



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

INFLUENCIA DE FACTORES AGRONÓMICOS SOBRE
LA CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS EN MAÍZ

INFLUENCE OF AGRONOMIC FACTORS ON
MYCOTOXIN CONTAMINATION IN MAIZE

Autor

Aitor Ponciano López Soroa

Directores

Agustín Ariño Moneva
Marta Herrera Sánchez

Facultad de Veterinaria

2017

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, que me han apoyado durante todo el año y me han animado para terminar lo mejor y más cómodamente posible.
- A Agustín Ariño, Marta Herrera y Noemi Bervis, que me han ayudado en todo lo posible y ante cualquier duda que he tenido durante mis horas en el laboratorio así cómo en la realización del trabajo escrito con mucha paciencia.
- A Monsanto y a la Estación Experimental Aula Dei, por proporcionarme las muestras necesarias para realizar todos los análisis para poder terminar este trabajo.
- Al Grupo Consolidado de Investigación DGA A01 (Gobierno de Aragón-FEDER) “Análisis y evaluación de la seguridad alimentaria” por la financiación de este trabajo y al proyecto AGL2014-57069-R del MINECO-FEDER.
- Al resto de profesores del Máster, ya que a pesar de tenerme tantos años durante la carrera siempre estaban ahí para resolver cualquier duda que pudiera tener en sus asignaturas.
- A mis compañeros del Máster, ya que a algunos los conocía de la carrera y a otros no, pienso que hemos creado un grupo variado y con el que he pasado ratos muy agradables que no olvidaré.
- Al resto de amigos de la Facultad y a los de toda la vida, ya que siguen a mi lado por mucho que pasen los años, festejando como sólo ellos saben.

ÍNDICE

1. Resumen.....	5
1.1. Resumen.....	5
1.2. Abstract.....	6
2. Introducción.....	7
2.1 Maíz.....	7
2.1.1. Importancia a nivel mundial.....	8
2.1.2 Maíz Bt genéticamente modificado.....	8
2.2. Micotoxinas.....	9
2.2.1. Importancia de las micotoxinas para la salud humana y animal.....	9
2.2.2. Estabilidad y persistencia.....	10
2.3. Micotoxinas de Fusarium.....	10
2.3.1. Deoxinivalenol (DON).....	11
2.3.2. Fumonisinias (FUM).....	12
2.3.3. Incidencia en Europa.....	14
2.4. Tendencias en el control de micotoxinas.....	15
2.5 Factores de riesgo agronómicos y climáticos que favorecen la aparición de DON y FUM en maíz.....	16
2.5.1. Factores climáticos.....	17
2.5.2. Elección de la variedad.....	17
2.5.3. Residuos de cosechas anteriores y labranza.....	17
2.5.4. Riego.....	18
2.5.5. Cosecha.....	18
2.5.6. Transporte y almacenamiento.....	19
3. Objetivos del estudio.....	20
4. Metodología.....	21
4.1. Muestras.....	21
4.2. Extracción y determinación de micotoxinas mediante inmunocromatografía de flujo lateral.....	22
4.3. Análisis estadístico.....	24
5. Resultados y discusión.....	25

5.1. Resultados Monsanto.....	25
5.1.1. Análisis descriptivo y comparativo.....	26
5.2. Resultados Aula Dei.....	33
5.2.1. Análisis descriptivo y comparativo.....	34
5.3. Medidas de prevención y control.....	38
5.3.1. Tratamientos de reducción en fumonisinas.....	38
5.3.2. Tratamientos de reducción en deoxinivalenol.....	38
5.3.3. Prevención y control según resultados.....	39
6. Conclusiones.....	40
7. Bibliografía.....	42

1. RESUMEN

1.1 RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre la influencia de algunos factores agronómicos sobre las tasas de micotoxinas de *Fusarium* en maíz. Tras una revisión bibliográfica sobre el tema, se procedió a la preparación de las muestras y al análisis de micotoxinas por técnicas basadas en inmunocromatografía de flujo lateral. Posteriormente se realizó el análisis e interpretación de los resultados con ayuda de programas estadísticos, que permitieron comparar mediante diferentes parámetros (test ANOVA, análisis de correlación) las distintas muestras analizadas. Se analizaron un total de 88 muestras, de las cuáles, 70 procedían de la empresa Monsanto (campos de ensayo de Navarra y Gerona) y 18 de la Estación Experimental Aula Dei (CSIC, Zaragoza). Las micotoxinas estudiadas fueron deoxinivalenol (DON) y fumonisinas (FUM), ambas producidas por especies del género *Fusarium*, ya que se trata de dos micotoxinas relevantes en nuestro entorno que pueden afectar al maíz en la fase de precosecha.

En los resultados de Monsanto se obtuvieron en las muestras de Gerona una media de 0,51 mg/kg de DON y 1,30 mg/kg de FUM y en las de Navarra 3,13 mg/kg de DON y 0,57 mg/kg de FUM, con una positividad superior al 50%. En las muestras de Aula Dei la media fue de 0,4 mg/kg DON y 7,6 mg/kg FUM. El valor máximo de DON (9,16 mg/kg) se obtuvo en una muestra de Navarra, mientras el de FUM (15,94 mg/kg) provenía de Gerona.

Las tasas de fumonisinas en maíz modificado genéticamente (0,47 mg/kg) fueron significativamente inferiores a las detectadas en maíz convencional (1,54 mg/kg), mientras que las concentraciones de DON no mostraron diferencias significativas. La variedad de maíz mostró gran influencia en las tasas de micotoxinas, ya que el maíz de ciclo FAO 600 tuvo una gran susceptibilidad a fumonisinas ($p < 0,05$), mientras que fue el maíz más resistente a DON. Asimismo, el riego por aspersión incrementó significativamente la concentración de DON en comparación con el riego a pie o manta. Finalmente, los resultados se compararon con los contenidos máximos establecidos por la legislación vigente en lo relativo a las concentraciones de micotoxinas y se propusieron medidas de prevención y control del riesgo por dichos contaminantes en el maíz.

1.2 ABSTRACT

A study has been carried out on the influence of some agronomic factors on *Fusarium* mycotoxin rates in maize. After a bibliographic review on the subject, samples were prepared and mycotoxins were analyzed by techniques based on lateral flow immunochromatography. Subsequently, the analysis and interpretation of the results were carried out with the help of statistical programs, which allowed to compare the different samples analyzed using different parameters (ANOVA test, correlation analysis). A total of 88 samples were analyzed, of which 70 came from Monsanto (Navarra and Gerona test fields) and 18 from the Aula Dei Experimental Station (CSIC, Zaragoza). The mycotoxins studied were deoxynivalenol (DON) and fumonisins (FUM), both produced by species of the genus *Fusarium*, since these are two mycotoxins relevant in our environment that can affect the corn in the pre-harvest phase.

In Monsanto's results, mean values of 0.51 mg/kg DON and 1.30 mg/kg FUM were obtained in the Gerona samples and in Navarre's samples 3.13 mg/kg DON and 0.57 mg/kg FUM, respectively, with a positivity greater than 50%. In the Aula Dei samples the mean was 0.4 mg/kg DON and 7.6 mg/kg FUM. The maximum value of DON (9.16 mg/kg) was obtained in a sample from Navarra, while that from FUM (15.94 mg/kg) came from Gerona.

The rates of fumonisins in genetically modified maize (0.47 mg/kg) were significantly lower than those found in conventional maize (1.54 mg/kg), whereas DON concentrations showed no significant differences. The maize variety showed great influence on the mycotoxin rates, since the FAO cycle 600 maize had a high susceptibility to fumonisins ($p < 0.05$), while this maize was more resistant to DON. Also, sprinkler irrigation significantly increased the concentration of DON compared to surface or flood irrigation.

Finally, the results were compared with the maximum levels established by the current legislation on mycotoxin concentrations and measures were proposed for the prevention and control of the risk of these contaminants in maize.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 MAÍZ

El maíz (*Zea mays*) es uno de los muchos cereales que se utilizan como fuente alimenticia, como forraje y en productos procesados para la industria. La producción mundial puede alcanzar 1000 millones de toneladas/año y en algunos países el maíz puede llegar a aportar más de un tercio de las calorías y proteínas (Chulze, 2010).

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera, o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. La fase vegetativa consta de dos ciclos. En el primero se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente. En este ciclo, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. En el segundo ciclo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción; este ciclo acaba con la emisión de los estigmas.

La segunda fase, también llamada fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor; durante la segunda etapa, el peso de los granos aumenta con rapidez (Tanaka y Yamaguchi, 1972).

La planta desarrolla características y diferencias morfológicas en las fases vegetativa y de reproducción como consecuencia de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han adaptado a zonas ecológicas concretas, desarrollando características particulares, como por ejemplo la sensibilidad con respecto a la duración del día y a la temperatura, que limitan su adaptabilidad a zonas con diferente latitud y altitud. Por tanto, se deben realizar programas de mejora en las zonas en que se van a cultivar las variedades seleccionadas. La morfología o arquitectura de la planta también ha sido objeto de presiones de evolución que han dado lugar a una gran variabilidad del número, la longitud y la anchura de las hojas, así como de la altura de las plantas, los lugares en que aparecen las mazorcas, el número de éstas por planta, los ciclos de maduración, los tipos de granos y el número de hileras de granos, entre otras muchas características (FAO, 1993).

Otro parámetro importante a tener en cuenta en el cultivo de maíz es la denominación del Ciclo FAO (López y de la Cruz, 2013; FAO 2016), que determina el número de días

transcurridos desde el nacimiento hasta alcanzar la madurez fisiológica, cuando el grano contiene el máximo de materia seca acumulable (Llanos, 1984).

2.1.1 Importancia a nivel mundial

El maíz es uno de los principales cultivos a nivel mundial con una producción total de 820 millones de Tm/año en 2008 (FAO, 2016), cantidad que ha ido aumentando en estos últimos años, alcanzando los 1073 millones de Tm/año en la cosecha 16/17. Según las últimas estadísticas de la FAO, su mayor productor es EE.UU., seguido de cerca por China y otros países como Brasil, México, Argentina, India e Indonesia. España ocupa el puesto veintisiete en el ranking de países productores a nivel mundial pero es el noveno en el ámbito de Europa. En cuanto a nuestro país, las principales comunidades autónomas productoras de maíz son Castilla y León, con más de un 25% de la producción total, siguiéndoles Extremadura y Aragón con un 15 y un 25%, respectivamente. Otras comunidades autónomas con producciones destacables son: Castilla la Mancha (10-15%), Andalucía y Cataluña (5-10%) y Galicia, Navarra y Madrid, con producciones inferiores a un 5% (Consejo Internacional de Cereales, 2017).

2.1.2 Maíz Bt genéticamente modificado

El maíz Bt introducido por Monsanto en 1997 es una planta genéticamente modificada (OMG) que utiliza un gen de *Bacillus thuringiensis* (Baktavachalam et al, 2015), una bacteria presente en los suelos, que produce proteínas que son tóxicas para ciertas plagas del maíz, como el taladro (*Sesamia* y *Ostrinia*), pero no afectan a otras especies relacionadas que no desean tratarse, incluidos los humanos, animales e insectos benéficos. Las proteínas Bt son el ingrediente activo que se ha utilizado por más de 50 años en muchos plaguicidas microbianos para sistemas de agricultura convencional y ecológica.

El taladro del maíz es un insecto lepidóptero que se alimenta de la planta y produce cavidades donde los hongos pueden crecer y producir micotoxinas, especialmente fumonisinas. Los niveles de fumonisinas se reducen significativamente en el grano de maíz Bt, debido a que las plagas de taladro son destruidas por las proteínas insecticidas,

reduciendo así el daño a la planta y evitando en forma muy significativa el crecimiento de hongos y el nivel de micotoxinas (Serra et al, 2006).

La segunda generación de maíz Bt contiene otras proteínas Bt que protegen contra una mayor variedad de insectos plaga, que incluye el taladro del tallo y otros. Estos productos deberían reducir los niveles tanto de fumonisinas como de aflatoxinas en los granos de maíz, gracias a su más amplio control de plagas de gusanos que se alimentan de las mazorcas (Monsanto, 2006).

2.2 MICOTOXINAS

Existen múltiples tipos de hongos que van desde los típicos hongos que se pueden ver crecer en los bosques y campos hasta aquellas especies microscópicas que pueden infectar cultivos en el campo o durante su almacenamiento. La mayoría de estas especies viven sobre la materia orgánica en descomposición y su presencia contribuye a estos procesos, mientras que otros hongos pueden ser causa de enfermedades en las plantas.

Dentro del mundo de los hongos, nos encontramos los hongos microscópicos, de los cuales destacan por su importancia los mohos. Estos microorganismos pueden ser muy beneficiosos para el hombre como fuente de nutrientes o como fuente de antibióticos y otros compuestos químicos de interés.

El término “micotoxina” normalmente está reservado a los productos químicos tóxicos producidos por unas pocas especies de mohos con capacidad para infestar cosechas en el campo o después de la cosecha y que representan un riesgo potencial para la salud de las personas y los animales a través de la ingestión de alimentos o piensos elaborados a partir de dichas materias primas (MAPAMA, 2015).

2.2.1 Importancia de las micotoxinas para la salud humana y animal

Las micotoxinas pueden ser causa de diversos tipos de efectos adversos para la salud debido a las diferentes estructuras químicas que las diferencian unas de otras. Para que se presenten intoxicaciones agudas por micotoxinas es necesario que éstas estén presentes en los alimentos en altas dosis, por lo que este tipo de afecciones se dan

principalmente en países menos desarrollados, donde los recursos para su control son muy limitados. Por otro lado, los efectos o enfermedades crónicas son preocupantes para la salud de la población a largo plazo y son importantes porque se producen a mucha menor dosis. Algunas de las micotoxinas más comunes son carcinogénicas, genotóxicas, o pueden afectar a los sistemas renal, hepático o inmunitario.

Tanto las organizaciones nacionales como de ámbito internacional, están constantemente evaluando el riesgo que las micotoxinas representan para el ser humano. Para algunas micotoxinas, estos estudios han llevado al establecimiento de límites máximos legales tanto a nivel europeo como mundial.

Ciertas condiciones ambientales, así como las malas prácticas agrícolas, de fabricación, almacenamiento y secado de los granos y forrajes, promueven el crecimiento de los hongos, lo que aumenta el riesgo de la producción de micotoxinas (Marín et al, 2013)

2.2.2 Estabilidad y persistencia

La mayoría de las micotoxinas son químicamente estables y tienden a permanecer en los alimentos durante el almacenamiento y el procesado de éstos incluso cuando dichos productos son cocinados a altas temperaturas (por ejemplo, durante el horneado de productos de panadería o la elaboración de cereales de desayuno) (Samar, 2003). Este hecho hace aún más importante el reforzar tanto como sea posible la prevención para evitar las condiciones que favorecen la formación de micotoxinas. Esto es difícil de conseguir cuando se trata de cultivos sometidos a determinadas condiciones meteorológicas. Una vez que los cereales han sido recolectados, se debe prevenir el desarrollo de mohos y la formación de micotoxinas durante el almacenamiento y transporte, aunque a veces esto no sea posible conseguirlo en la práctica (MAPAMA 2015).

2.3 MICOTOXINAS DE FUSARIUM

Los hongos del genero *Fusarium* son hongos comunes de suelo y la materia vegetal. Suelen encontrarse en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia, y algunos de los que producen toxinas son capaces de producir, en mayor o menor grado, dos o más de ellas (aflatoxina, ocratoxina, zearalenona, deoxinivalenol y

fumonisina). Las micotoxinas de *Fusarium* están muy distribuidas por la cadena alimentaria, siendo los productos elaborados con cereales, especialmente trigo y maíz, las principales fuentes de ingesta alimentaria de esas toxinas.

Las especies del género *Fusarium*, por lo general, infectan el grano antes de la cosecha. Se han identificado varios factores de riesgo en relación con la infección de *Fusarium* y la formación de micotoxinas en los granos de cereal. Las condiciones climáticas durante el crecimiento de la planta, en particular en el momento de la floración, influyen mucho en el contenido de micotoxinas; sin embargo, las buenas prácticas agrícolas, mediante las cuales se reducen al máximo los factores de riesgo, pueden prevenir, hasta cierto punto, la contaminación por hongos del género *Fusarium*.

Debido a su amplia distribución en la cadena alimentaria, para proteger la salud pública es importante que se establezcan contenidos máximos en relación con los cereales no elaborados, a fin de evitar que entren en la cadena alimentaria cereales muy contaminados y de fomentar y garantizar que se tomen todas las medidas necesarias durante las fases de cultivo, recolección y almacenamiento dentro de la cadena de producción (aplicando buenas prácticas agrícolas, de recolección y de almacenamiento). La limpieza y la transformación pueden hacer que el contenido de toxinas de *Fusarium* de los cereales en bruto se reduzca en diverso grado en los productos elaborados a base de cereales (MAPAMA, 2015).

2.3.1 Deoxinivalenol (DON)

El deoxinivalenol, también conocido como DON o vomitoxina, pertenece a la familia de los tricotecenos, metabolitos que son producidos por una serie de especies del género *Fusarium* y algunos otros mohos (Elika, 2013a).

El DON casi siempre se forma en los cultivos antes de su cosecha, cuando las espigas y mazorcas, todavía en flor, son infestadas por determinadas especies de *Fusarium*, como *F.graminearum* y *F.culmorum*. Estas dos especies de hongos son importantes patógenos para las plantas y, en cereales son los responsables de las fusariosis de la espiga de trigo (espiga blanca) y del maíz (Canady et al, 2001).

El deoxinivalenol es térmicamente muy estable, por lo que una vez formado es probable que persista durante el almacenamiento e ingrese en la cadena alimentaria.

Desde el punto de vista físico-químico, el DON es uno de los tricotecenos más polares. Es soluble en agua y en disolventes polares como el metanol y el acetonitrilo. De su

estructura química deriva su absorbancia de luz ultravioleta, lo que permite su detección por técnicas cromatográficas con detectores apropiados. En cereales contaminados el DON puede aparecer acompañado de sus metabolitos 3-acetil-deoxinivalenol y 15-acetil-deoxinivalenol.

Toxicidad e importancia: Es difícil poder relacionar los efectos observados en experimentación en laboratorios con los efectos reales de una intoxicación, ya que en situaciones de intoxicación real por ingesta de producto contaminado con DON normalmente aparece acompañado de otros tricotecenos (nivalenol, toxina T-2 y HT-2) (Trombete et al, 2013).

En cualquier caso, la intoxicación aguda por DON estudiada en animales como los cerdos se caracteriza por la aparición de vómitos (de ahí la denominación común como vomitoxina). Los animales rechazan el pienso, pierden peso y presentan diarrea. La intoxicación aguda puede llegar a producir necrosis en diversos tejidos, como aquellos correspondientes al tracto gastrointestinal y al sistema linfático (Dugyala et al, 1996).

La IARC (International Agency for Research on Cancer) define al deoxinivalenol como no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para la especie humana, y lo incluye en el Grupo 3.

Estabilidad y persistencia: El deoxinivalenol es térmicamente estable por lo que es muy difícil su eliminación de los cereales una vez formado. Durante la molienda del trigo se produce una separación de sus capas externas y el DON tiende a concentrarse en salvado y germen alcanzando mayores niveles que en el endospermo (Codex Alimentarius, 2007). En consecuencia, la concentración de DON en la harina es menor que en el grano de partida. Es decir, se produce una redistribución de la toxina entre las diferentes partes resultantes de la molienda del grano. Dado que el deoxinivalenol es soluble en agua, se podría lograr una importante reducción de su contenido mediante el lavado del cereal, pero desde el punto de vista comercial esto representaría una fase adicional en la cadena y un problema con el efluente (Elika, 2013c).

2.3.2 Fumonisin (FUM)

Las fumonisin son un grupo de al menos 15 micotoxinas estrechamente relacionadas (por su estructura química) que se presentan frecuentemente en el maíz. De todo este

grupo, las más relevantes son la fumonisina B1, B2 y B3 (teniendo en cuenta que las que están legisladas son la suma de B1 y B2), siendo la fumonisina B1 la más importante por producir leucoencefalomalacia equina, síndrome pulmonar porcino y toxicidad hepática en aves (FAO 2003).

Las fumonisinas son metabolitos polares producidos por varias especies del género *Fusarium*, entre las cuales están: *F.verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F.anthophilum*, *F.dlamini* y *F.napiforme*.

Es frecuente que las fumonisinas se presenten junto con otras micotoxinas, como por ejemplo, aflatoxinas.

Como se ha señalado anteriormente, las fumonisinas por su estructura química son compuestos polares, por lo que son solubles en solventes polares.

Por otro lado, su insolubilidad en gran número de solventes orgánicos como por ejemplo el cloroformo y el hexano, comúnmente usados en los análisis de micotoxinas, explica lo complicado de su identificación inicial.

Toxicidad e importancia: Los efectos de las fumonisinas se han podido observar durante años en forma de una enfermedad mortal en caballos denominada “leucoencefalomalacia equina”.

Si comparamos la toxicidad de las fumonisinas con las aflatoxinas en base únicamente a la dosis necesaria para producir una intoxicación aguda, las fumonisinas están bastante lejos de la capacidad tóxica de las aflatoxinas, pero lo que ocurre es que las fumonisinas en el maíz pueden llegar a alcanzar concentraciones muy elevadas, superiores incluso a los 300 mg/kg (MAPAMA, 2015).

La toxicidad de las fumonisinas se debe principalmente a sus efectos sobre la síntesis en el organismo de los esfingolípidos de las neuronas. Además, las alteraciones en la síntesis de estos esfingolípidos se producen casi de forma inmediata tras la ingestión de producto contaminado con fumonisinas.

El tipo de micotoxina que representa mayor riesgo para la salud humana dentro de las fumonisinas es la fumonisina B1, que pueden causar cáncer de hígado, cáncer de esófago, alteraciones en el sistema inmune, entre otras patologías (López Naranjo, 2013). Si bien se necesitan más datos y estudios para clarificar la relación entre la presencia de *F. verticillioides* y sus metabolitos y su incidencia en el desarrollo de cáncer de esófago en Transkei, China y el norte de Italia, donde la incidencia es alta.

Según la IARC, las fumonisinas de tipo B1 pertenecen al Grupo 2B (posible cancerígeno para humanos) (IARC, 2002).

Estabilidad y persistencia: Durante el procesado del maíz, las partes resultantes de los procesos de limpieza se ha demostrado que contienen altos niveles de fumonisinas y su retirada puede ayudar a reducir la concentración global. La molienda en seco del maíz tiene como consecuencia una distribución de los contenidos en fumonisinas en las diferentes fracciones que se obtienen de la molienda, de modo que la concentración resultante en el salvado es mayor que la concentración original en el maíz de partida, mientras que las concentraciones resultantes en otras fracciones pueden ser menores (GLM, 2007).

En las moliendas vía húmeda en forma experimental, se han detectado fumonisinas en los restos de agua, en el gluten, la fibra y el germen, pero no en el almidón (EMAN, 2007). La migración de la fumonisinas al agua durante la molienda del maíz en vía húmeda es por tanto una manera efectiva de reducir las concentraciones de fumonisinas en los productos molidos debido a su elevada polaridad.

Las fumonisinas son bastante estables y no se destruyen por acción de calor moderado. En cualquier caso, se detectan menores concentraciones de fumonisinas en la harina de maíz utilizada para hacer las típicas tortillas, ya que esta se somete a un tratamiento con hidróxido cálcico (nixtamalización), lo cual sugiere que este tipo de proceso degrada las fumonisinas. También se ha comprobado que el tratamiento con calor a altas temperaturas produce una reducción en la concentración de fumonisinas de alrededor del 80%. En cualquier caso, es necesario realizar más estudios en torno a la reducción de fumonisinas, ya que los metabolitos resultantes de su degradación podrían resultar tan tóxicos como las propias fumonisinas de partida (MAPAMA, 2015).

2.3.3 Incidencia en Europa

Los resultados del último Estudio sobre Micotoxinas de BIOMIN sobre un muestreo de cereales durante 2013 indican que las fumonisinas son las toxinas más frecuentes a nivel europeo, con un 90% de los resultados positivos, frente al 61% de deoxinivalenol, cuyos valores medios alcanzaron 1,69 mg/kg de FUM y 0,53 mg/kg de DON.

También cabe destacar que el maíz es la materia prima donde mayor incidencia tienen estas micotoxinas en comparación a otras materias primas (ANSES, 2009).

El contenido máximo de DON para consumo animal es de 12 mg/kg (así como para consumo humano sería de 1,75 mg/kg a excepción del destinado a molienda por vía húmeda) (Reglamento (CE) No 1881/2006). Para los estudios de evaluación de riesgo, se ha establecido una ingesta diaria tolerable provisional de 1 µg DON/kg de peso corporal por día (OMS, 2002).

El contenido máximo de FUM para consumo animal es de 60 mg/kg (así como para consumo humano sería de 4 mg/kg para consumo humano a excepción del destinado a molienda por vía húmeda) (Reglamento (CE) No 1881/2006). Se ha establecido una ingesta diaria tolerable provisional de 2 µg FUM/kg de peso corporal por día (OMS, 2002).

2.4 TENDENCIAS EN EL CONTROL DE MICOTOXINAS

Uno de los problemas de gran interés que afecta al consumidor hoy en día es la presencia de micotoxinas en piensos, ya que éstas pueden transferirse a los productos de origen animal (carne, leche, huevos) del ganado alimentado con piensos contaminados. Por tanto, dado que la alimentación animal constituye el primer eslabón de la cadena alimentaria, la obtención de alimentos seguros dependerá del cumplimiento de la legislación aplicable por parte de los fabricantes así como del uso de piensos seguros por parte de los ganaderos, tanto en composición como frente al riesgo de contaminación durante su almacenamiento.

Además de las buenas prácticas agrícolas para intentar disminuir el efecto de las micotoxinas en piensos se ha propuesto el empleo de compuestos secuestrantes o detoxificantes (considerados como nueva categoría de aditivos), que reducen la absorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal del animal (adsorbentes) o que modifican su estructura (biotransformadores). Los primeros (distintos tipos de arcillas y silicatos) están más extendidos y testados que los segundos (enzimas o microorganismos capaces de detoxificar algunas micotoxinas). No obstante, las diversas propiedades de las micotoxinas hacen que un adsorbente pueda ser eficaz contra una micotoxina pero no contra el resto.

Cabe además destacar que el metabolismo de algunas plantas (que poseen mecanismos naturales de detoxificación) y el procesado de alimentos, pueden dar lugar a compuestos conjugados conocidos como micotoxinas enmascaradas o modificadas, que presentan generalmente comportamientos químicos muy diferentes a las micotoxinas de origen, no siendo detectadas en los análisis de rutina. Este fenómeno ocurre fundamentalmente en las toxinas de *Fusarium* (tricotecenos, zearalenona (ZEA) y fumonisinas), aunque se han descrito también para otras micotoxinas.

Otro aspecto de gran interés es la evaluación de la presencia en los alimentos de las llamadas micotoxinas emergentes derivadas de hongos del género *Fusarium*, como fusaproliferina, moniliformina, beauvericina y eniatinas, cuya presencia es frecuente en alimentos procedentes del norte de Europa y países del Mediterráneo. A diferencia de otras micotoxinas mucho más estudiadas, actualmente no existen contenidos máximos permitidos para estas micotoxinas debido fundamentalmente a la escasez de datos relacionados con su presencia en alimentos, nivel de contaminación y toxicidad. Aunque no hay descritos casos de micotoxicosis debidos a la ingesta de estas micotoxinas, algunos estudios (la mayoría in vitro) revelan la posible toxicidad de estos compuestos, que podría verse aumentada como consecuencia de la interacción de varias micotoxinas presentes en el mismo alimento. En este sentido la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha emitido diversos informes sobre su posible riesgo en alimentos y piensos. Es por ello que, con el fin de evaluar mejor el riesgo que suponen para la salud pública estas micotoxinas emergentes, será necesario disponer de métodos analíticos sensibles y selectivos para distintas matrices de alimentos (Arroyo-Manzanares et al., 2014).

2.5 FACTORES DE RIESGO AGRONÓMICOS Y CLIMÁTICOS QUE FAVORECEN LA APARICIÓN DE DON Y FUM EN MAÍZ

Son muchos los factores que intervienen en el proceso de proliferación fúngica y de la contaminación con micotoxinas de las materias primas y alimentos. Los principales factores son: temperatura y humedad, prácticas agronómicas, la susceptibilidad del cultivo y de la variedad de que se trate, la madurez de los granos en el momento de la cosecha, los daños mecánicos o los producidos por insectos y/o pájaros sobre el cereal y las condiciones de almacenamiento.

Una adecuada aplicación de técnicas de cultivo, recolección y almacenamiento puede contribuir a la prevención y reducción de la presencia de micotoxinas en los alimentos (MAPAMA, 2015).

2.5.1 Factores climáticos

La incidencia y severidad de las enfermedades fúngicas varían mucho según los años y las distintas ubicaciones de los cultivos. El efecto del clima es clave durante el periodo vegetativo de los cultivos y por ello se puede explicar la variación de la contaminación de las cosechas con micotoxinas entre diferentes años. Durante el periodo crítico comprendido entre la floración y la cosecha, son los más susceptibles a la infección por mohos y producción de micotoxinas, por ello un elevado grado de humedad entre la floración y la cosecha favorece la presencia de micotoxinas (Ariño et al. 2015).

2.5.2 Elección de la variedad

Para la elección de las variedades de trigo y maíz, es importante cultivar, siempre que sea posible, variedades de semillas desarrolladas especialmente para resistir a los hongos que podrían infectarlas y a las plagas de insectos. En cada zona de un país sólo se deberían plantar las variedades de semillas recomendadas para esa zona concreta.

Según la Recomendación sobre la prevención y la reducción de las toxinas de *Fusarium* en los cereales y los productos a base de cereales (Recomendación 2006/583/CE) deben elegirse las variedades más adecuadas para las condiciones del suelo y climáticas y para las prácticas agronómicas habituales. Esto reducirá el estrés causado a las plantas, consiguiendo con ello que el cultivo sea menos sensible a los ataques fúngicos.

La elección de la variedad en función de su tolerancia a la infección por *Fusarium* también ha de basarse en el riesgo de infección (EFSA, 2013).

2.5.3 Residuos de cosechas anteriores y labranza

En nuestro laboratorio hemos observado un descenso del contenido en fumonisinas en maíz dependiendo del tipo de arado, variando de 534 ± 237 µg/kg para campos con una labranza mínima a 490 ± 230 µg/kg para campos que fueron totalmente labrados. El uso de un laboreo mínimo, o incluso la siembra directa sin labrar la tierra, en lugar de un

laboreo completo después de una cosecha de maíz podría resultar en un aumento de hasta 10 veces en la contaminación por deoxinivalenol en la cosecha de trigo que se plantara después. La eliminación del residuo del cultivo anterior resulta en una reducción significativa de los niveles de fumonisina ($249 \pm 216 \mu\text{g/kg}$) en comparación con los campos en los que fueron incorporados los residuos ($683 \pm 239 \mu\text{g/kg}$) (Ariño et al, 2008).

2.5.4 Riego

Cerciorarse de que se aplica de manera uniforme y de que todas las plantas del campo reciben un suministro de agua adecuado. El riego es un método útil para reducir el estrés de las plantas en algunas situaciones de crecimiento. Las precipitaciones excesivas durante la antesis (floración) crean condiciones favorables para la diseminación e infección por *Fusarium spp*; por consiguiente, se debería evitar el riego durante la antesis y la maduración de los cultivos (Codex Alimentarius, 2003).

Es prioritario 15 días antes y 15 días después de la floración, evitar el estrés hídrico que facilita la producción de micotoxinas (Elika, 2017).

El tipo de riego no parece afectar mucho a los niveles de fumonisinas en maíz, ya sea por riego a manta ($508 \pm 219 \mu\text{g/kg}$) o por aspersión ($555 \pm 275 \mu\text{g/kg}$). Aunque existe alguna evidencia de que la infección del maíz puede ocurrir por el agua que salpica el material transmitido por el suelo sobre las plantas durante la floración (Ariño et al, 2008).

2.5.5 Cosecha

Si el momento de la recolección se retrasa por lluvias intensas, el impacto en la cosecha es más severo, sobre todo cuando las cosechas están afectadas por hongos.

En Francia, una vez se ha cosechado (a unos porcentajes de humedad similares o ligeramente superiores a los de España) se llevan a cabo las labores de limpieza del grano. En varios estudios se ha afirmado que la contaminación con micotoxinas se puede reducir hasta un 40% (AFSSA, 2006 y Gourdain, 2009).

2.5.6 Transporte y almacenamiento

Durante la recolección, es necesario comprobar el contenido de humedad en varios puntos de cada cargamento de grano recolectado, puesto que dicho contenido puede variar considerablemente dentro del mismo campo.

Una recomendación sería comprobar semanalmente la humedad y la temperatura del grano utilizando termosondas. Si aumenta la temperatura 0,5 °C o la humedad un 0,5% en una semana se pondrían en marcha los sistemas de ventilación (Cermeño y Pérez, 2014).

Los tiempos prolongados de almacenamiento en un ambiente con humedades elevadas, permite a los mohos formadores de toxinas crecer provocando un aumento del contenido las mismas (Buyukunal et al, 2010; Huong et al, 2016).

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Una de las condiciones que más influyen en la síntesis de micotoxinas son los factores agronómicos, acentuados por del cambio climático puede producir condiciones más favorables al crecimiento de mohos y síntesis de toxinas. Por todo ello, se han planteado los siguientes objetivos:

- Evaluar las tasas de contaminación por deoxinivalenol (DON) y fumonisinas (FUM) en muestras de maíz recién cosechado y relacionarlas con los factores agronómicos y la localización de los campos de ensayo.
- Analizar específicamente el efecto de la modificación genética del maíz sobre la susceptibilidad a las micotoxinas objeto del estudio.
- Estudiar el efecto de diferentes regímenes hídricos en el cultivo del maíz sobre la contaminación por micotoxinas.

Además del efecto del cambio climático, que influye en que en la última década se haya observado un aumento de micotoxinas presentes en los alimentos y piensos, es necesario llevar a cabo Buenas Prácticas Agrícolas para reducir la contaminación de micotoxinas en el cultivo, principalmente en plantación, cosecha, transporte y almacenamiento.

4. METODOLOGÍA

4.1 MUESTRAS

El estudio se ha llevado a cabo con muestras de maíz destinadas a la alimentación humana y animal. Se analizaron un total de 88 muestras de maíz, procedentes de la empresa Monsanto (n=70) y de la Estación Experimental Aula Dei (situada en Zaragoza) (n=18), las primeras se obtuvieron de diferentes localidades tanto de Navarra (Falces y Valtierra) como de Gerona (Fonolleres y Torroella de Montgri) (Tabla 1). Todas las muestras han sido obtenidas durante 2016 y 2017.

Para las muestras de Monsanto se ha tenido en cuenta la variedad de maíz (OMG o convencional), el Ciclo FAO (ya sea de 400 a 500 o de 600 a 700), el cultivo anterior (maíz o barbecho) en el terreno y el tipo de riego realizado (a pie o por aspersión), factores que pueden influir en la formación de las micotoxinas.

En el caso de las muestras procedentes de la Estación Experimental Aula Dei, se ha tenido en cuenta el tipo de riego (aspersión o en superficie) así como el tipo de siembra (directa sin labrar con o sin residuo o si se realiza laboreo convencional con uso del arado), factores que también influyen en la formación de micotoxinas.

Tabla 1. Número de muestras de maíz procedentes tanto de Monsanto (Navarra y Gerona) como de Aula Dei

Procedencia	Número de muestras
Gerona	46
Navarra	24
Aula Dei	18
Total	88

Las muestras se traían al laboratorio en unas bolsas correctamente etiquetadas, posteriormente se procedía al secado del grano en una estufa de desecación a 60°C hasta alcanzar un grado de humedad del 12%. El siguiente paso fue realizar la molienda de cada muestra con un molino de cereales, para su posterior almacenamiento en congelación evitando así el desarrollo de más micotoxinas.

La determinación de micotoxinas se ha realizado mediante un test de cribado basado en inmunocromatografía de flujo lateral en formato de tiras denominado: DON-V (Waters Corporation, Milford, MA., USA) y Fumo-V del fabricante VICAM® así como también se ha consultado la bibliografía científica (Song et al. 2014). Para realizar el análisis de ambas micotoxinas hay que llevar a cabo dos procedimientos muy parecidos pero con ciertas diferencias:

4.2 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS MEDIANTE INMUNOCROMATOGRAFÍA DE FLUJO LATERAL

Para realizar el análisis de DON:

1. Hay que escanear el código de barras del kit de análisis a temperatura ambiente para el lote de tiras que se esté utilizando.
2. Pesar 5 g de la muestra molida y colocarla en el tubo de extracción.
3. Medir 20 mL de agua destilada en una probeta y vaciar el agua en el tubo de extracción.
4. Cubrir el tubo de extracción y agitar en vortex la mezcla durante 2 minutos a máxima velocidad.
5. Filtrar con un papel de filtro VICAM el extracto dentro de un tubo de extracción limpio.
6. Transferir 100 μ L del extracto filtrado al vial de tiras de prueba. Agregar 1 mL de agua destilada y mezclar bien.
7. Transferir 100 μ L de diluyente DON-V a otro vial de tiras de prueba.
8. Utilizar la misma punta de pipeta y agregar 100 μ L del extracto de muestra diluido del paso 6 al vial del paso 7. Tapar el vial y mezclar bien agitando en vortex.
9. Transferir 100 μ L de solución del vial de tiras de prueba a la abertura circular en la tira DON-V (Figura 1) a razón de 1 gota por segundo.



Figura 1. Tira DON-V para realizar el análisis de DON

10. Dejar la tira de prueba durante 3 minutos a 25 °C en el incubador VICAM® (Waters Corporation, Milford, MA., USA).
11. Insertar la tira de prueba DON-V en el lector Vertu, VICAM® (Waters Corporation, Milford, MA., USA).
12. Pulsar la tecla del centro del lector para tomar el resultado, que viene expresado como concentración de deoxinivalenol en mg/kg.
13. Si la muestra se lee como “>Rango” (más de 10 mg/kg) transferir 100 µL del extracto de muestra diluida del paso 6 de un nuevo vial de tiras de prueba.
14. Agregar 100 µL de agua al mismo vial de tiras de prueba.
15. Transferir 200 µL del diluyente DON-V dentro del vial de tiras de prueba, mezclando bien (400 µL en total).
16. Multiplicar los resultados obtenidos de deoxinivalenol por 2.

Para la realización del análisis de FUM:

1. Escanear el código de barras del kit de prueba para insertar el tipo de muestra y tiras que se van a utilizar.
2. Pesar 5 gramos de muestra molida en un tubo de extracción.
3. Añadir 10 mL de metanol (MeOH) al 70% en agua destilada.
4. Agitar 2 minutos en rotatubos a máxima velocidad.
5. Filtrar el extracto en un recipiente de recogida limpio con un papel de filtro VICAM.
6. Transferir a un tubo eppendorf 100 µL del buffer Fumo-V.
7. Añadir 100 µL del extracto filtrado al tubo eppendorf.
8. Agitar en rotatubos.
9. Transferir 100 µL de la muestra diluida con buffer Fumo-V a la tira de Fumo-V.

10. Incubar 5 minutos a 22,5 °C en el incubador (Waters Corporation, Milford, MA., USA).
11. Insertar la tira Fumo-V en el lector Vertu, VICAM® (Waters Corporation, Milford, MA., USA).
12. Leer el resultado a los 5 minutos, que viene expresado como concentración de fumonisinas (suma de B1 y B2) en mg/kg.
13. Si la muestra está “>Rango”, o da valores por encima de 5 mg/kg, se transferir 100 µL de la muestra filtrada a un tubo eppendorf y se añaden 100 µL de MeOH al 70%.
14. Agitar en rotatubos.
15. Transferir 100 µL de la muestra diluida a otro tubo eppendorf y añadir 100 µL del buffer Fumo-V.
16. Agitar en rotatubos.
17. Transferir 100 µL de la muestra con buffer Fumo-V a la tira Fumo-V.
18. Incubar 5 minutos a 22,5°C.
19. Multiplicar los resultados de la suma de fumonisinas B1 y B2 (FB1+FB2) obtenidos por 2.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de los análisis de deoxinivalenol y fumonisinas de las muestras de maíz fueron sometidos a un análisis estadístico descriptivo y comparativo. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza (ANOVA) (PSPP, Versión 0.10.1) para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas mediante el valor-F y la significación ($p < 0,05$). Esto se realiza para saber qué factores son significativos y qué diferencias hay entre las distintas propiedades, como el tipo de cultivo anterior, el tipo de riego, si se trata de una variedad de grano que haya sido modificada genéticamente, la intensidad del riego así como el laboreo que haya sido realizado en el terreno y si se ha sembrado con o sin residuo de cosechas previas.

Todos estos factores hay que comprobar si se corresponden con los valores de micotoxinas obtenidos tanto de deoxinivalenol como de fumonisinas, para establecer si hay una relación directa y para estudiar posibles formas de evitar la formación de estas micotoxinas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESULTADOS MONSANTO

Tanto en los análisis de deoxinivalenol (DON) como de fumonisinas (FUM, suma de FB1+FB2) se encontraron resultados por encima del límite de detección (LOD) de la técnica de inmunocromatografía, que en ambos casos es de 0,20 mg/kg.

En el caso de las muestras de DON, más de la mitad (37 de las 70 muestras) presentaron niveles de contaminación a por encima del límite de detección de la técnica (Figura 2).

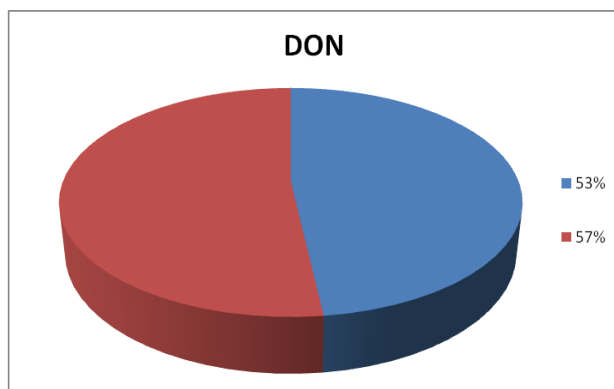


Figura 2. Porcentaje de muestras de DON por encima del límite de detección (LOD. 0.20 mg/Kg) (53%)

Ninguna de estas muestras analizadas supera el límite máximo de 12 mg/kg para consumo animal establecido en la legislación, aunque un total de 20 muestras (15 de Navarra y 5 de Gerona) superaron el límite máximo de 1,75 mg/kg para consumo humano (Reglamento (CE) No 1881/2006).

En cuanto a los análisis de FUM, hubo 2 muestras más por encima del límite de detección en comparación a las de DON (39 de 70 muestras), como se muestra en la siguiente gráfica (Figura 3).

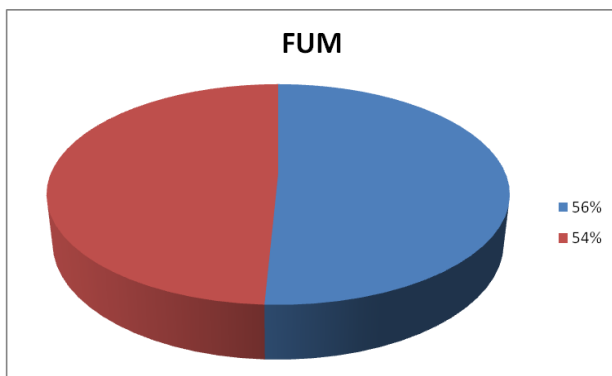


Figura 3. Porcentaje de muestras de FUM por encima del límite de detección (LOD: 0.20 mg/Kg) (56%)

Ninguna de estas muestras analizadas supera el límite máximo de fumonisinas de 60 mg/kg para consumo animal establecido en la legislación, aunque un total de 3 muestras (procedentes de Gerona) superaron el límite máximo de 4 mg/kg para consumo humano (Reglamento (CE) No 1881/2006).

Por comparación con estudios previos, en el trabajo realizado por Herrera et al (2010), se obtuvo una detección de FUM en la zona del Valle del Ebro del 48,3%, con concentraciones que van desde el límite de detección hasta 5,8 mg/kg, excediendo el límite máximo establecido para maíz no procesado sólo una de las muestras.

Estos resultados de positividad fueron semejantes a los obtenidos por Ariño et al (2008), en muestras de maíz del valle del Ebro (62,5%) siendo *F. verticillioides* el principal causante de esta contaminación en pre-cosecha.

5.1.1 Análisis descriptivo y comparativo

Como ya se indica en el apartado 4.1, las muestras analizadas proceden de Navarra y de Gerona (Tabla 2), dividiendo las muestras en 4 localidades distintas (Tabla 3), dos en Gerona (Fonolleres y Torroella de Montgri) y otras dos en Navarra (Falces y Valtierra).

Tabla 2. Número de muestras y media de resultados por provincia y tipo de micotoxina

Micotoxina	Provincia	Número de muestras	Media (mg/kg)
DON	Gerona	46	0,51
	Navarra	24	3,13
	Total	70	1,41
FUM	Gerona	46	1,30
	Navarra	24	0,57
	Total	70	1,05

Cabe destacar la alta incidencia del desarrollo de DON en Navarra en comparación con Gerona (3,13 mg/kg frente a 0,57 mg/kg), mientras que las fumonisinas fueron más altas en Gerona en relación con Navarra (0,51 mg/kg frente a 1,30 mg/kg), resultados que se analizarán más adelante.

Tabla 3. Número de muestras y media de resultados por localidad y tipo de micotoxina

Micotoxina	Localidad	Número de muestras	Media (mg/kg)
DON	Falces	7	1,73
	Fonolleres	31	0,74
	Torroella de Montgri	15	0,03
	Valtierra	17	3,71
	Total	70	1,41
FUM	Falces	7	1,10
	Fonolleres	31	1,47
	Torroella de Montgri	15	0,95
	Valtierra	17	0,35
	Total	70	1,05

De las 2 localidades de Navarra, la que hace que aumenten los resultados de DON es Valtierra en comparación con Falces (3,71 mg/kg frente a 1,73 mg/kg). Lo mismo ocurre entre las 2 localidades de Gerona aunque con menor incidencia en comparación

con el caso anterior (0,74 mg/kg frente a 0,03 mg/kg). Estos resultados pueden estar influenciados por varios factores, incluidos los climáticos.

Al ver estos resultados, se aprecia claramente que según en la localidad que nos encontremos sí que hay una diferencia significativa en el caso de los resultados de DON gracias al análisis estadístico de varianza ANOVA (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico ANOVA según localidad del campo de ensayo

Micotoxinas		Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Significación
DON	Entre grupos	132,99	4	44,33	15,50	0,001
	Intra grupos	188,78	66	2,86		
	Total	321,77	69			
FUM	Entre grupos	14,12	3	4,71	0,98	0,406
	Intra grupos	315,64	66	4,78		
	Total	329,76	69			

Al obtener una significación menor a 0,05 (0,001), factor que en el caso de FUM no ocurre, se produce una diferencia significativa en DON que nos indica que la localidad es un factor diferencial para el desarrollo de esta micotoxina.

Otro factor diferencial que se produce es si la muestra analizada procede de una variedad de maíz convencional o modificada genéticamente (OMG) (Tabla 5), para poder comprobar si tiene incidencia en los resultados obtenidos de micotoxinas.

Tabla 5. Número de muestras y media de resultados que son OMG y tipo de micotoxina

Micotoxina	Maíz	Número de muestras	Media (mg/kg)
DON	Convencional	38	1,17
	OMG	32	1,69
	Total	70	1,41
FUM	Convencional	38	1,54
	OMG	32	0,47
	Total	70	1,05

A simple vista y sin el análisis de varianza se puede apreciar que no tiene una influencia directa sobre la formación de DON, ya que tiene resultados muy parecidos (1,17 mg/kg frente a 1,69 mg/kg) aunque sí puede tenerla en la formación de FUM (1,54 mg/kg frente a 0,47 mg/kg) (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis estadístico ANOVA según el maíz sea OMG o convencional

Micotoxinas		Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Significación
DON	Entre grupos	4,58	1	4,58	0,98	0,325
	Intra grupos	317,18	68	4,66		
	Total	321,77	69			
FUM	Entre grupos	19,70	1	19,70	4,32	0,041
	Intra grupos	310,06	68	4,56		
	Total	329,76	69			

Tras realizar el test ANOVA vemos que si la muestra procede de una variedad modificada genéticamente no hay relación con la formación de DON, aunque cabe destacar que en el caso de FUM tiene influencia por obtener una significación menor de

0,05 (0,041), así que se puede afirmar que si las muestras son procedentes de una variedad modificada genéticamente (maíz Bt), disminuye el nivel de FUM que se produce. Con estos resultados se confirma que aquellas muestras de maíz OMG son menos susceptibles de estar contaminadas con fumonisinas, como ya afirmaron Bakan et al (2002) en países como Francia y España y Hammond et al (2004) en Estados Unidos.

Un factor a considerar es la diferencia en la formación de micotoxinas según el Ciclo FAO de la variedad de maíz (FAO, 2016):

En el caso de las muestras analizadas (Tabla 7), los ciclos utilizados son:

- Ciclo FAO 400 a 500: Ciclo corto o precoz
- Ciclo FAO 600 a 700: Ciclo medio

Aunque existen otros ciclos más extremistas utilizados en otros estudios:

- Ciclo FAO 200 a 300: Ciclo muy corto o muy precoz
- Ciclo FAO 800 a 900: Ciclo largo o tardío

Tabla 7. Número de muestras y media de resultados por Ciclo FAO y tipo de micotoxina

Micotoxina	Ciclo FAO	Número de muestras	Media (mg/kg)
DON	Ciclo 400	11	1,15
	Ciclo 500	8	1,82
	Ciclo 600	10	0,10
	Ciclo 700	41	1,72
	Total	70	1,41
FUM	Ciclo 400	11	1,03
	Ciclo 500	8	0,84
	Ciclo 600	10	3,00
	Ciclo 700	41	0,62
	Total	70	1,05

Hay un mayor número de muestras sobre las que se aplicó un Ciclo FAO 700 como se aprecia en la anterior tabla, con 41 de un total de 70. Se obtienen unos resultados de

DON que son bastante parecidos entre los ciclos salvo en el caso del Ciclo 600, que se obtienen valores muy bajos (0,10 mg/kg).

Valores que denotan una clara diferencia con los resultados obtenidos de FUM, ya que ocurre todo lo contrario, encontrando unos resultados mucho más altos en el Ciclo 600 (3,00 mg/kg) en comparación con los otros ciclos, por lo que es conveniente comprobar si estos resultados son estadísticamente significativos (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis estadístico ANOVA según Ciclo FAO del maíz

Micotoxinas		Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Significación
DON	Entre grupos	23,21	3	7,74	1,71	0,173
	Intra grupos	298,56	66	4,52		
	Total	321,77	69			
FUM	Entre grupos	45,78	3	15,26	3,55	0,019
	Intra grupos	283,98	66	4,30		
	Total	329,76	69			

Según estos resultados no podemos asegurar que haya una significación en cuanto a DON, ya que no es menor de 0,05, aunque sí se puede decir que hay una clara incidencia del ciclo del maíz sobre la susceptibilidad a FUM, sobre todo debido a los resultados obtenidos del Ciclo 600.

Un factor claramente diferencial es el tipo de riego que se realice (Tabla 9). En el caso de Navarra, todas las muestras (24) han estado bajo el tipo de riego por aspersión, a diferencia de las muestras de Gerona, que han recibido riego por aspersión (8) o riego a pie (38).

Tabla 9. Número de muestras y media de resultados por tipo de riego y tipo de micotoxina

Micotoxina	Tipo de riego	Número de muestras	Media (mg/kg)
DON	Aspersión	32	2,89
	Pie	38	0,16
	Total	70	1,41
FUM	Aspersión	32	0,56
	Pie	38	1,47
	Total	70	1,05

Estos resultados combinados muestran claramente qué tipo de riego favorece cada tipo de micotoxina para producir su formación, el caso más claro es la formación de DON si se produce riego por aspersión (2,89 mg/kg frente a 0,16 mg/kg) (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis estadístico ANOVA según riego

Micotoxinas		Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Significación
DON	Entre grupos	128,69	1	128,69	45,32	0,001
	Intra grupos	193,08	68	2,84		
	Total	321,77	69			
FUM	Entre grupos	14,40	1	14,40	3,11	0,082
	Intra grupos	315,35	68	4,64		
	Total	329,76	69			

Una vez realizado el análisis estadístico queda demostrado que el riego por aspersión aumenta significativamente la formación de DON, ya que se produce una significación menor de 0,05 (0,001), resultados que ya demostraron Oldenburg y Schittenhelm (2012) estudiando el tiempo y la forma de riego.

El riego se utiliza para disminuir el estrés vegetal, aunque deben adoptarse pautas adicionales para minimizar el consiguiente riesgo de micosis, evitando, por ejemplo, el riego por aspersión durante la floración. El riego es un método valioso para reducir el estrés vegetal en algunas situaciones de cultivo (Recomendación 2006/583/CE).

Aunque los análisis de las muestras de FUM no indican resultados significativos, sí se puede decir que el riego a pie podría influir en la formación de este tipo de micotoxinas mostrando cierta tendencia a aumentar el riesgo de su formación.

Obtenidos estos resultados, es necesario realizar un estudio de correlación entre DON y FUM para comprobar si es positiva, negativa o si no existe relación (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis estadístico de Correlación entre DON y FUM

Micotoxina		DON	FUM
DON	Correlación de Pearson	1,00	-0,21
	Sign. (2-colas)		0,83
	Número de muestras	70	70
FUM	Correlación de Pearson	-0,21	1,00
	Sign. (2-colas)	0,83	
	Número de muestras	70	70

Para poder interpretar los datos debemos atender a la intensidad y signo de la correlación para poder observar si es significativa. De esta forma, la correlación puede oscilar entre +1 y -1, siendo 0 la ausencia de correlación (Sancho et al., 2014).

En este caso, obtenemos un resultado negativo (-0,21), por lo que existe una correlación negativa entre las micotoxinas DON y FUM, aunque no significativa.

5.2 RESULTADOS AULA DEI

Tanto en los análisis de deoxinivalenol (DON) como de fumonisinas (FUM) se encontraron resultados por encima del límite de detección (LOD), que en ambos casos es mayor a 0,20 mg/kg, como se dijo en el apartado 5.1.

En el caso de DON, 12 de las 18 muestras superan el límite de detección (Figura 4).

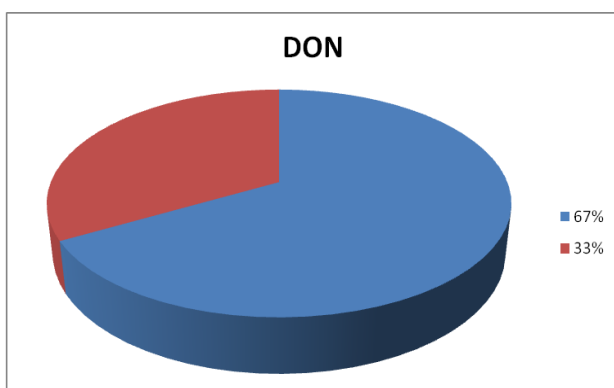


Figura 4. Porcentaje de muestras de DON por encima del límite de detección (LOD) (67%)

En el caso de los análisis de FUM, todas las muestras analizadas fueron superiores al límite de detección, con valores mucho más altos en comparación a los resultados de DON:

Los valores de DON en estas muestras son bastante bajos, con una media de 0,44 mg/kg siendo los más altos algunos que superan los 2 mg/kg. Ninguna de estas muestras analizadas supera el límite máximo de 12 mg/kg para consumo animal establecido en la legislación, aunque una de las muestras supera el límite máximo de 1,75 mg/kg para consumo humano (Reglamento (CE) No 1881/2006).

En cuanto a los valores de FUM, obtenemos resultados mucho más elevados, con una media de 7,62 mg/kg, valores que resultan demasiado altos, siendo algunas muestras incluso mayores a 12 mg/kg.

Ninguna de estas muestras analizadas supera el límite máximo de 60 mg/kg para consumo animal establecido en la legislación, aunque un total de 16 muestras superaron el límite máximo de 4 mg/kg para consumo humano (Reglamento (CE) No 1881/2006).

5.2.1 Análisis descriptivo y comparativo

Uno de los factores que se analizan es el tipo de riego realizado, ya sea por aspersion o en superficie (Tabla 12).

Tabla 12. Número de muestras y media de resultados por tipo de riego y tipo de micotoxina

Micotoxina	Tipo de riego	Número de muestras	Media (mg/kg)
DON	Aspersión	9	0,81
	Superficie	9	0,08
	Total	18	0,44
FUM	Aspersión	9	7,77
	Superficie	9	7,48
	Total	18	7,62

Aquí se destaca claramente en los resultados de DON que vuelve a afectar el tipo de riego (0,81 mg/kg frente a 0,08 mg/kg), obteniendo niveles mucho más altos si el tipo de riego es por aspersión (Tabla 13). Mientras que los resultados de FUM son casi igual de elevados ya sea riego por aspersión o por superficie (7,77 mg/kg frente a 7,48 mg/kg).

Tabla 13. Análisis estadístico ANOVA según riego

Micotoxinas		Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Significación
DON	Entre grupos	2,40	1	2,40	12,38	0,003
	Intra grupos	3,10	16	0,19		
	Total	5,50	17			
FUM	Entre grupos	0,38	1	0,38	0,04	0,839
	Intra grupos	142,69	16	8,92		
	Total	143,07	17			

En cuanto a los resultados de FUM no hay ninguna diferencia significativa, al contrario que los resultados de DON, en los que podemos apreciar que se produce una significación menor de 0,05 (0,003), por lo que se produce una diferencia significativa.

Resultados iguales a los que ya obtuvimos en las muestras de campo de Monsanto (significación de 0,001) demostrando que el riego por aspersión afecta claramente al desarrollo de DON, dato por el que la comisión recomienda evitar un exceso de riego por aspersión (Recomendación (2006/583/CE)).

El otro factor analizado en estas muestras es el tipo de siembra, ya sea siembra directa sin labrar la tierra de cultivo (SD) con o sin residuos de cosechas previas, o se realice un laboreo convencional con varios pases de arado, realizando el estudio en el mismo número de muestras en cada variable. (Tabla 14).

Tabla 14. Número de muestras y media de resultados por laboreo y tipo de micotoxina

Micotoxinas	Laboreo	Número de muestras	Media
DON	Laboreo convencional	6	0,56
	SD con residuo	6	0,24
	SD sin residuo	6	0,53
	Total	18	0,44
FUM	Laboreo convencional	6	8,31
	SD con residuo	6	7,91
	SD sin residuo	6	6,65
	Total	18	7,62

A simple vista se aprecia que no hay mucha diferencia según el tipo de laboreo, pero siempre conviene realizar el test de ANOVA para comprobar esta afirmación (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis estadístico ANOVA según laboreo

Micotoxinas		Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F	Significación
DON	Entre grupos	0,37	2	0,18	0,53	0,597
	Intra grupos	5,13	15	0,34		
	Total	5,50	17			
FUM	Entre grupos	9,04	2	4,52	0,51	0,613
	Intra grupos	134,03	15	8,94		
	Total	143,07	17			

Con esto se demuestra que no hay ninguna diferencia significativa tanto en los resultados de las muestras obtenidas para DON como en los resultados de las muestras de FUM, resultados que coinciden con los estudiados por Ariño et al (2008).

Obtenidos estos resultados, es necesario realizar un estudio de correlación entre DON y FUM para comprobar si es positiva, negativa o si no existe relación (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis estadístico de Correlación entre DON y FUM

Micotoxina		DON	FUM
DON	Correlación de Pearson	1,00	-0,27
	Sign. (2-colas)		0,271
	Número de muestras	18	18
FUM	Correlación de Pearson	-0,27	1,00
	Sign. (2-colas)	0,271	
	Número de muestras	18	18

En este caso, obtenemos un resultado negativo (-0,27), por lo que existe una correlación negativa entre las micotoxinas DON y FUM, aunque de nuevo sin significación estadística.

5.3 MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL

De la revisión bibliográfica efectuada (FAO, 1999), podemos destacar los siguientes aspectos de prevención y control de las micotoxinas objeto de estudio.

5.3.1 Tratamientos de reducción en fumonisinas

En la transformación de los alimentos, es importante aplicar unas Buenas Prácticas de Fabricación de higiene y manipulación durante el almacenamiento, transporte, producción y envasado de los cereales y alimentos a base de cereales, con el fin de reducir en la mayor medida posible los niveles de fumonisinas en el alimento final, así como establecer programas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC).

Las fumonisinas son muy termoestables (100-150°C), por lo que persisten durante toda la cadena de producción alimentaria, siendo muy difícil eliminar sus niveles durante la molienda, procesado y cocción de los alimentos (Elika, 2013b)

Por otra parte, el uso de tratamientos físicos de descontaminación, como la selección de granos de cereales, reduce significativamente el contenido de fumonisinas en el maíz debido a que la mayor concentración de micotoxinas está en el grano sin tratar (Reglamento (CE) No 1881/2006).

5.3.2 Tratamientos de reducción en deoxinivalenol

El deoxinivalenol, es muy termoestable, por lo que durante la molienda y panificación ni se eliminan ni se reducen los niveles de dicha micotoxina (Wang et al. 2016).

En el caso de las pastas, la disminución de la cantidad de deoxinivalenol depende de la forma de cocción. Para espaguetis, macarrones y pasta similar, los niveles se reducen por eliminar el agua de cocción, mientras que en fideos destinados a sopa, donde no se desecha el líquido de cocción, la micotoxina queda presente en dicho líquido (Elika, 2013c).

No obstante, el uso de tratamientos físicos de descontaminación, como la selección de granos de cereales, los descascarillados y la posterior separación mecánica de la cáscara y el polvo del resto del cereal, reducen significativamente el contenido de deoxinivalenol en los granos debido a que la mayor concentración de micotoxinas ocurre en la cáscara de los granos y en el salvado (Reglamento (CE) No 1881/2006).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo son una aportación al conocimiento de la influencia de los factores agronómicos en la contaminación por micotoxinas del maíz, cuyos datos más relevantes se exponen a continuación.

5.3.3 Prevención y control según resultados

Analizados los resultados tanto de Monsanto como de la Estación Experimental de Aula Dei, se pueden sacar conclusiones como que lo más adecuado para evitar el desarrollo de fumonisinas, es utilizar semillas modificadas genéticamente, ya que disminuye claramente sus concentraciones. También hay que tener en cuenta el Ciclo FAO que se aplique para el desarrollo del maíz, ya que tanto los ciclos cortos de 400 y 500 así como un ciclo medio de 700 no tienen una influencia clara en ninguna de las micotoxinas, pero el ciclo 600 hace que el desarrollo de deoxinivalenol sea muy bajo, justo al contrario que en las fumonisinas, que hace que aumente mucho en comparación con el resto de ciclos (3 mg/kg frente por ejemplo al ciclo 400, que tiene una media de 1,03 mg/kg).

Un factor muy importante sería el tipo de riego, ya que influye directamente en el desarrollo del deoxinivalenol cuando se produce riego por aspersion (2,89 mg/kg frente a 0,16 mg/kg en riego a pie). Esto no ocurre en cuanto al desarrollo de fumonisinas, por lo que en la medida de lo posible lo mejor sería realizar el riego a pie o manta, evitando siempre la época de floración.

El laboreo no parece tener una influencia directa en la formación de estas micotoxinas, como ya se ha comentado de otros estudios (Ariño et al. 2008), puede que el laboreo convencional provoque mayor desarrollo tanto en deoxinivalenol como en fumonisinas ya que aportan los valores más elevados en los análisis de las muestras de la Estación Experimental Aula Dei (0,56 mg /kg y 8,31 mg/kg respectivamente), por lo que lo idóneo sería realizar otro tipo de laboreo, tanto siembra directa con residuo o sin residuo.

6. CONCLUSIONES

PRIMERA

El test de cribado basado en inmunocromatografía de flujo lateral en formato de tiras DON-V y Fumo-V de VICAM, nos ha permitido obtener resultados analíticos de las micotoxinas deoxinivalenol (DON) y fumonisinas (FUM) en las muestras de maíz de manera rápida y cómoda, con muy poco gasto de material y con posibilidad de almacenar los resultados de forma digital.

SEGUNDA

Del total de 88 muestras de maíz analizadas, 55,7% fueron positivas a DON y 64,8% a FUM, lo que indica una prevalencia importante de ambas micotoxinas. La media global de DON alcanzó 1,21 mg/kg, mientras que la de fumonisinas fue de 2,39 mg/kg, observándose que 21 muestras (23,9%) superaron el límite máximo de DON establecido para maíz destinado a alimentación humana (1,75 mg/kg) y 19 muestras (21,6%) excedieron el límite máximo de fumonisinas fijado en 4 mg/kg. En conclusión, las tasas de contaminación pueden considerarse elevadas, lo que confirma la susceptibilidad del maíz a dichas micotoxinas en nuestras latitudes.

TERCERA

En el caso de las concentraciones de deoxinivalenol, las variables que aportaron diferencias estadísticamente significativas fueron la localidad del campo de cultivo y el tipo de riego. Respecto de este factor, las tasas de DON en las muestras con riego por aspersión fueron superiores a las irrigadas a pie o manta, lo que debería ser tenido en cuenta para optimizar el momento y la frecuencia del riego por aspersión con objeto de minimizar el riesgo de esta micotoxina.

CUARTA

Para las fumonisinas, las variables que arrojaron resultados significativos fueron la presencia de modificación genética (OMG) y el tipo de ciclo FAO del maíz. Así, las

tasas de fumonisinas fueron significativamente menores en maíz transgénico (0,47 mg/kg) frente al convencional (1,54 mg/kg), confirmando que la reducción del daño por insectos protege a la planta de la entrada de mohos toxigénicos. Por otro lado, las variedades de maíz de ciclo FAO 600 se mostraron como las más susceptibles a fumonisinas entre las ensayadas, lo que debería tenerse en cuenta en la planificación de cultivos en zonas de riesgo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AFSSA (2006). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.
- ANSES (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final. Disponible <https://www.anses.fr/en/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>
- Ariño, A., Herrera, M., Giménez, I., Lorán, S., Herrera, A., Carramiñana, J.J., Anadón, R., de Diego, A., Adiego, E., Bailly, J.D. (2015). Manual para el desarrollo de buenas prácticas que prevengan la contaminación de maíz y trigo con las micotoxinas aflatoxinas y deoxinivalenol. Disponible en: <http://www.mycoprev.info/wp-content/uploads/2015/12/Manual-buenas-practicass.pdf>
- Ariño, A., Herrera, M., Juan, T., Estopañan, G., Carramiñana, J.J., Rota, C., Herrera, A. (2008). Influence of agricultural practices on the contamination of maize by fumonisin mycotoxins. *Journal of Food Protection*, 72, 898-902.
- Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J. F., Gámiz-Gracia, L., y García-Campaña, A. M. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín Graseqa* N°7.
- Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., and Cahagnier, B. (2002). Fungal growth and Fusarium mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50,728-731.
- Baktavachalam, G.B., Delaney, B., Fisher, T.L., Ladics, G.S., Layton, R.J., Locke, M.E.H., Schmidt J., Anderson, J.A., Weber, N.N., Herman, R.A., Evans, S.L. (2015). Transgenic maize event TC1507: Global status of food, feed, and environmental safety. *GM Crops Food*, 6, 80-102.
- Biomin (2013). Actualización en micotoxinas 2013. Disponible en: http://www.biomin.net/uploads/tx_news/ART_No12_MYC_ES_0214_01.pdf
- Buyukunal, S. K., Kahraman, T., & Ciftcioglu, G. R. (2010). Occurrence of AF, AFB1, OTA in rice commercialized in eastern Turkey. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(5), 907–912.

- Canady, R.A., Coker, R.D., Kathleen Egan, S., Krska, R., Kuiper-Goodman, T., Olse, M., Pestka, J., Resnik, S. and Schlatter, J. (2001). Deoxynivalenol. Food and Drug Administration, Washington DC, USA. JEFCA, 47.
- Cermeño, P., Pérez, J. (2014). Recomendaciones de Buenas Prácticas para la Prevención y el Control de las Aflatoxinas en Maíz. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Sevilla. 1-14.
- Chulze, S.N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review, Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 27:5, 651-657.
- Codex Alimentarius. (2007). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos. Documento de debate sobre el deoxinivalenol.
- Codex Alimentarius. (2013). Informe de la séptima reunión del comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius.
- Codex Alimentarius. (2014). Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de los cereales por micotoxinas.
- Consejo Internacional de Cereales (2017). Informe Mercado de cereales. www.igc.int
- Dugyala R.R. and Sharma R.P. (1996) The effect of aflatoxina B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. International. Journal of Immunopharmacology. 18: 599-608.
- EFSA. (2013). Deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure. The EFSA Journal. 11(10), 3379.
- Elika. (2013a). Deoxinivalenol. Disponible en: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento110/21.Deoxinivalenol.pdf
- Elika. (2013b). Fumonisin. Disponible en: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento120/23.Fumonisin.pdf
- Elika. (2013c). Sustancias indeseables. Alimentación animal. Deoxinivalenol. Disponible en: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento16/DON%202012%20maqetado.pdf.
- Elika. (2017). Micotoxinas en alimentos y piensos. Disponible en:

- <http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo890/berezi%2017%20FINAL.pdf>
- EMAN (European Mycotoxin Awareness Network). (2007). Disponible en: <http://www.mycotoxins.org/>
 - FAO. (1993). El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición, N° 25.
 - FAO. (1999). Prevención y descontaminación de micotoxinas: El maíz. Tercera conferencia internacional mixta.
 - FAO. (2003). Manual sobre la aplicación del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la Prevención y Control de las Micotoxinas.
 - FAO (2016). . Resultados de experimentación agraria. Ensayos de Maíz. Ciclos FAO 400-500, FAO 600, FAO 700. Hoja Informativa N° 71. Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal.
 - GLM (Gruppo Lavoro Micotossine) (2007). Fourth Fusarium Forum hosted by the European Commission, Brussels 15-16.
 - Gourdain E. (2009). Risque mycotoxines sur blé dur. Les leviers de maîtrise du champ au silo. Perspectives Agricoles. 354.
 - Hammond, B.G., Campbell, K.W., Pilcher, C.D., DeGooyer, T.A., Robinson, A.E., McMillen, B.L., Spangler, S.M., Riordan, S.G., Rice, L.G., and Richard, J.L. (2004). Lower fumonisin mycotoxins levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002.
 - Herrera, M., Conchello, P., Juan, T., Estopañan, G., Herrera, A., Ariño, A. (2010). Fumonisin concentrations in maize as affected by physico-chemical, environmental and agronomical conditions. *Maydica*, 55, 121-126.
 - Huong, B. T. M., Tuyen, L. D., Do, T. T., Madsen, H., Brimer, L., & Dalsgaard, A. (2016). Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. *Food Control*, 70, 191-200.
 - IARC. (2002). Fumonisin B1 (Group 2B). 82, 301.
 - Llanos, M. (1984). El maíz: Su cultivo y aprovechamiento. Edición Mundi Prensa.
 - López, H., de la Cruz, F. (2013). Mapas agroclimáticos para el cultivo del maíz grano en España. *Boletín GENVCE*.

- López Naranjo, L.M. (2013). Principales micotoxicosis asociadas al consumo de maíz y sus subproductos. Trabajo de fin de grado. Especialización en alimentación y nutrición.
- MAPAMA. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Disponible en:
http://www.mapama.gob.es/imagenes/es/textomicotoxinas18122015_completorev_nipo_tcm7-411648.pdf
- Marín, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., y Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60, 218–237.
- Monsanto. (2006). Cuaderno Técnico nº 2. Seguridad del maíz MON 810 (Yieldgard®) genéticamente protegido contra taladros.
- Oldenburg, E. and Schittenhelm, S. (2012). Effect of plant water deficit on the deoxynivalenol concentration in *Fusarium*-infected maize kernels. *Mycotoxin Res.* 28, 229-236.
- OMS. (2002). Informe sobre las reuniones de los comités de expertos y los grupos de estudio. Evaluación de ciertas micotoxinas. Serie de Informes Técnicos, Nº 906.
- Reglamento (CE) No 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.
- Recomendación (2006/583/CE) de la comisión de 17 de agosto de 2006 sobre la prevención y la reducción de las toxinas de *Fusarium* en los cereales y los productos a base de cereales.
- Samar, M.M. (2003). Persistencia y/o transformación de tricotecenos durante algunas etapas del procesamiento del trigo. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.
- Sancho, C.; González Such, J. y Bakieva, M. (2014). PSPP. Correlación bivariada. Coeficiente de Pearson. Innovamide L4U. Red de Innovación Educativa y Calidad Docente. Elaboración y evaluación de materiales de aprendizaje. Universitat de València.
- Serra J.,López A. y Salva J. (2006). Varietats de blat de moro genèticament modificades (GM), amb resistència al barrinadors: Productivitat i altres

- paràmetres agronòmics. Dossier Tècnic del DARP, Generalitat de Catalunya n° 10:13-18.
- Song, S., Liu, N., Zhao, Z., Ediage, E.N., Wu, S., Sun, C., De Saeger, S., Wu, A. (2014). Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination. Shanghai Academy of Agricultural Sciences. China. 86, 4995-5001.
 - Tanaka, A., Yamaguchi, J. (1972). Producción de materia seca. Componentes del rendimiento y rendimiento del grano en maíz. Revista Fitotecnia Mexicana. 38, 1-5.
 - Trombete, F.M., Saldanha, T., Direito, G.M., Fraga, M.E. (2013). Aflatoxinas y tricotecenos en trigo y derivados: incidencia de la contaminación y métodos de determinación. Revista chilena de nutrición. 40, 2.
 - Wang, L., Shao, H., Luo, X., Wang, R., Li, Y., Luo, Y., Chen, Z. (2016). Effect of Ozone Treatment on Deoxynivalenol and Wheat Quality. School of Food Science and Technology, Jiangnan University. China. doi: 10.1371/journal.pone.0147613.