maíz roto	14/15	0-1500
Pienso	18/18	0-2200
Maíz triturado	3/15	0-90
Copos de maíz	2/12	0-100
Aperitivos	2/11	0-200
Maíz tostado	0/9	ND
Harina de maíz	1/3	0-70
Cerveza	14/32	0-86 ng ml ⁻¹

* >50 ng g⁻¹; ND: no se ha detectado

Ante esta perspectiva se han desarrollado una serie de métodos convencionales para controlar el problema de la contaminación por micotoxinas en los alimentos. Debido a que las aflatoxinas son las toxinas fúngicas más conocidas y que han sido sometidas a un mayor control, los métodos que a continuación se exponen han sido desarrollados, principalmente, para estas toxinas. No obstante éstos están siendo estudiados, principalmente, para las micotoxinas emergentes:

A) Control en pre-recolección [6].

- Impedir que se produzcan condiciones de estrés en la planta por sequedad, malas hierbas, etc. La irrigación es quizás la práctica cultural más efectiva en cacahuets y maíz.

- Utilización de pesticidas para, en primer lugar, controlar los insectos que a causa de su actividad provocan y/o facilitan la entrada de los mohos, y en segundo lugar inhibir el crecimiento de los mohos micotoxigénicos.

- Utilización de variedades que presenten una resistencia parcial al ataque fúngico.

B) Control en post-recolección [7].

- Prevención. Utilización de condiciones de almacenamiento (temperatura, a_w , atmósfera de gases...) que impidan el desarrollo y producción de la toxina por los mohos toxigénicos.

- Destoxificación. Descontaminar los alimentos

mediante la utilización de métodos físicos y/o químicos, de los que destacamos el tratamiento con vapores de amoníaco y las radiaciones.

Según la F.A.O. [7] las condiciones que han de cumplir los procesos de descontaminación de micotoxinas son:

- 1) Destruir, inactivar o eliminar las micotoxinas.
- 2) No producir residuos tóxicos.
- 3) Retener el valor nutritivo y aceptabilidad del producto.
- 4) No alterar las propiedades tecnológicas del producto.
- 5) Destruir el micelio y esporas fúngicas.
- 6) Ser respetuoso con el medio ambiente.

La descontaminación química y el mezclado de lotes de productos con diferentes niveles de contaminación por micotoxinas son quizás algunas de las mejores opciones para reducir la concentración de estas toxinas en los alimentos. No obstante, la nueva legislación europea prohíbe taxativamente estas prácticas [8].

Una medida cada vez más utilizada en los alimentos destinados a consumo animal, es la aplicación de materiales, como la bentonita, que impidan la absorción intestinal de la toxina [9].

La aplicación de la biotecnología en el control de las micotoxinas está siendo utilizada en mayor proporción, principalmente a tres niveles [10]:

a) Mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan la formación de micotoxinas por el moho. Se dispone de datos sobre la regulación y control de la biosíntesis de la aflatoxina.

b) Agentes biocompetitivos. Mejora de microorganismos que son competidores naturales de los mohos micotoxigénicos.

c) Intensificación de la resistencia de la planta huésped contra la contaminación por micotoxinas.

Los estudios realizados por nuestro grupo con el objetivo de controlar las fumonisinas en los alimentos se han centrado en tres apartados: a) Acción preventiva encaminada al control del crecimiento y acumulación de estas sustancias tóxicas en el maíz; b) Perfeccionamiento y evaluación de técnicas rápidas y sencillas para su análisis; y c) Efecto de los procesos industriales en la concentración de estas micotoxinas en los productos elaborados.

a) Acción preventiva encaminada al control del crecimiento y acumulación de estas sustancias tóxicas en el maíz

F. moniliforme no es solamente el patógeno más común encontrado en los granos de maíz, sino que además se encuentra entre los hongos más comúnmente aislados de las plantas sanas. Esta especie fúngica es una constante de las plantas y semillas de maíz, de manera que es capaz, sin producir síntomas, de transmitirse vía semilla a las nuevas plantas e infectar los granos [11]. Por los estudios realizados hasta la fecha, es razonable concluir que el maíz normalmente contiene fumonisinas. El maíz es uno de los productos agrícolas más importantes en EEUU como ingrediente mayoritario de piensos. También la harina de maíz es básica en la alimentación en regiones de África, Asia y América Central y del Sur. En Norteamérica y Europa los derivados del maíz son componentes importantes de muchos alimentos procesados, como los cereales para el desayuno, snacks, refrescos, y cerveza. Es sabido que las fumonisinas no son destruidas por muchos de los procesos industriales. Dado que a menudo se da la infección asintomática de los granos de maíz, no es posible separar los granos infectados mediante los controles físicos tradicionales [11], con lo cual éstos

pasaran al almacén, confiando al secado y al posterior control del almacén el peso de la conservación.

Es importante evitar por todos los métodos el pre-almacenamiento del maíz antes del secado, dado que en ese momento las condiciones de humedad son las óptimas para la producción de fumonisinas en el mismo [12].

Uno de los factores que presentan una mayor influencia en la alteración de los alimentos es el contenido de agua disponible o actividad de agua (a_w). Para cada microorganismo en concreto se puede calcular cual es su valor mínimo, óptimo y máximo, siendo ésta una información de gran interés si lo que se desea es controlar o inhibir el crecimiento de una especie fúngica determinada. Otros factores que también influyen en el crecimiento fúngico son la temperatura, la presencia de diferentes tipos de conservantes, la coexistencia de otros microorganismos, etc., factores todos ellos que también han sido objeto de estudio por nuestro grupo.

El estudio detallado de la ecofisiología de los principales hongos productores de fumonisinas, especialmente de *F. moniliforme* y *F. proliferatum*, podrá ofrecernos nuevas vías para la conservación de los alimentos, las cuales tendrán en cuenta de una forma integrada todos aquellos factores que inicialmente enumeramos como factores que influyen sobre la actividad microbiana/fúngica en un alimento. Así, se determina la influencia que tienen sobre el inicio del desarrollo, crecimiento y producción de micotoxinas por parte de los mohos, diversos factores bióticos y abióticos cuyo control permitirá mejorar la conservación de los alimentos por ellos alterados, modificando estos factores hasta valores en los que se demuestre que la conservación es más eficaz.

Los experimentos llevados a cabo con diferentes cepas de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* revelan que el intervalo de a_w y temperaturas que permiten la germinación son diferentes de las de crecimiento con valores de 0,88-0,99 y 5-42°C para el primer caso, y 0,90-0,99 y 4-35°C para el segundo (Figura 1). Así pues, temperaturas y actividades de agua inferiores a 4°C y 0,88 respectivamente, o temperaturas superiores a 37°C impiden la germinación y por lo tanto la acumulación de estas

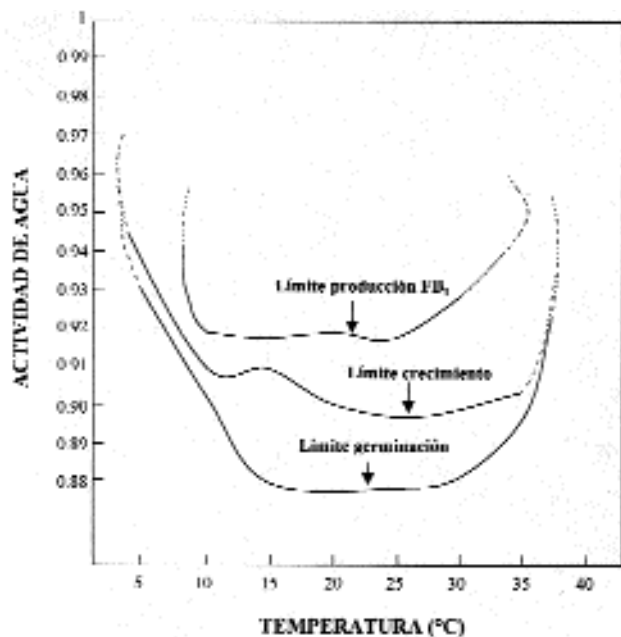


Figura 1. Condiciones límite de a_w y temperatura para el desarrollo de *F. proliferatum* 73N (límite germinación: < 10% microconidios germinados; límite crecimiento: velocidad < 0,1 mm d⁻¹; límite producción FB₁: < 1 ppm).

micotoxinas en maíz. No obstante estas especies micotoxigénicas están mejor adaptadas a ambientes con poca agua disponible que la gran mayoría de las especies de *Fusarium* [13,14].

Se observan interacciones complejas entre los factores bióticos y abióticos que influyen en la colonización y dominancia de un determinado sustrato por parte de las cepas productoras de fumonisinas. El estudio de las interacciones fúngicas ha captado más atención debido al hecho de que la producción de micotoxinas por cepas toxigénicas puede verse inhibida o favorecida por la presencia de otras especies [15-19]. La producción de fumonisinas en presencia de cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium implicatum*, se ve en general inhibida, excepto bajo algunas condiciones en las cuales se ve estimulada. Dichas condiciones en general coinciden con las a_w más altas (0,98) y ambas temperaturas (15°C y 25°C) (Figura 2) [20]. Las causas de la inhibición podrían ser la propia competencia por los nutrientes, la producción de alguna sustancia inhibidora de la síntesis o la degradación de la fumonisina una vez producida por parte de las cepas ensayadas. Se demostró que bajo algunas condiciones, la producción de fumonisinas en co-cultivo de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* conduce a una mayor producción que cuando se cultivan por separado [20]. Las causas de esta estimulación podrían ser la producción, por las cepas

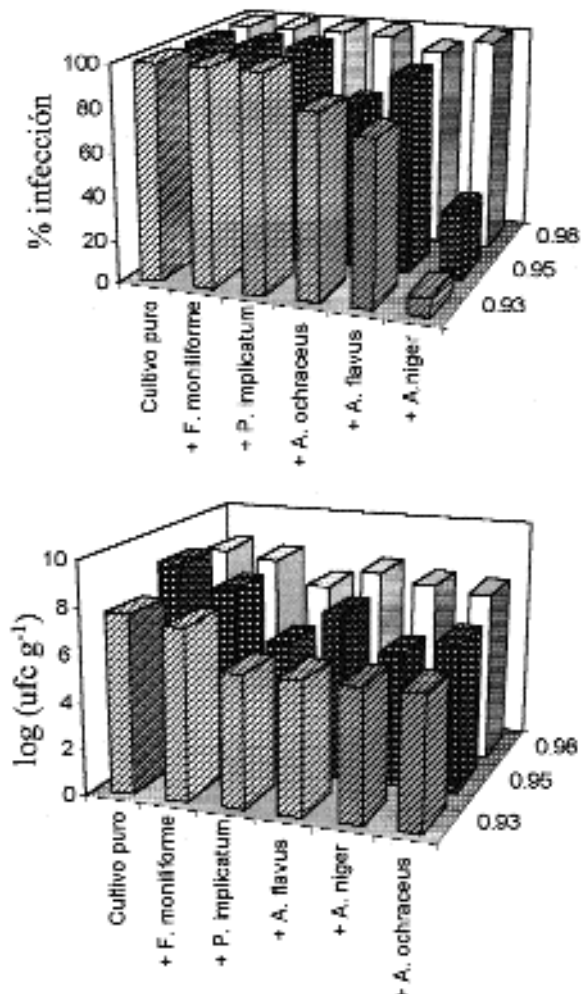


Figura 2. Impacto de la microfiora del maíz sobre el porcentaje de infección y las poblaciones de *F. proliferatum* a 25°C tras 28 días de incubación.

acompañantes, de sustancias precursoras de la síntesis, o que la propia competencia hiciera que las cepas de *Fusarium* pasaran prematuramente del ciclo vegetativo a la producción de metabolitos secundarios.

Estudios realizados por Yoshizawa *et al.* [21] mostraron que había fumonisinas en muestras tanto de maíz aparentemente sano como enmohecido, sin diferencia significativa. Las muestras con altos niveles de fumonisinas (1ppm) contenían bajos niveles de aflatoxinas. Se demostró una relación negativa entre ambas micotoxinas, concluyéndose que se había dado una interacción entre cepas productoras de aflatoxinas y fumonisinas.

A partir de los diagramas de isopletras (Figura 1) se puede ver como es posible controlar la producción de fumonisinas por la simple combinación a_w/T , siempre que las condiciones de almacenamiento del maíz sean adecuadamente controladas y mantenidas constantes mediante aireación periódica. El intervalo de condiciones que permiten controlar la producción de fumonisina B₁ (FB₁) es mucho más amplio que aquel que se requiere para controlar el crecimiento o la germinación de las cepas productoras en cada caso. Un almacenamiento a $<0,93 a_w$ aseguraría el mantenimiento de un maíz libre de fumonisinas procedentes del campo, a niveles < 1 ppm a cualquier temperatura. El almacenamiento refrigerado también conseguiría la misma finalidad. Por otra parte, la estimulación de la producción de FB₁ por otras especies fúngicas presentes en el grano se da en general a a_w altas, valores bajo los cuales, ya no sería factible el almacenamiento, con lo cual a los niveles de a_w a los que designamos como 'seguros' la propia microflora del maíz podría incluso actuar como factor de control adicional.

Interesantes resultados se han obtenido con la aplicación de conservantes a base de propionatos en maíz. La combinación de dosis de 0,07% de propionato en maíz a 0,93 a_w consigue inhibir por completo el crecimiento de *Fusarium* inoculado en forma de micelio (Figura 3). Sin embargo, cuando se realiza la inoculación en las mismas condiciones en forma de esporas - es conocido que las condiciones requeridas para germinar son menos restrictivas que las requeridas para crecer-, las cepas no solamente son capaces de germinar sino que incluso producen fumonisinas, en cantidades importantes en el caso de *F. proliferatum* [22]. Sin embargo, las mismas concentraciones de propionatos en maíz contaminado de forma natural no tienen ningún efecto sobre la población de *Fusarium* con respecto a los blancos, aunque la concentración de fumonisinas no suele ser muy alta, debido al efecto controlante de la propia microflora [23]. El ácido propionico muestra mejor eficiencia que sus mismas sales en el control del crecimiento y la producción de fumonisinas por parte de las cepas de *Fusarium moniliforme* y *F. proliferatum*. Esta reducción se ve potenciada a temperaturas y actividades de agua desfavorables.

Las dosis mínimas recomendadas por fabricantes de conservantes (alrededor del 0,05%), son efectivas en maíz seco y correctamente almacenado, con un 0,7 de a_w ; la adición del conservante en este caso previene del deterioro en caso de que se dé una rehumidificación puntual. Sin embargo, el control de la humedad y temperatura del grano sigue siendo básico. Por otra parte, es más común el uso de conservantes para maíz ensilado con alto contenido de humedad (18-20%), en este caso las dosis deben aumentarse por encima de 0,2% [24].

Se ha intentado el control de la producción de aflatoxinas mediante conservantes, tipo sorbatos, en maíz almacenado en silos cerrados y con un contenido de humedad relativamente alto. La eficiencia depende de la humedad, y de los microorganismos presentes, de forma

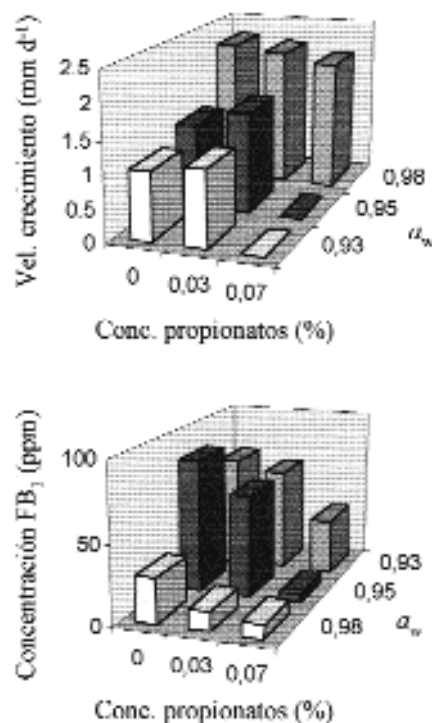


Figura 3. Efecto del tratamiento del maíz con propionatos sobre el crecimiento y la producción de FB₁ por *F. proliferatum* sobre el mismo a 15°C.

que la dosis necesaria para inhibir la mayoría de los presentes e inhibir la presencia de aflatoxina, 1%, fue demasiado alta para considerarse económica [25].

Se considera que el consumo por équidos de maíz conteniendo 8 ppm FB₁ puede producir leucoencefalomalacia en caballos (ELEM) [26]. Asimismo, se han recomendado concentraciones máximas de FB₁ de 5, 10 y 50 ppm en piensos para équidos, porcino y vacuno y aves, respectivamente [27]. Se ha observado como *Fusarium* es capaz de producir grandes cantidades de fumonisinas dentro de un determinado rango de a_w y temperaturas, dicho rango abarca en sus extremos condiciones que se pueden dar en post-cosecha antes del secado; probablemente es en este punto cuando se da la mayor producción de fumonisinas, sin embargo, después del secado, no deberían producirse en absoluto. Si por una falta de control adecuado en el almacén se da un rehumedecimiento del grano, la presencia de otras especies fúngicas en el grano, más adaptadas a a_w más bajas, parecen actuar como factor controlante de la producción de fumonisinas, pese a que los recuentos de *Fusarium* siguen siendo altos. Sin embargo, en este caso [23] *A. flavus* aparece como una de las especies mayoritarias, con lo cual, sería interesante conocer si en dichas condiciones *A. flavus* solo está presente o si, por el contrario, es capaz de sintetizar aflatoxinas. En muestras de maíz naturalmente contaminado e incubado por periodos de 1, 2, 3, 4 semanas, se han encontrado concentraciones de < 20 ppm, cuando la concentración a tiempo 0 era < 1 ppm, por lo tanto pequeñas cantidades de fumonisinas se producen probablemente en el almacén cuando se da una pequeña condensación de agua en aquellos granos que ya estaban previamente infectados, sin embargo, debido a la presencia de otros hongos, *Fusarium* podría no ser capaz de infectar nuevos granos [23].

b) Perfeccionamiento y evaluación de técnicas rápidas y sencillas para su análisis

La cromatografía líquida-líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica cuantitativa, rápida y muy sensible, capaz de producir una excelente separación entre componentes químicamente similares como son la familia de las fumonisinas. La rápida aparición de técnicas de HPLC para matrices de origen biológico ha generado gran interés en la aplicación del análisis automatizado de compuestos por esta técnica cromatográfica, incluyendo el caso de compuestos amino como los aminoácidos y las fumonisinas.

A pesar de los esfuerzos realizados y del amplio abanico de métodos propuestos y aplicados con más o menos éxito al análisis de fumonisinas, todavía no se ha encontrado una técnica que reúna suficientes ventajas y no presente ningún inconveniente significativo como para ser adoptada sistemáticamente. Hacen falta nuevas metodologías tan precisas y fiables como muchas de las empleadas hasta ahora, pero menos costosas y más simples.

Se pueden obtener derivados fluorescentes de las fumonisinas B₁ y B₂ por la reacción de un determinado reactivo o producto con la amina primaria de ambas fumonisinas. Shephard *et al.* [28] demostraron que se podía obtener un derivado altamente fluorescente haciendo reaccionar estas toxinas con o-ftaldialdehído (OPA). Sin embargo este derivado no es estable. El reactivo AccQ-Fluor es un nuevo reactivo que presenta esta propiedad, y que está siendo utilizado en el análisis de aminoácidos. Nuestro trabajo ha constatado que este reactivo es una alternativa útil para la determinación de fumonisinas B₁ y B₂ en maíz. La tabla 2 recoge los resultados comparables obtenidos mediante este método y el método de Shephard. Además dicho método muestra una buena linealidad entre 1 a 100 ppm cuando el análisis se lleva a cabo en dos días diferentes, la reproducibilidad es aceptable y su estabilidad es de al menos 48 h (Tabla 3) [29].

Tabla 2. Resultados del análisis de las fumonisinas B₁ y B₂ en dos muestras de maíz usando el método Shephard y el método AccQ-Fluor.

Muestra	FB ₁ (µg g ⁻¹)		FB ₂ (µg g ⁻¹)	
	Método Shephard	Método AccQ-Fluor	Método Shephard	Método AccQ-Fluor
1	1,0	1,3	0,5	0,3
2	1,3	2,0	0,7	0,6
3	10,3	13,8	5,8	4,2

Tabla 3. Estabilidad de los AccQ-Fluor derivados de los patrones de las fumonisinas B₁ y B₂ (50 µg ml⁻¹).

Tiempo (h)	FB ₁ (altura de pico en mV)		FB ₂ (altura de pico en mV)	
	X ± DS	X ± DS patrón reciente	X ± DS	X ± DS patrón reciente
0	16,5 ± 1,3		13,3 ± 0,85	
1	17,6 ± 1,1	18,1 ± 0,73	13,1 ± 1,1	12,5 ± 0,81
4	18,1 ± 0,73	15,8 ± 2,1	13,2 ± 1,1	12,7 ± 0,56
6	17,5 ± 0,50	15,8 ± 2,1	13,2 ± 0,75	12,7 ± 0,56
24	16,4 ± 0,65	17,2 ± 0,65	13,0 ± 0,29	13,5 ± 0,40
48	17,5 ± 1,8	17,3 ± 1,5	13,6 ± 0,80	13,4 ± 0,65

c) Efecto de los procesos industriales en la concentración de estas micotoxinas en los productos elaborados

Dado que un gran número de muestras de maíz están contaminadas con fumonisinas, es muy importante el desarrollo de procedimientos de detoxificación de estas toxinas en los alimentos. Diversos autores han investigado la aplicación de compuestos básicos para el tratamiento de maíz contaminado por fumonisinas [30,31]. Además de estos métodos químicos de descontaminación, Viljoen *et al.* [32] informaron que los niveles de fumonisinas en productos refinados de maíz decrecían durante la molienda, y Sydenham *et al.* [33] informaron, igualmente, de los efectos descontaminadores importantes que representaban, en cuanto al contenido total de estas micotoxinas en muestras de granos, la eliminación de las partículas pequeñas (tamaño < 3 mm).

Debido a que una de las etapas en la molienda del grano de maíz consiste en un acondicionamiento en el que se humedece éste bajo condiciones controladas, se planteó un estudio enfocado a determinar los efectos del tiempo de remojo y la presencia de SO₂, en el contenido de fumonisinas en el grano.

Se detectó un comportamiento diferente entre las dos fumonisinas. Así, mientras que para la FB₁ la tasa entre la concentración de toxina presente en el agua y la concentración de toxina presente en el grano, era superior a 1 después de 12-24 h de contacto, lo que significa que existe una mayor concentración de toxina en el agua, para la FB₂, esta tasa se producía a las 48 h de contacto (Figura 4). Esta diferencia se puede explicar por diferencias de polaridad entre ambas toxinas. Además, el SO₂ parece retrasar la extracción de la toxina del grano y su paso a la fase líquida [34].

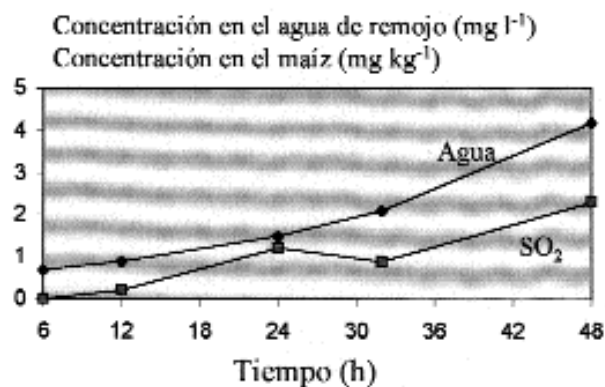


Figura 4. Tasas de transferencia de FB₁ desde la semilla a la fase líquida de acuerdo con las condiciones y tiempo de remojo.

Asimismo, para determinar el efecto que la eliminación del germen que se realiza a nivel industrial tiene sobre el nivel de fumonisinas presente en la materia prima, se procedió a la desgerminación y posterior cuantificación de FB₁ y FB₂ en el germen y el resto de la semilla. La concentración de FB₁ en ambas fracciones fue similar, mientras que el porcentaje de FB₂ fue significativamente menor en el germen que en el resto de semilla (Tabla 4).

En general, y en base a los resultados obtenidos, los procesos industriales comunes en la industrialización del maíz para la obtención de derivados reducen la concentración de estas micotoxinas en los productos elaborados, debido probablemente a la solubilidad que éstas presentan con respecto al agua.

Tabla 4. Distribución de las FB₁ y FB₂ en el germen y en el resto de la semilla.

	Fumonisin B ₁		Fumonisin B ₂	
	media (µg g ⁻¹)	CV (%)	media (µg g ⁻¹)	CV (%)
Germen	1,16 ^{a*}	17,2	0,22 ^a	6,8
Resto de semilla	1,45 ^a	17,8	0,42 ^a	10,8

*Las medias con distintos superíndices en la misma columna son significativamente diferentes (P<0,05)

Estos resultados apoyan los datos disponibles en otros estudios sobre métodos físicos y químicos de descontaminación de granos contaminados con toxinas de *Fusarium*. Tales métodos incluyen separación por densidad, tamizado y molturación [32,33], y tratamientos con bases [31,33]. Adicionalmente, nuestros resultados pueden ser importantes cuando el maíz contaminado es utilizado como materia prima en la industria de piensos, o cuando se añade al mosto de cerveza para corregir su composición. En este último caso, Scott *et al.* [35] encontró que las FB₁ y FB₂ son estables cuando se añaden al mosto sin levaduras y se mantienen durante ocho días.

d) Legislación

Dado el daño potencial que las micotoxinas pueden ejercer sobre la salud humana y animal, y vista su posible relación con el cáncer (Tabla 5), muchos países han establecido regulaciones para su control, aunque en la mayoría de los casos éstas se ocupan principalmente de las aflatoxinas.

Tabla 5. Principales micotoxinas y su relación con evidencias de carcinogenicidad.

Micotoxina	Evidencia de Carcinogenicidad		Clasificación IARC
	Humana	Animal	
Aflatoxinas	S	S	1
Aflatoxina M ₁	I	S	2B
Esterigmatocistina	ND	S	2B
Griseofulvina	ND	S	2B
Ocratoxina A	I	S	2B
Fumonisin	I	S	2B
Ac. Penicílico	ND	L	3
Citrinina	ND	L	3
Patulina	ND	I	3
Toxina T-2	ND	L	3
Toxinas de <i>F. graminearum</i> (zearalenona y tricotecenos)	I	L	3

S: evidencia suficiente; I: evidencia insuficiente; ND: no datos; L: evidencia limitada

Algunas de estas reglamentaciones tienen rango de ley, mientras que otras tienen únicamente un carácter consultivo. Una encuesta encargada por la FAO entre 1994-95 puso de manifiesto que al menos 77 países poseían alguna legislación específica para las micotoxinas (Tabla 6), conociéndose que al menos 13 países no han promulgado ningún tipo de legislación al respecto y no poseyendo ninguna información de unos 40 países, principalmente del continente africano (FAO, 1997). Todos los países con legislación específica para alguna micotoxina tienen regulado, al menos, el nivel máximo permisible de las aflatoxinas en alimentos y piensos.

Por regla general, los países exportadores de productos agrícolas procedentes de zonas tropicales o subtropicales con climas húmedos y cálidos carecen de límites máximos admisibles para las micotoxinas o, si los poseen, son claramente superiores a los impuestos por los países

importadores presentes en zonas de clima moderado o frío. Los países con niveles típicamente más bajos para las aflatoxinas son los escandinavos y Suiza. De forma ideal, cabría esperar que se llegara a un consenso mundial en las regulaciones a aplicar a todas las micotoxinas en todos los tipos de alimentos o piensos, pero parece ser que esto es una hipótesis lejana de la realidad, debido principalmente a intereses creados y a presiones de tipo comercial.

En 17 países existen también regulaciones específicas para otras micotoxinas, como la chetomina, deoxinivalenol (DON), diacetoxiscirpenol (DAS), fumonisin, ocratoxina A, patulina, phomopsina, stachybotryotoxina, toxinas T-2 y HT-2, y zearalenona (Tabla 6).

Tabla 6. Reglamentaciones existentes sobre las principales micotoxinas a nivel mundial.

Micotoxinas	Nivel límite (µg/kg)	Tipo de alimentos	Países
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	0-50	Alimentos consumo humano	77
	5-1.000	Alimentos consumo animal	
M ₁	0-1	Leche y derivados	17
Chetomina	0	Piensos	Rumania
DON	5-10.000	Trigo y piensos	5 ^a
Fumonisin	1.000	Maíz	Suiza ^b
Ocratoxina A	1-300	Cereales, cafe, piensos alimentos y riñones	11 ^c
Patulina	20-50	Zumo manzana y der. manzana	12 ^d
Phomopsina	5	Todos	Australia
Stachybotriotoxina	0	Piensos	Rumania
Toxina HT-2	25-100	Piensos	Canadá
Toxina T-2	100	Cereales y harinas	Rusia e Israel
Zearalenona	30-1.000	Alimentos (nueces, cereales y legumin)	6 ^e

a: Austria, Canadá, Rumania, Rusia y USA.

b: Reglamentación provisional.

c: Austria, Brasil, Chequia, Dinamarca, Francia, Grecia, Israel, Rumania, Suecia, Suiza y Uruguay.

d: Austria, Chequia, Finlandia, Francia, Grecia, Israel, Noruega, Rumania, Rusia, Suecia, Suiza y Uruguay.

e: Austria, Brasil, Francia, Rumania, Rusia y Uruguay.

En la U.E. el nivel máximo admisible de aflatoxina B₁ en los alimentos para consumo humano está situado en 5 µg/kg, mientras que para la suma de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, este nivel asciende a 10 µg/kg. El contenido máximo de aflatoxina B₁ en los piensos está situado entre 10 y 50 µg/kg, según su destino, y para los ingredientes para piensos no se pueden superar los 200 µg/kg.

Sin embargo, recientemente en la U.E. se ha modificado el reglamento por el que se fija el contenido máximo de aflatoxinas en algunos productos alimenticios específicos (Reglamento n° 1525/98 de la Comisión de 16 de julio de 1998; D.O.C.E. 17-7-98, L201/43-46), siendo de aplicación esta nueva reglamentación a partir del 1 de enero de 1999, habiendo quedado como sigue:

- Cacahuets, frutos de cáscara, frutos secos, cereales (incluido el trigo sarraceno, *Fagopyrum* sp.), y los productos derivados de su transformación, destinados al consumo humano directo o como ingredientes de productos alimenticios: máximo 2 µg aflatoxina B₁/kg, y 4 µg aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂/kg.

- Cacahuets destinados a ser sometidos a un tratamiento de selección u otros métodos físicos antes de su consumo humano o su utilización como ingredientes de productos alimenticios: máximo 8 µg aflatoxina B₁/kg, y 15 µg aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂/kg.

- Frutos de cáscara y frutos secos destinados a ser sometidos a un tratamiento de selección u otros métodos físicos antes de su consumo humano o su utilización como ingredientes de productos alimenticios: máximo 5 µg aflatoxina B₁/kg, y 10 µg aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂/kg.

- Cereales (incluido el trigo sarraceno, *Fagopyrum* sp.), destinados a ser sometidos a un tratamiento de selección u otros métodos físicos antes de su consumo humano o su utilización como ingredientes de productos alimenticios: máximo 2 µg aflatoxina B₁/kg, y 4 µg aflatoxinas B₁+B₂+G₁+G₂/kg.

Hay que destacar que, en el caso concreto del contenido máximo de aflatoxinas en frutos de cáscara y frutos secos destinados a ser sometidos a un tratamiento de selección u otros métodos físicos antes de su consumo humano o su utilización como ingredientes de productos alimenticios, los niveles máximos se volverán a debatir en función de los avances de los conocimientos científicos y tecnológicos antes del 1 de julio de 1999.

Además, esta reglamentación ha incluido una legislación específica que determina los niveles máximos admisibles de aflatoxina M₁ en la leche y sus derivados:

- Leche (leche cruda, leche destinada a la fabricación de productos a base de leche y leche de consumo directa térmicamente): máximo 0,05 µg aflatoxina M₁/kg.

En todos los casos, el método de toma de muestras, así como el método de análisis de referencia, es el descrito por la Directiva 98/53/CE. Esta nueva directiva prohíbe específicamente:

- Mezclar productos conformes con los límites máximos fijados con productos no conformes, o mezclar productos sometidos a un tratamiento de selección u otros métodos físicos con productos destinados al consumo humano directo o como ingrediente de productos alimenticios.

- Utilizar productos no conformes con los límites máximos establecidos como ingredientes para la fabricación de otros productos alimenticios.

- Descontaminar productos mediante tratamientos químicos.

Los cacahuetes, frutos de cáscara, frutos secos y cereales no conformes a los niveles máximos exigibles a productos destinados a ser consumidos directamente por el ser humano podrán ser puestos en circulación siempre que:

- No se destinen al consumo humano directo ni como ingredientes de productos alimenticios.

- Sean conformes con los niveles máximos establecidos para cuando estos alimentos estén destinados a ser sometidos a un tratamiento de selección u otros métodos físicos antes de su consumo humano o su utilización como ingredientes de productos alimenticios.

- Sean sometidos a un tratamiento posterior de selección u otros métodos físicos de forma que después de dicho tratamiento no superen los máximos establecidos para productos destinados al consumo humano directo, y que el tratamiento mismo no provoque otros residuos nocivos.

- El destino de dichos productos aparezca claramente visible en una etiqueta que incluya la indicación "producto destinado a ser sometido obligatoriamente a un tratamiento de selección u otros métodos físicos con objeto de reducir el nivel de contaminación de aflatoxinas antes de su consumo humano o su utilización como ingrediente de productos alimenticios".

Los autores desean expresar su agradecimiento a la CICYT (ALI98-0509-C04-01) y a la Paeria de Lleida por su ayuda económica.

Bibliografía

- Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, van Schalkwyk DK. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 1992; 82: 353-357.
- Marasas WFO. Fumonisin. Their implications for human and animal health. *Natural Toxins* 1995; 3: 193-198.
- Sanchis V, Abadías M, Oncins L, Sala N, Viñas I, Canela R. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2147-2148.
- Sanchis V, Abadías M, Oncins L, Sala N, Viñas I, Canela R. Fumonisin B₁ and B₂, and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from Spanish market. *Int J Food Microbiol* 1995; 27: 37-44.
- Torres MR, Sanchis V, Ramos AJ. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Int J Food Microbiol* 1998; 39:139-143.
- Lisker N, Lillehoj EB. Prevention of mycotoxin contamination at the preharvest stage. En: Smith JE, Henderson RS (Eds.). *Mycotoxins and animal foods*. Boca Raton, CRC Press, 1991: 689-719.
- Park DL, Lee LS, Price RL, Pohland AE. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. *J Assoc Off Anal Chem* 1988; 71: 685-703.
- DOCE. Reglamento nº 1525/98 de la Comisión de 16 de julio de 1998. DOCE 17-7-98, L201/43-46.
- Phillips T, Sarr BA, Clement BA, Kubena LF, Harvey RB. Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. En: Ryan DH, Bray GA (Eds.) *Mycotoxins, cancer and health*. Baton Rouge, Louisiana State University Press, 1991: 223-237.
- Widstrom NW, Snook ME, Wilson DM, Cleveland TE, McMillian WW. Silk mayzín content and resistance of commercial corn (maize) hybrids to kernel contamination by aflatoxin. *J Sci Food Agric* 1995; 67, 317-321.
- Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis* 1997; 81: 556-565.
- Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiol* 1995; 20: 247-251.
- Marín S, Sanchis V, Magan N. Water activity, temperature and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* isolates from maize. *Can J Microbiol* 1995; 41: 1063-1070.
- Marín S, Sanchis V, Teixidó A, et al. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* from maize. *Can J Microbiol* 1996; 42: 1045-1050.
- Weckbach LS, Marth EH. Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a competitive environment. *Mycopathologia* 1977; 62: 39-45.
- Wicklow DT, Hesseltine CW, Shotwell OL, Adams GL. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 1980; 70: 761-764.
- Moss MO, Badii F. The influence of *Penicillium rubrum* on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* on maize. En: Proceedings of the fifth IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. International Union of Pure and Applied Chemistry, Viena, 1982.

18. Cuero RG, Smith JE, Lacey J. Stimulation of *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquifaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 1142-1146.
19. Maing IY, Ayres JC, Koehler PE. Persistence of aflatoxin during fermentation of soy sauce. *Appl Microbiol* 1973; 25: 1015-1017.
20. Marín S, Sanchis V, Rull F, Ramos AJ, Magan N. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *J Food Prot* 1998; 61: 1489-1496.
21. Yoshizawa T, Yamashita A, Chokethaworn N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit Contam* 1996; 13: 163-168.
22. Marín S, Sanchis V, Sanz D, et al. Control of growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates in moist maize with propionate preservatives. *Food Addit Contam* 2000 (enviado).
23. Marín S, Magan N, Abellana M, Canela R, Ramos AJ, Sanchis V. Selective effect of propionates on maize mycoflora and impact on fumonisin B₁ accumulation. *J Stored Prod Res* 2000 (enviado).
24. Coll L, Bota E, Carbo R, Gordun E, Sancho J. Limitaciones a la eficacia de los fungicidas utilizados en el ensilado del maíz. *Alimentación, equipos y tecnología* 1994; 12: 95-99.
25. Lee SJ, Hanna MA, Bullerman LB. Carbon dioxide and aflatoxin production in high-moisture corn treated with potassium sorbate. *Cereal Chem* 1986; 63: 82-85.
26. Wilson TM, Ross PF, Owens DL, et al. Experimental reproduction of ELEM—a study to determine the minimum toxic dose in ponies. *Mycopathologia* 1992; 117: 115-120.
27. Miller MA, Honstead JP, Lovell RA. Regulatory aspects of fumonisins with respect to animal feed. En: Jackson LS, Devries JW, Bullerman LB (Eds.) *Fumonisin in food*. New York, Plenum Press, 1996: 363-368.
28. Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liquid Chromat* 1990; 13: 2077-2087.
29. Velazquez C, van Bloemendal C, Sanchis V, Canela R. Derivation of fumonisins B₁ and B₂ with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1535-1537.
30. Norred WP, Voss KA, Bacon CW, Riley RT. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. *Food Chem Toxicol* 1991; 29: 815-819.
31. Sydenham EW, Stockenstrom S, Thiel PG, Shephard GS, Koch KR, Marasas WFO. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 1198-1201.
32. Viljoen JH, Marasas WFO, Thiel PG. Fungal infection and mycotoxin contamination of commercial maize. En: Taylor JRN, Randall PG, Viljoen JH (Eds.) *Cereal Science and Technology: Impact on a changing Africa*. Pretoria, CSIR, 1993: 837-853.
33. Sydenham EW, van der Westhuizen L, Stockenstrom S, Thiel PG. Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. *Food Addit Contam* 1994; 11: 25-32.
34. Canela R, Pujol R, Sala N, Sanchis V. Fate of fumonisins B₁ and B₂ in steeped corn kernels. *Food Addit Contam* 1996; 13: 511-517.
35. Scott PM, Lawrence GA. Analysis of beer for fumonisins. *J Food Prot* 1995; 58: 1379-1382.
36. FAO. Food and Nutrition Paper 64. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. Rome, 1997.