

Tesis Doctoral

Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz

Motta, Estela Leonor

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Motta, Estela Leonor. (2009). Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Motta, Estela Leonor. "Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

**ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICION A MICOTOXINAS A TRAVÉS DE DOS
TÉCNICAS: OCRATOXINA A EN PLASMA Y BIODISPONIBILIDAD DE
FUMONISINA B₁ EN COPOS DE MAÍZ**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área Industrias

Estela Leonor Motta

Directores de tesis: Silvia Liliana Resnik
Peter Michael Scott
Consejero de Estudios: Dra. Úrsula Bordenave

Lugar de trabajo:

Departamento de Industrias Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, (7600) Funes 3350, Mar del Plata, Argentina

Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Argentina

Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Dorronzoro 141, Luján, Argentina

Bureau of Chemical Safety, Health Canada, Address Locator 2203D, Ottawa, Ontario, K1A 0K9, Canada

Buenos Aires, 2009

ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS A TRAVÉS DE DOS TÉCNICAS: OCRATOXINA A EN PLASMA Y BIOACCESIBILIDAD DE FUMONISINA B₁ EN COPOS DE MAÍZ

La presencia de ocratoxina A (OTA) en sangre humana ha sido informada en muchos países, especialmente Europa. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que refieran su presencia en la Argentina. El objetivo de este estudio fue evaluar la concentración de OTA en plasma humano en dos localidades de la provincia de Buenos Aires. Las determinaciones de OTA en 199 muestras de donantes de sangre en Mar del Plata y 236 de General Rodríguez fueron realizadas por HPLC. La limpieza de las muestras se realizó con una columna Bakerbond® C-18 y una purificación final con columna de inmunoafinidad Ochraprep®. El límite de cuantificación de la OTA fue de 0,019 ng/ml. La confirmación de la presencia de la OTA fue realizada a través de la formación del metil éster de la OTA. El análisis reveló que 63,8 % y 62,3 % de las muestras plasmáticas de Mar del Plata y de General Rodríguez respectivamente fueron positivas para OTA. Se determinó un promedio winsorizado de 0,15 ng/ml y 0,43 ng/ml respectivamente. La encuesta alimentaria realizada permitió observar que la principal fuente de ingesta son los cereales y panificados, utilizando valores de ocurrencia de otros países se obtuvo un valor ingesta de OTA promedio de 2,21 ng/kg p.c./día, similar al determinado en Francia. Es importante continuar la investigación para detectar aquellos alimentos responsables de la presencia de OTA en plasma.

Se han encontrado bajos niveles de fumonisinas libres en cereales para desayuno con maíz en Mar del Plata y General Rodríguez y también fumonisinas unidas a proteínas y a otros componentes de la matriz. El rango de contaminación de FB₁ en copos de maíz en la ciudad de Mar del Plata fue entre nd y 74.5 µg/kg y en Ottawa entre 15 y 126 µg/kg. Después de la incubación de muestras de copos de maíz molidas con soluciones que simulan los líquidos del tracto gastrointestinal, saliva y los jugos estomacales y duodenales. El quimo fue analizado para FB₁, fumonisina B₁ completamente hidrolizada (HFB₁) y fumonisina B₁ parcialmente hidrolizada (PHFB₁). El promedio de la bioaccesibilidad de FB₁ (porcentaje de FB₁ liberado de los copos de maíz hacia el quimo) fue 53 %. HFB₁ y PHFB₁ no fueron detectados. Si FB₁

fue extraído previamente con solventes de la muestra FN12, no se detectó FB₁ en el quimo, lo que indica que la cantidad de FB₁ que queda bioaccesible, no provino de TB FB₁ presente en la muestra (TB FB₁ = 125 ng/g). La bioaccesibilidad determinada de TBFB₁ en el quimo fue de 51 %.

“Palabras claves”: Exposición, encuesta, concentración plasmática, OTA, modelo de digestión “*in vitro*”, quimo, fumonisinas unidas totales, FB₁ libre, fumonisina B₁ parcialmente hidrolizada, fumonisina B₁ totalmente hidrolizada.

EXPOSITION ESTIMATION TO MYCOTOXINS BY TWO TECHNIQUES: OCHRATOXIN A IN PLASMA AND BIOACCESSIBILITY OF FUMONISIN B₁ FROM CORN FLAKES

The presence of ochratoxin A (OTA) in human blood has been reported for many countries, especially in Europe. However, so far no report exists concerning such presence in Argentina. The aim of this study was to assess OTA concentration in human plasma in two different areas of Buenos Aires province. The determinations of OTA in 199 plasma samples from blood donors in Mar del Plata and 236 from General Rodríguez were done by HPLC. The extractive procedure used solid phase extraction with Bakerbond® C-18 cartridge and a final purification with immunoaffinity columns Ochraprep®. The limit of quantification of ochratoxin A was 0.019 ng ml⁻¹ and the confirmation of OTA presence was done through the formation of ochratoxin A methyl ester. The analysis revealed that 63.8% from Mar del Plata and 62.3% from General Rodríguez of human plasma sampled were positive for OTA, as a result, a winsorized mean of 0.15 ng ml⁻¹ and 0.43 ng ml⁻¹ respectively, were found. It is important to continue the research to detect the foods responsible of the presence of OTA in plasma.

Low levels of fumonisins have been found in corn based breakfast cereals in Mar del Plata and General Rodríguez and can occur bound to protein and other matrix components.

The range of contamination of FB₁ in corn flakes, in Mar del Plata city was nd-74.5 µg /kg and in Ottawa was 15-126 µg /kg. After incubation of the ground samples of corn flakes with gastrointestinal tract solutions simulating saliva plus stomach and duodenal juices, chyme was analyzed for FB₁, hydrolyzed FB₁ (HFB₁) and partially hydrolyzed fumonisin B₁ (PHFB₁). The average bioaccessibility of FB₁ (percentage of the FB₁ released from corn flakes in the chyme) was 53 %. HFB₁ and PHFB₁ were not detected. If free FB₁ was first extracted from sample FN12 (TB FB₁ = 125 ng/g), no FB₁ was detected in the chyme, indicating no contribution from TB FB₁. Nevertheless, the average bioaccessibility of TBFB₁ in the chyme was 51 %.

“Keywords”: Exposition, questionnaire, plasmatic concentration of OTA, chyme, digestion model “*in vitro*”, free FB₁, partial hydrolyzed FB₁, total hydrolyzed FB₁.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	1
I.1. Micotoxinas. Historia	1
I.2. Estructura y Propiedades	5
I. 2. 1. Ocratoxina A	5
I. 2.2. Fumonisinias	7
I.3. Especies productoras de Ocratoxina A	12
I.3.1. Especies de <i>Aspergillus</i> pertenecientes a la sección <i>Circumdati</i>	12
I.3.2. Especies de <i>Aspergillus</i> pertenecientes a la sección <i>Nigri</i>	13
I.3.3. Especies de <i>Penicillium</i> que producen ocratoxina A	14
I.3.4. Fisiología y ecología de los hongos productores de ocratoxina A	14
I.3.4.1. <i>Penicillium verrucosum</i> y <i>Penicillium nordicum</i>	14
I.3.4.2. <i>Aspergillus ochraceus</i> y especies relacionadas	16
I.3.4.3. <i>Aspergillus carbonarius</i> y <i>Aspergillus niger</i>	17
I.4. Especies productoras de Fumonisinias	19
I.5. Niveles de contaminación	21
I.5.1. Ocratoxina A	21
I.5.2. Fumonisinias	33
I.6. Procesamiento	37
I.6.1. Ocratoxina A	37
I.6.2. Fumonisinias	37
I.6.2.1. Molienda seca	40
I.6.2.2. Extrusión.	43
I.6.2.3. Efecto de los distintos procesos sobre el nivel de contaminación por fumonisinias en maíz	46
I.6.2.4. Efecto de la molienda seca sobre los niveles de contaminación por fumonisinias	48
I.6.2.5. Efecto de la extrusión sobre los niveles de contaminación por fumonisinias	50
I.7. Toxicidad	56
I.7.1. Ocratoxina A	56
I.7.1.1. Exposición prolongada	56
I.7.1.2. Metabolismo: absorción, biotransformación, excreción.	56
I.7.1.3. Evaluación de la exposición	58
I.7.1.4. Encuesta	65
I.7.2. Fumonisinias	67
I.7.2.1. Metabolismo de las fumonisinias en distintas especies. Mecanismo de acción	67
I.7.2.2. Biodisponibilidad de FB ₁	74
I.7.2.3. Modelo de digestión <i>in vitro</i>	79

II. OBJETIVOS	85
III. MATERIALES Y MÉTODOS	86
III.1. Ocratoxina A	86
III.1.1. Reactivos y solventes	86
III.1.2. Preparación de soluciones	86
III.1.3. Estándares	86
III.1.4. Características de las muestras y de la población	86
III.1.5. Ocratoxina A en plasma	88
III.1.5.1. Extracción y limpieza del plasma	88
III.1.5.2. Cromatografía Líquida	90
III.1.5.2.1. Confirmación de OTA por formación del metil éster	90
III.1.6. Encuesta alimentaria	90
III.1.7. Estimación de la ingesta de ocratoxina A basada en los niveles en plasma	91
III.1.8. Análisis estadístico	91
III.2. Fumonisinias	92
III.2.1. Reactivos y solventes	92
III.2.2. Estándares	94
III.2.3. Muestras	94
III.2.4. Determinación y análisis	98
III.2.4.1. Extracción y limpieza de fumonisinias libres	98
III.2.4.2. Extracción y limpieza de fumonisinias unidas	102
III.2.4.3. Extracción y limpieza de las muestras del quimo	104
III.2.4.4. Extracción y limpieza de TB FB ₁ en el quimo	105
III.2.4.5. Cromatografía líquida	106
III. 2.4.5.1. Condiciones analíticas	106
III. 2.4.5.2. Confirmación por HPLC-MS	107
III.2.5. Modelo de digestión “ <i>in vitro</i> ”	109
III.2.5.1. Composición. Preparación. Implementación	109
III.2.5.2. Procedimiento	111
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	114
IV.1. Ocratoxina A	114
IV.1.1. Evaluación de la encuesta de alimentos en dos poblaciones de donantes de la provincia de Buenos Aires. Frecuencia de consumo y cantidades ingeridas de distintos alimentos	114
IV.1.2. Estimación de la ingesta de ocratoxina A, considerando los niveles de contaminación por OTA de ciertos alimentos determinados en estudios previos y el nivel de ingesta de esos alimentos	127
IV.1.3. Metodología analítica de OTA	133
IV.1.4. Niveles plasmáticos de OTA y evaluación de esas concentraciones como indicador de ingesta de OTA	136

IV.2. Fumonisinias	146
IV.2.1. Determinación de fumonisinias libres en copos de maíz adquiridos en la ciudad de Mar del Plata	146
IV.2.2. Determinación de fumonisinias libres y unidas en cereales para desayuno adquiridos en Ottawa	150
IV.2.2.1. Mejoras del método de limpieza de fumonisinias libres para la determinación de TB FB ₁	158
IV.2.2.2. Determinación de las condiciones de hidrólisis adecuadas para el análisis de las fumonisinias unidas totales (TBFB ₁) en copos de maíz para estudios <i>in vitro</i>	159
IV.2.3. Evaluación de los efectos de la digestión <i>in vitro</i> sobre las fumonisinias contaminantes en copos de maíz	166
IV. 2.3.1. Puesta a punto de las técnicas de análisis en el quimo	167
IV.2.3.2. Estudios realizados para analizar los efectos del modelo de digestión <i>in vitro</i> sobre la contaminación en copos de maíz	173
IV. 2.3.3. Estudios para determinar la bioaccesibilidad de TBFB ₁	179
V. CONCLUSIONES	184
VI. REFERENCIAS	187
ANEXOS	205

Agradecimientos

A la Dra. Silvia Resnik por la confianza, constante apoyo, acompañamiento incondicional y su guía científica que me brindó a lo largo de la elaboración de la tesis

A la Dra. Ana Pacin por la posibilidad de trabajar en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Micotoxinas, brindándome su constante apoyo y sus consejos.

Al Dr. Peter Scott por darme la posibilidad de trabajar en el “Bureau of Chemical Safety” en la ciudad de Ottawa, cuyo seguro, firme aporte y sus conocimientos, me ayudaron en la elaboración de la tesis.

A todas las personas del laboratorio del Centro de Investigación en Micotoxinas y especialmente a Gabriela, María Emilia y Daniela que me ayudaron en los aspectos técnicos del trabajo y me brindaron su aprecio y alegría en el trabajo.

Al Dr. Lau, por su aporte en el trabajo en los aspectos relacionados con el HPLC-masa.

A Guillaume Lawrence, por su ayuda en el manejo del HPLC y su compañía en conversaciones matutinas.

Al Centro Regional de Hemoterapia de Mar del Plata, en especial al Dr. Washington García y a la Dra. Patricia Murlo por darme la posibilidad de realizar la encuesta de alimentos y obtener las muestras plasmáticas para este estudio.

A la Ing. María Rosa Casales por su amistad a lo largo de este tiempo.

A la Dra. Rosalía Fritz por su constante apoyo.

A la Dra. Olinda Pérez Borla por su amistad.

A mis padres, por haberme brindado su apoyo e incondicional ayuda durante toda mi vida.

Para Ale, Leonor, María Inés y Alejandro

I. INTRODUCCION. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

I.1. Micotoxinas - Historia

Las micotoxinas son compuestos químicos producidos por hongos que contaminan y crecen en distintos sustratos, y cuando las condiciones ambientales les son favorables estos hongos son capaces de producir estas toxinas. La palabra mico viene del griego mukes que significa hongos y del latín toxicum (tóxico). Adquirieron importancia debido al efecto deletéreo que pueden presentar para la salud.

Los sustratos a los que colonizan son variados como cereales, café, frutas, vegetales, por lo cuál su presencia reviste significancia desde el punto de vista agroalimentario. Muchas de las toxinas han estado relacionadas con enfermedades en animales y en humanos ya sea como causantes de cáncer o de enfermedades órgano-específicas como patologías renales, pulmonares, hepáticas entre otras.

La asociación de las micotoxinas como causa de enfermedad se remonta a la antigüedad. Marr y Malloy (1996, 1997) postulan que alguna de las diez plagas de Egipto mencionadas en La Biblia podrían haberse producido por micotoxinas entre ellas la décima plaga (Éxodo 11:1-12:36) en la cual se produce la muerte de los primogénitos, ya que existía la costumbre de alimentar primero a los varones, los cuales podrían haber ingerido cereal contaminado.

Otros casos muy resonantes a través de la historia fueron los de ergotismo, relacionados con el consumo de centeno contaminado con un hongo, el cornezuelo (*Claviceps purpurea*) (Bravo Díaz, 2003). Los asirios describían ya en el año 600 AC la existencia de una pústula nociva en la espiga del centeno y los persas, 400 a 300 años AC, hablaban de unas hierbas nocivas que hacían que las embarazadas abortasen y muriesen en el parto. En Europa, los brotes de Fuego de San Antonio, que ocurrieron durante la Edad Media, fueron originados por el cornezuelo. Estas epidemias (Figura 1) se caracterizaron por gangrena de pies, piernas, manos y brazos llegando en casos graves a necrosis y pérdida de las extremidades, hecho documentado en la pintura

de Pieter Bruegel “El Viejo” que actualmente está expuesto en el Museo del Louvre: “Los Mendigos”.



Figura 1. “Los Mendigos” (P. Bruegel)

Se decía que un fuego sagrado consumía los miembros por lo que se denominó fuego sagrado o Fuego de San Antonio, en honor al Santo a cuyo santuario acudían los enfermos en busca de su curación. Esa curación la conseguían porque los monjes no comían pan de centeno y les daban a los enfermos pan de trigo. En cuanto al aspecto convulsivo que puede presentar la contaminación, el famoso caso de las brujas de Salem (1691-1692) mostró que la intoxicación también se puede presentar con delirios, perturbaciones sensoriales, agitación mental que se confundió con embrujamiento y posesión. El hecho que, el pan fabricado con centeno infectado podría ser una fuente de exposición, no se sospechó hasta finales del siglo XVII, disminuyendo entonces la frecuencia del ergotismo aunque han existido epidemias en ciertas regiones de Europa (Norte y este en el siglo XIX y en Rusia en 1926) más recientemente en India (1968) donde se contabilizaron 20 muertes y en Etiopía (1978) donde hubo 47 muertes relacionadas con el consumo de centeno contaminado. En Latinoamérica destacan los casos de Uruguay, especialmente en población vegetariana.

Otro hecho histórico relacionado con tricotecenos (micotoxinas producidas por *Fusarium*) corresponde a un episodio acaecido en 1944 en el distrito de Orenburg (Rusia), donde la mortalidad alcanzó al 80% de la población afectada por Aleucia

Tóxica Alimentaria, caracterizada por una atrofia total de médula ósea, angina necrótica y diátesis hemorrágicas.

También se observaron importantes asociaciones de enfermedades en humanos en poblaciones geográficamente delimitadas, como el Síndrome del Arroz Amarillo o Beri Beri Cardíaco Agudo, relacionado con la Citreoviridina, ocurrido durante mucho tiempo en Japón y otros países asiáticos.

La **ocratoxina A** (OTA) fue descubierta en la década del 60 en Sudáfrica durante los estudios de laboratorio realizados por Krogh y col. (1974), Van der Merwe (1965) y Van der Merwe y col. (1965) en la búsqueda de nuevos metabolitos provenientes de hongos, donde fue aislada del *Aspergillus ochraceus* que contaminaba harina de maíz, trigo, centeno, granos de sorgo, arroz, soja y maní. Junto con la ocratoxina A también se logró aislar ocratoxina B y C.

En 1950 una serie de publicaciones en Bulgaria, Yugoslavia y Rumania (Fortza y Negoescu, 1961; Stojimorovic y col., 1959; Vrabcheva y col., 2000) describieron una enfermedad renal que aparecía en un área de aproximadamente 400 - 500 km² a lo largo de los tributarios del Danubio en estos tres países de los Balcanes. La enfermedad fue luego llamada Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN) más tarde asociada con tumores del tracto urinario. En 1972, sobre la base de una serie de observaciones epidemiológicas, Akhmeteli (1972) sugirió que las micotoxinas estaban involucradas en la etiología del BEN y el mismo año Krogh y col. (1974), en vista de las similitudes entre el BEN y la nefropatía en cerdo inducida por OTA, sugirieron que esa toxina podría estar involucrada en la etiología del BEN.

BEN es una enfermedad crónica túbulo intersticial, inducida por el medio ambiente fuertemente asociada a la ingesta oral de alimentos contaminados con OTA. La exposición humana a la ocratoxina A, ha sido revelada en algunos países de Europa mediante la detección en sangre de la micotoxina, indicando que la misma puede ser un factor causal de BEN. En Bulgaria, la exposición a OTA se ha evidenciado por una alta prevalencia de OTA que excede 2 ng/ml en la sangre de la población afectada. OTA también ha sido encontrada en mayor concentración en la orina de la gente que vive en áreas endémicas respecto a las áreas no endémicas (Petkova-Bocharova y col., 2003).

Por otro lado, los primeros indicios relacionados con la presencia de las **fumonisinas** se presentaron en 1970 en Sudáfrica, en donde hubo un brote de leucoencefalomalacia en caballos (ELEM) que se caracterizó por lesiones necróticas en la materia blanca del cerebro de estos animales y se lo relacionó al *Fusarium verticillioides* como el causante de dicho brote, confirmado luego cuando se aisló el hongo, la cepa MRC 826 del *F. verticillioides*, que causó ELEM en experimentos realizados en caballos y edema pulmonar en cerdos. Sin embargo, como el maíz es la principal materia prima que puede presentar contaminación por fumonisinas, es factible considerar que la presencia de manifestaciones tóxicas debido a su ingesta se remontaría a 8000 años atrás, ya que en la zona de México la vida de los aztecas (Figura 2) giraba alrededor del cultivo de maíz y su calendario anual estaba estrechamente relacionado con esa actividad (Janick, 2002).



Figura 2. Culto al maíz por parte de los aztecas

En la región de Transkei en Sudáfrica, en donde el hongo es altamente prevalente en el maíz y en donde este producto, es una de las principales fuentes de alimentación, se observó una alta incidencia de cáncer de esófago, respecto a aquellas regiones con bajo consumo de maíz hecho que se refleja a través de distintos estudios entre 1976 y 1989 (Marasas, 2001).

Recién en 1988 se logró aislar y determinar la estructura química de las fumonisinas y en consecuencia conocer la actividad biológica de la fumonina B₁, ya que hasta el momento los estudios de actividad biológica se hacían con los cultivos del hongo (Bezuidenhout y col., 1988).

Durante el otoño de 1989 y el invierno de 1990, numerosos casos de ELEM se registraron en distintas regiones de Estados Unidos en zonas donde había contaminación natural con *Fusarium verticillioides* en maíz, con rangos de contaminación por FB₁ desde < 1 ppm a 126 ppm, conteniendo gran parte de las muestras niveles por encima de 10 ppm (Ross y col., 1991).

Esta tesis se va a centrar, dada su importancia, en ocratoxinas y fumonisinas.

I.2. Estructuras y propiedades

I.2.1. Ocratoxina A

Las **ocratoxinas** son metabolitos de hongos que constituyen un grupo de compuestos derivados de la isocumarina unida a la L-fenilalanina.

El primer compuesto descubierto fue la ocratoxina A (C₂₀ H₁₈ Cl NO₆, PM=403,82 g/mol). Esta micotoxina cuando está pura, es un compuesto cristalino e incoloro, su nombre químico es 7-carboxil-5-cloro-8-hidroxil-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina-7-L-β-fenilalanina (CAS N° 303-47-9); sinónimo: OA, OTA. El espectro de absorción ultravioleta, que varía con el pH y la polaridad del solvente, muestra un máximo a 213 nm y 332 nm en etanol (ε=36800 y 6400, respectivamente). La absorbancia en el espectro de emisión de fluorescencia puede ser observada a 428 nm en etanol absoluto.

En 1965, Van der Merwe incluía ya la ocratoxina A (OA), B (OB), C (OC), 4-hidroxiocratoxina A (OA_OH), ocratoxina α (Oα), ocratoxina β (Oβ) y la forma abierta de la ocratoxina A (OP_OA) en esta familia.

Hay actualmente identificadas, 9 diferentes ocratoxinas (Figura 3 y Tabla 1): ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, éster metilo de ocratoxina A, éster metilo de ocratoxina B, éster metilo de ocratoxina C, ocratoxina α, ocratoxina β, 4 R-hidroxiocratoxina A, 4 S-hidroxiocratoxina A, hidroxio cratoxina A, siendo, la ocratoxina A la más común y la de mayor importancia para la salud humana.

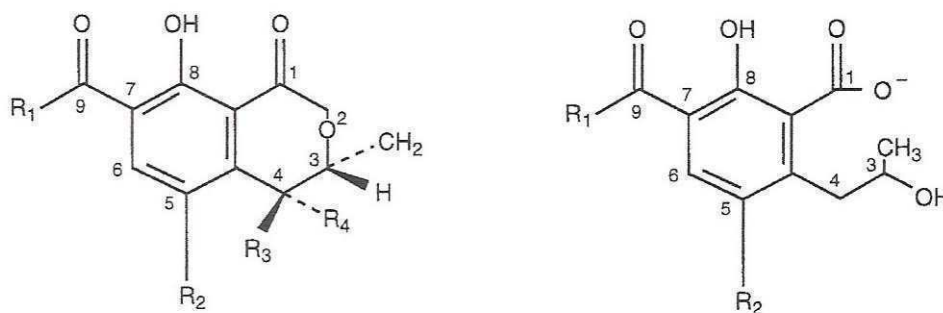


Figura 3. Estructura de ocratoxina A OTA (izquierda) y su análogo (derecha): estructura abierta de ocratoxina A (OP-OA)

La OTA es soluble en solventes orgánicos como acetonitrilo, metanol y acetato de etilo, moderadamente soluble en cloroformo y metanol y poco soluble en agua.

Cuando se cristaliza a partir de benceno su punto de fusión es de 90 °C, conteniendo una molécula de benceno. Cuando cristaliza en forma pura a partir de xileno su punto de fusión es de 168 °C.

El valor del pKa de OTA es de 7,1 y es estable en soluciones alcohólicas pero es destruída por radiación UV y ácidos fuertes. La α quimotripsina y la carboxipeptidasa A hidrolizan la OTA para dar origen a ocratoxina α y fenilalanina. La toxina es estable al calor en soluciones neutras pero es hidrolizada en medio alcalino cuando se calienta.

Tabla 1. Estructura de las ocratoxinas identificadas

Nombre común	Abreviaturas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ocratoxina A	OTA	Fenilalanina	Cl	H	H	H
Ocratoxina B	OB	Fenilalanina	H	H	H	H
Ocratoxina C	OC	Fenilalanina-etil ester	Cl	H	H	H
Ocratoxina α	O α	OH	Cl	H	H	H
Ocratoxina β	O β	OH	H	H	H	H
4 R- hidroxiocratoxina A	4 R-OTA-OH	Fenilalanina	Cl	H	OH	H
4 S- hidroxiocratoxina A	4 S- OTA-OH	Fenilalanina	CL	OH	H	H
10- hidroxiocratoxina A	10-OTA-OH	Fenilalanina	CL	H	H	OH
Ocratoxina A abierta	OP-OA	Fenilalanina	CL	-	-	-

I.2.2. Fumonisinias

La fumonisina B₁ (FB₁) es producida principalmente por *Fusarium verticillioides*. Bezuidenhout y col. (1988) describen a la toxina como un sólido amorfo con un punto de fusión de 103 a 105 °C con una rotación óptica $[\alpha]_D$ de -28 ° (2 mg/ml en agua). Por espectrometría de masas (EM), se han obtenido una relación masa/carga (m/z) de 721 para FB₁ (C₃₄H₅₉NO₁₅) y una relación m/z de 706 para FB₂ (C₃₄H₅₉NO₁₄). Las fumonisinas al ser compuestos fuertemente polares, son solubles en agua, en mezclas de acetonitrilo:agua (1:1, v/v) y muy solubles en metanol, pero nada solubles en disolventes no polares. La FB₁ es la más polar de todas las fumonisinas. En solventes polares la FB₁ se presenta como zwitterion debido a los grupos carboxílicos, los cuales tienen cargas positivas y negativas, también debido a la presencia de un grupo amino en C-1. La estructura química de las fumonisinas (Figura 4) indica la existencia de un gran número de estereoisómeros. Entre ellos, FB₁ es la forma molecular predominante producida por *F. moniliforme* actualmente conocido como *F. verticillioides*; fumonisina B₂ (FB₂) y fumonisinas B₃ (FB₃) son tan activas como FB₁ pero aparecen en menor concentración; N- acetil derivado de la FB₁ se lo abrevia como FA₁ y el derivado de FB₂ como FA₂, éstas no presentan toxicidad. (Šegvić, 2001). Los 28 análogos de fumonisinas (Tabla 2) que han sido caracterizados desde 1988 pueden ser separados en 4 grupos principales identificados como fumonisinas A, B, C y serie P. La serie B de las fumonisinas son ésteres de 2-amino-12,16-dimetil-14,15-dihidroxicosano y propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico. Las fumonisinas B₁ tienen grupos hidroxilos en C-3, C-5 y C-10. Fumonisinias B₂ y B₃ son isómeros con grupos hidroxilos en C-3, C-5 y C-3, C-10. La fumonisina B₄ tiene un grupo hidroxilo menos FB₂ y FB₃. La fumonisina C ha sido también aislada y difiere de FB₁ en la falta de grupo metilo en C-1, el cual es característico de otras fumonisinas.

Las fumonisinas de la serie B agrupan las más importantes desde el punto toxicológico FB₁, FB₂, FB₃, siendo ya mencionado que FB₁ es la más predominante y usualmente se encuentra en altos niveles. Comúnmente, FB₁ constituye el 70-80% del total de los fumonisinas producidas, mientras FB₂ entre 15-25 % y FB₃ 3-8 % cuando se cultiva sobre maíz o en medio líquido. Además de la serie B algunos otros análogos pueden ocurrir en el maíz contaminado naturalmente a bajas

concentraciones (<5 % del total de las fumonisinas presentes); éstas formas que están a más baja concentración no son detectadas por la mayoría de las técnicas analíticas debido al proceso de derivatización pero pueden ser detectadas por cromatografía líquida - espectrometría de masa con ionización por electrospray (Marasas, 2001).

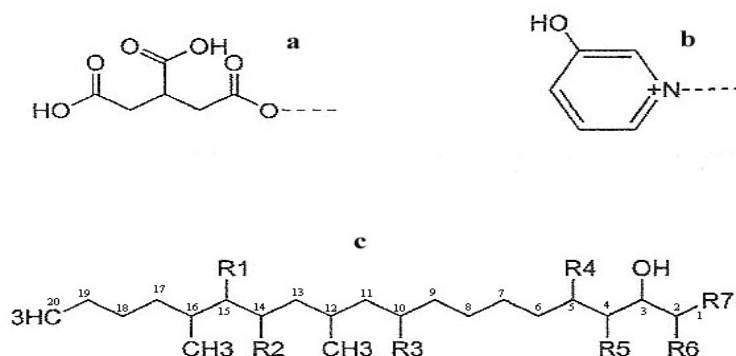


Figura 4. Estructuras de las fumonisinas. **a.** ácido tricarbálico; **b.** 3-hidroxipiridinium (3HP); **c.** estructura básica de las fumonisinas

Tabla 2. Análogos de las fumonisinas (Rheeder y col., 2002)

Análogo	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
FA ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FA ₂	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FA ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
PH FA _{3a}	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
PH FA _{3b}	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
H FA ₃	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FAK ₁	=O	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
FBK ₁	=O	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃

FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
Iso- FB ₁	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	CH ₃
PH FB _{1a}	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
PH FB _{1b}	OH	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
HFB ₁	OH	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₂	TCA	TCA	H	OH	H	NH ₂	CH ₃
FB ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	CH ₃
FB ₄	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	CH ₃
FB ₅							
FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
N-acetil FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃
Iso- FC ₁	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	CH ₃
N-acetil-iso- FC ₁	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	H
OH- FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH ₂	H
N-acetil-OH- FC ₁	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH ₃	H
FC ₃	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	H
FC ₄	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	H
FP ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH ₃
FP ₂	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH ₃
FP ₃	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH ₃

NCM FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH (C ₂ H ₃ O ₂)	CH ₃
ND FB ₁	TCA	TCA	OH	OH	H	NH (C ₆ H ₁₁ O ₅)	CH ₃
PBFB ₁	TCA ⁽¹⁾	TCA ⁽²⁾	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃
TBFB ₁	TCA ⁽¹⁾	TCA ^{(3) (*)}	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃

Los aminoácidos o la glucosa puede unirse a TCA⁽¹⁾ en R₁ o R₂.

TCA⁽²⁾: TCA-NH(CH₂)₄-proteína.

TCA⁽³⁾: TCA-NH-C₆H₉O₆-almidón.

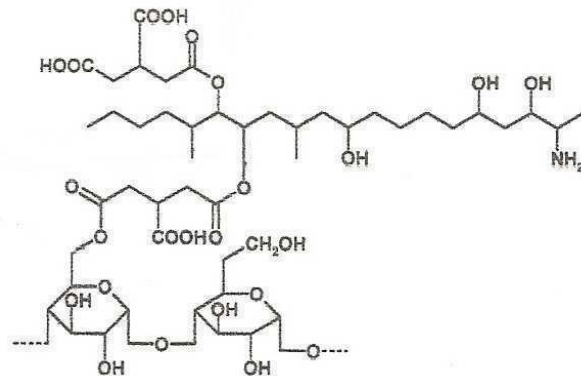
(*) TBFB₁ incluyen a las fumonisinas unidas a almidón, proteínas y otros componentes de la matriz.

FB₁ puede ser metilada y acetilada y además las fumonisinas sufren hidrólisis en presencia de HCl 6 M, NaOH, KOH y Ca(OH)₂ para obtener los ácidos tricarbónicos (1, 2, propanotricarbónicos) y los correspondientes aminopolioles (HFB₁) o los derivados parcialmente hidrolizados (PHFB₁ a y PHFB₁ b) (Miller y Marasas, 2002; Sydenham y col., 1985). Mackenzie y col. (1998) aislaron una nueva fumonisina del cultivo de *F. moniliforme* NRRL 13613, la cual fue llamada iso- FB₁ y difiere de FB₁, en la presencia de un grupo oxidrilo en C-4 en lugar que en C-5.

También se han descrito otros compuestos, producto de la unión de las fumonisinas a la matriz del alimento como FB₁ unida a proteínas, unida a almidón y a otros componentes de la matriz como los ácidos grasos (Figura 5). La unión se lleva a cabo por reacción del ácido tricarbónico de la cadena lateral con los aminoácidos (especialmente lisina y cisteína) a través del grupo amino o sulfhidrilo (PBFB₁); con hidratos de carbono a través del grupo oxhidrilo o eventualmente con ácidos grasos (Shier y col., 2003). Seefelder y col. (2001, 2003) lograron preparar FB₁ unida a lisina o cisteína y también unida a glucosa vía el TCA. Lo que demuestra la posibilidad que esos compuestos se obtengan durante el procesamiento del maíz. La presencia de productos de reacciones de pardeamiento no enzimático también se han detectado, ya que las fumonisinas son capaces de reaccionar con el grupo carbonilo del azúcar reductor formando una base de Schiff para dar lugar al N-(carboximetil) FB₁ (NCM-FB₁), el principal producto de reacción cuando FB₁ es calentado en solución acuosa

de azúcares reductores. Recientemente, Poling y col. (2002) describen N-(1-deoxi-D-fructosa-1-il) FB₁ (NDFB₁) como el primer producto estable formado después del reordenamiento de Amadori de la base de Schiff. También Howard y col. (1998) concluyeron que el N-(carboximetil) FB₁ fue el principal producto de reacción cuando FB₁ fue calentado en solución acuosa de azúcares reductores.

a.



b.

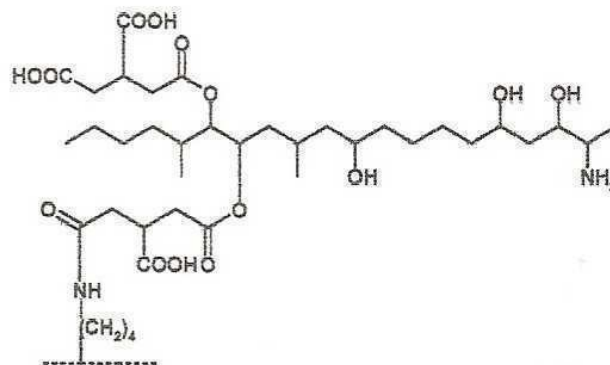


Figura 5 a. Fumonisina B₁ unida a proteínas (PBFB₁); **b.** unida a almidón

Las fumonisinas unidas a aminoácidos o a proteínas (PBFB) son extraíbles con detergentes que solubilizan proteínas. Las fumonisinas unidas, ya sea a proteínas, a almidón o a otros compuestos de la matriz constituyen las fumonisinas unidas totales (TBFB). Tanto ambas PBFB como TBFB son susceptibles de ser hidrolizadas con KOH (Figura 5).

I.3. Especies productoras de Ocratoxina A

Las especies productoras de OTA pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Dentro del género *Aspergillus* los que producen la ocratoxina A se puede dividir en dos grupos distintos: a) el primero incluye especies productoras de conidios marrón dorado, clasificadas en *Aspergillus* sección *Circumdati* y relacionadas con *A. ochraceus*, b) el segundo incluye especies productoras de conidios negros, clasificadas dentro de la sección *Nigri* de la cual el *A. carbonarius* es la más importante.

I. 3.1. Especies de *Aspergillus* perteneciente a la sección *Circumdati*

Diez especies clasificadas en la sección *Circumdati* fueron aceptadas como productoras de ocratoxina A por Frisvad y col. (2004a) La mayoría son raras en la naturaleza o por lo menos infrecuentes en alimentos y probablemente no contribuyen al nivel de ocratoxina A en la dieta de animales y del ser humano. *Aspergillus cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobosus*, *A. sulphureus* y *A. muricatus* (estado sexual de *Neopetromyces muricatus*) se ajustan a esa categoría. El *Aspergillus alliaceus* (estado sexual *Petromyces alliaceus*), no clasificado generalmente en la sección *Circumdati*, pero morfológicamente pertenece a la misma, también produce ocratoxina A pero no se encuentra en alimentos.

El *Aspergillus sclerotiorum* es algo más común en alimentos pero los aislamientos producen bajos niveles de Ocratoxina A. El *Aspergillus ochraceus*, considerado tradicionalmente como una especie común con morfología algo variable, se ha dividido recientemente en tres especies. *Aspergillus ochraceus sensu stricto* es considerada por Frisvad y col. (2004b) como algo infrecuente. Su papel en sentido restricto puede o no ser importante en términos de la salud humana. Dos especies recientemente diferenciadas de *A. ochraceus* se consideran ahora como las especies principales de la sección *Circumdati* que contribuyen con ocratoxina A a la dieta humana. La primera de estas especies es *A. westerdijikiae*; según los mismos autores, éste es el nombre correcto para *A. ochraceus* "original" de Sudáfrica que condujo al descubrimiento de las ocratoxinas. El *A. westerdijikiae* difiere de *A. ochraceus* por su incapacidad de crecer a 37 °C y por producir esclerocios de color blanco a crema, a diferencia de los esclerocios púrpuras de *A. ochraceus*.

A. westerdijkiae es una especie común y produce elevadas cantidades de ocratoxina A. La segunda nueva especie, *A. steynii*, también se diferencia de *A. ochraceus* por su incapacidad de crecer a 37 °C y de *A. westerdijkiae* por producir conidios elipsoidales y de color amarillo claro. La mayoría de los aislamientos de *A. steynii* producen grandes cantidades de la ocratoxina A, y son especies que ocurren comúnmente. La mayor parte del trabajo bioquímico realizado con *A. ochraceus* ha sido en realidad sobre el *A. westerdijkiae*, pero estas tres especies son lo suficientemente parecidas como para que ese trabajo conserve su valor. El nombre *A. ochraceus* es probable que se siga utilizando para las tres especies en muchos informes aún en el futuro.

I.3.2. Especies de *Aspergillus* pertenecientes a la sección *Nigri*

Samson y col. (2004) encontraron que cuatro especies en la sección *Nigri* (los aspergilos negros) son capaces de producir ocratoxina A. Dos de estas especies fueron descritas como nuevas por estos autores. Uno de éstos, *A. sclerotiumniger*, es conocido por un solo aislamiento. El segundo, *A. lacticoffeatus*, es también muy infrecuente y puede ser sólo un mutante de color pálido de *A. niger*. Sin embargo, los tres aislamientos conocidos de *A. lacticoffeatus* producen ocratoxina A. El productor principal de la ocratoxina A entre los aspergilos negros es *A. carbonarius*. Esta es una especie bien conocida y definida, pero los informes de su capacidad de producir ocratoxina A aparecieron por primera vez en 1995 (Horie, 1995). Virtualmente todos los aislamientos de esta especie producen ocratoxina A.

El cuarto productor de ocratoxina A es *A. niger*, pero solamente un porcentaje muy bajo (el 6% ó menos) de las verdaderas cepas de *Aspergillus niger* producen ocratoxina A (Abarca y col, 2003; Pardo y col., 2004).

Otros aspergilos negros de ocurrencia común en alimentos son *A. japonicus*, que se diferencia por la presencia de fiálides en la observación microscópica y *A. tubingensis*, que se diferencia de *A. niger* por métodos moleculares. Ninguna de estas especies produce ocratoxina A.

I.3.3. Especies de *Penicillium* que producen ocratoxina A

Algunos aislamientos considerados previamente como *Penicillium verrucosum* se han separado en otra especie, *P. nordicum* mostraron que los aislamientos de *P. nordicum* también producen ocratoxina A (Larsen y col., 2001; JECFA, 2001).

P. verrucosum y *P. nordicum* están clasificados dentro del subgénero *Penicillium* y se relacionan muy de cerca en aspecto y fisiología. Sin embargo, mientras que el *P. verrucosum* ocurre principalmente en cereales en zonas frías, el *P. nordicum* se ha informado que ocurre en alimentos proteínicos tales como salame, jamón y queso. El *P. nordicum* parece ser una fuente de mayor importancia de ocratoxina A en carnes en comparación con el *P. verrucosum* que es el mayor productor de OTA en climas fríos en cereales (Lund y Frisvad, 2003).

I.3.4. Fisiología y ecología de los hongos productores de ocratoxina A

Los grupos principales de hongos productores de ocratoxina A tienen fisiología absolutamente distintas y por lo tanto hábitats ecológicos absolutamente diversos. Para predecir la ocurrencia de ocratoxina A en los distintos alimentos es necesario entender la fisiología y la ecología de las especies productoras y las diferencias entre ellas.

I.3.4.1. *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum*

Penicillium verrucosum es una especie de crecimiento lento bajo cualquier condición, pero capaz de crecer a baja actividad de agua (a_w menor a 0.80) y a baja temperatura (entre 0 y 31 °C, óptimo 20 °C) (Pitt y Hocking, 1997). La fisiología de *P. nordicum* se ha estudiado poco, pero como se relaciona de cerca con *P. verrucosum*, se puede esperar que tenga características fisiológicas similares. Particularmente, crece pobremente o no crece, a 30 °C, por lo tanto como el *P. verrucosum* crece solamente a temperaturas más bajas. Los cereales son su hábitat más importante, y se extiende a través de Canadá y de Europa del Norte y Central. De hecho parece ser infrecuente en climas cálidos o en otras clases de alimentos. La ocurrencia de esta especie en

cereales europeos tiene dos consecuencias: la ocratoxina A está presente en distintas clases de productos derivados de cereal, especialmente pan y de alimentos a base de harina y está presente en los animales que comen cereales como componente importante de su dieta ya que el pan y otros productos derivados de cereal y carne de cerdo son componentes importantes de la dieta europea, la consecuencia posterior es que se han demostrado concentraciones apreciables de ocratoxina A en la sangre de la mayoría de los europeos evaluados (Hald, 1991). No hay duda que estos resultados son consecuencia del crecimiento de *P. verrucosum* en cereales.

Cuando se estudió la micoflora de uvas usadas para la producción de una clase particular de vino de postre, Torelli y col. (2006) informaron la identificación de 379 cepas de especies de *Penicillium*. Ninguna fue *P. verrucosum* o *P. nordicum* lo que indica que posiblemente las especies de *Penicillium* no son responsables de la presencia de OTA en uvas y sus productos derivados.

Penicillium nordicum se ha encontrado como se mencionó anteriormente en productos derivados de la carne (salame, jamón, salchicha, carne de pollo) y en queso. Parece estar mucho más extensamente distribuido que *P. verrucosum*, pero en casi todas las fuentes divulgadas han sido en productos mantenidos refrigerados durante su fabricación.

Ha habido pocos estudios sobre su ecología. Durante 1 año de encuesta sobre siete instalaciones fabriles de jamón en Europa, Battilani y col. (2007) aislaron hongos potencialmente productores de micotoxinas del aire de la fábrica y de la superficie de los jamones que se curan, de 19 000 hongos examinados, más del 90 % de los aislamientos fueron especies de *Penicillium*. Cuando 300 de estos aislamientos, muestreadas al azar, fueron identificados como especies, 10% fueron *P. nordicum* y cuando fueron probadas para la producción de OTA en medios de cultivos, 50 % fueron positivas o productores de esta toxina. Escher y col. (1973) encontraron ocratoxina A en jamones curados secos; el trabajo de Battilani y col. (2007) sería una explicación de esta contaminación.

I.3.4.2. *Aspergillus ochraceus* y especies relacionadas

Aspergillus ochraceus se ha descrito como una especie xerófila mesofílica. El crecimiento ocurre entre 8 °C y hasta aproximadamente 40 °C, con un óptimo entre 24 °C y 31 °C. Las condiciones óptimas para el crecimiento son a_w entre 0,95 y 0,99, mientras que el límite más bajo para el crecimiento es a_w 0,79 en los medios que contienen azúcares y por debajo de a_w 0,81 en los medios basados en cloruro de sodio. *Aspergillus ochraceus* crece lentamente a pH 2,2 y bien entre pH 3 y 10. Poco se sabe sobre la fisiología de *A. westerdijkiae* o *A. steynii*, salvo que ellos no crecen a 37°C. Otros parámetros que gobiernan el crecimiento se pueden esperar que sean similares a aquellos para *A. ochraceus*. De hecho, ciertos datos publicados sobre la fisiología de *A. ochraceus* han utilizado cepas ahora clasificadas como una de estas dos especies.

Debido a que *A. westerdijkiae* y *A. steynii* se han diferenciado del *A. ochraceus* solamente recientemente, la ecología divulgada sobre *A. ochraceus* es realmente el de estas tres especies. Se han aislado de una amplia gama de productos alimenticios, pero son más comunes en alimentos secados y almacenados. Los alimentos almacenados, en los cuales estas especies han sido aisladas (reportados como *A. ochraceus*), incluye pescados secados y salados, alubias secas, soja, garbanzos, pimienta, frutos secos y semillas de sésamo. Las nueces son también una fuente importante, especialmente el pecan y pistachos, así como el maní y las avellanas. Los informes de los cereales y de los productos derivados de cereal han sido infrecuentes, pero los informes incluyen arroz, cebada, maíz, trigo, harina y salvado. Estas especies también se han encontrado en queso, especias, aceitunas negras, mandioca y carnes procesadas. Numerosos estudios han detectado *A. ochraceus* en granos de café verde (Cantafora y col., 1983; Levi y col., 1974; Studer-Rohr y col., 1994; Taniwaki y col., 1999). Aunque estas especies son una fuente de la ocratoxina A en café, los estudios indican que *A. carbonarius* es una fuente importante de ocratoxina A en café de la mayoría de los países que lo producen. *Aspergillus ochraceus* ha sido aislado de una variedad de materias primas del sudeste asiático incluyendo maíz, maní, soja y otras habas (Taniwaki y col., 1999). Su presencia o ausencia en cualquier muestra fue relacionada probablemente con el tiempo de almacenaje más bien que con la localización geográfica u otros factores (Pitt y col., 1993, 1994, 1998).

I.3.4.3. *Aspergillus carbonarius* y *A. niger*

La capacidad de *A. carbonarius* para producir ocratoxina A fue divulgado solamente hace 12 años pero su importancia es actualmente muy reconocida (Heenan y col., 1998; Téren y col., 1996; Varga y col., 1996). Esta especie se asemeja al *A. niger* en muchas características, y las dos especies se relacionan de hecho muy de cerca. *Aspergillus carbonarius* difiere de *A. niger* en la producción de grandes esporas, aunque existen otras diferencias morfológicas de menor importancia. *Aspergillus carbonarius* crece en temperaturas algo más bajas que *A. niger*, con un máximo alrededor de 40 °C y condiciones óptimas a 30 °C (Leong y col., 2006c; Romero y col., 2007). La capacidad de crecer a reducida a_w está también más restringida: la germinación ocurre por debajo de una a_w de 0,85 a 25 y 30 °C. La producción máxima de la ocratoxina A se ha estudiado que ocurre a 15 °C y entre un valor de a_w de 0,95 - 0,98. La producción de OTA es muy baja por encima de 25 °C. La ocratoxina A fue producida en un amplio rango de pH, de 2 ó 3 a 10 (Esteban y col., 2006). *Aspergillus niger* crece muy bien a temperaturas relativamente altas, con un mínimo de crecimiento entre 6 y 8 °C, y un máximo entre 45 y 47 °C y condiciones óptimas entre 35 y 37 °C. *Aspergillus niger* es un xerófilo que germina con a_w de 0,77 a 35 °C. Las tasas de crecimiento varían solamente levemente en los medios basados en azúcares, cloruro de sodio o glicerol o en medios de pH 4,0 y 6,5, a distintas actividades de agua; es decir que el crecimiento de *A. niger* parece ser afectado poco por el tipo del alimento. *Aspergillus niger* puede crecer por debajo de pH 2,0 y a alta a_w .

Otras especies del *Aspergillus* negro ocurren comúnmente en los alimentos, especialmente *A. tubingensis* y *A. japonicus*, pero estas especies no producen ocratoxina A. Su fisiología parece ser ampliamente similar a la de *A. niger*.

Aspergillus carbonarius, *A. niger* y *A. japonicus* aparecen juntos en alimentos y superficialmente se ven similares, así que muchos estudios en alimentos no permiten diferenciar estas tres especies, llamadas todas aspergilios negros, *A. niger*.

Las especies negras de *Aspergillus* tienen una alta resistencia a la luz del sol y a la luz ultravioleta y crecen a temperaturas relativamente altas (Leong y col., 2006a; Rotem y Aust, 1991). Son también tolerantes al medio ácido y prefieren una actividad de agua

algo reducida (Leong y col., 2006b). Por todas estas razones, un hábitat importante para los aspergилios negros está en las uvas, pero no se ha demostrado que las especies de *Aspergillus* sean primariamente patógenas (Snowdon, 1990, 1991). La evidencia es que pueden invadir solamente las uvas dañadas. La inclusión de uvas dañadas en el momento de la cosecha, tardanza en el prensado de la uva son condiciones que permiten un continuo crecimiento de los aspergилios negros, y en consecuencia los vinos contengan OTA en bajos niveles de concentración. La producción de la toxina se detiene cuando el oxígeno es removido del mosto al comienzo de la fermentación. Cuando las uvas son procesadas para producir pasas de uva, los aspergилios negro continúan su crecimiento, a medida que las uvas son secadas al sol sin preservativos. Las uvas desecadas (pasas, sultanas) pueden por lo tanto contener niveles inaceptables de la ocratoxina A y han demostrado que *A.carbonarius* es la fuente principal de la ocratoxina A en vinos y en otros productos de la uva a través del mundo (Iamanaka y col., 2005). La incidencia de daño de la fruta, de temperaturas altas en la cosecha, junto con la práctica de cosecha tardía para la vinificación, contribuye al nivel de ocratoxina A en vinos y en productos desecados de la uva. La contaminación de cereales con ocratoxina A ocurre solamente en zonas de temperaturas frías, como resultado de la invasión por *P. verrucosum*. Aunque la ocratoxina A fue encontrada de vez en cuando en cereales almacenados mucho tiempo, debido a la presencia del *A. ochraceus* (o uno de sus parientes cercanos), esto no ocurre en forma frecuente. *Aspergillus niger* es en gran medida la especie más común perteneciente al género *Aspergillus* responsable del decaimiento post-cosecha de la fruta fresca, incluyendo manzanas, peras, melocotones, frutas cítricas, uvas, higos, frutillas, mangos, tomates y melones y algunos vegetales, especialmente cebollas, ajo y batata (Sydenham y col., 1993; JECFA, 2001). No está claro si *A.carbonarius* aparece junto con *A. niger* en estos alimentos frescos. La mayor parte de estas contaminaciones son esporádicas y de menor importancia. Excepto el caso en que las frutas se utilizan para el procesamiento; las putrefacciones debido al *A. niger*, no se consideran un problema de salud pública, finalmente se desecha la fruta mohosa.

Aspergillus niger se aísla también con frecuencia de otros productos secados al sol, tales como los pescados secados y curados, los granos de cacao y especias.

Aspergillus niger está entre los hongos más comúnmente aislados durante los estudios en los alimentos del sudeste asiático. La contaminación más alta se observó en maní, maíz, pimienta y especias de Indonesia, de Tailandia y de las Filipinas y en nueces “kemiri” de Indonesia.

En términos de producción de micotoxina, *A. niger* es considerado como un hongo benigno y ha sido ampliamente utilizado en el procesamiento de alimentos. Sin embargo, un porcentaje bajo (el 6%) de los aislamientos de *A. niger* podrían producir ocratoxina A.

I.4. Especies productoras de fumonisinas

Los hongos del género *Fusarium* son patógenos comunes del maíz (*Zea mays* L.); siendo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sinónimo *Fusarium moniliforme* Sheldon) y *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg dos especies de la sección *Liseola* que están en todo el mundo asociada con enfermedades del maíz y ambas son productoras de fumonisinas.

Quince especies de *Fusarium* producen fumonisinas; ocho de las cuales están en la sección *Liseola*: *F. verticillioides*, *F. sachari*, *F. fujikuroi* Nirenberg, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. anthophilum*, *F. globosum*.; cinco especies de la sección *Dlaminia*: *F. nygamai*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. andiyazi*, *F. pseudonygamai*; una especie de la sección *Elegans*: *F. oxysporum*; una especie de la sección *Arthrosporiella*: *F. polyphialidicum*. Fuera del género *Fusarium* se ha mencionado en un solo trabajo que *Alternaria alternata*, produce fumonisinas: FB₁, FB₂, FB₃.

Chulze y col. (1996) evaluaron la contaminación con *Fusarium* sección *Liseola* y los niveles de fumonisinas en granos de maíz cosechado en la provincia de Córdoba en distintos estadios de la maduración; los resultados de ese estudio muestran que *F. subglutinans* fue la especie prevalente durante el primer estadio (60 días después de florecimiento) mientras que *F. verticillioides* se convierte en la principal especie en los últimos estadios de la maduración (desde 90 días después del florecimiento hasta

la cosecha). *F. proliferatum* fue encontrado con más alta frecuencia en los estadios intermedios, ej. 75-90 días después del florecimiento.

También estudios realizados en Argentina durante 2000/2001 y 2002/2003 mostraron diferencias en los niveles de fumonisinas desde 1,93 a 5,63 ppm y de 0,18 a 0,063 ppm para Bt maíz Bt y de híbridos isogénicos respectivamente (Wu y col., 2004).

La mayoría de los aislamientos o cepas de *F. verticillioides* muestran que producen fumonisinas; registrándose los niveles más altos producidos por estas cepas en Sudáfrica 17900 mg/kg, China 10200 mg/kg y Argentina 8160 mg/kg (Sydenham y col., 1991a, 1993; Yoshizawa y col., 1994).

Otros estudios muestran que otras especies de *Fusarium* producen (o son productoras) FB₁ como *F. napiforme* y *F. nygamai*.

El *Fusarium verticillioides* es probablemente el patógeno más común de la mazorca de maíz en todo el mundo. El daño (Figura 6) se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas de la mazorca. Los granos infectados desarrollan un cubierta algodonoso o rayas blancas en el pericarpio.



Figura 6. Maíz contaminado por *Fusarium verticillioides*: se pueden observar micelios y líneas blancas sobre el grano

I.5. Niveles de contaminación

I.5.1. Ocratoxina A

Distintos son los alimentos que presentan contaminación por ocratoxina A, entre ellos los cereales (trigo, maíz, avena, mijo, centeno, cebada, arroz) y sus productos derivados como también el café, cerveza, vino, cacao, frutas secas, productos cárnicos especialmente derivados de cerdo, especias. En un trabajo realizado en la Unión Europea, se incluyeron 5180 muestras de cereales y sus productos derivados provenientes de los países europeos, el 55 % de las muestras presentaba OTA con rangos entre 0,005 y 33,3 µg/kg (Dinamarca) y con medias de 0,294 µg/kg (promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados incluidos aquellos que corresponden a niveles menores al LD en el cual el valor asignado fue LD/2 o menores al LQ pero mayores que el LD en el cual se le asignó el nivel de LQ/2), 0,484 µg/kg (promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ) (Task 3.2., 2002). En el caso del café, el porcentaje de positivos en café procesado fue más elevado respecto a café verde (46 vs 36 %) con rangos entre el LD de 0,01 µg/kg hasta 7,20 µg/kg. En cerveza, se encontraron un 39 % de resultados positivos, 0,05 µg/kg hasta 0,29 µg/kg. En vino tinto, se encontraron rangos de concentración que van desde el LD (0,010 µg/kg) hasta 15,6 µg/kg, en tanto que en vino blanco los rangos encontrados fueron entre el LD y 8,86 µg/kg en Italia. En cuanto al cacao, los valores encontrados en Europa van entre 0,01 a 3,6 µg/kg (Alemania); en frutas secas los rangos fueron entre 0,01 y 25,1 µg/kg en Gran Bretaña, mientras que en las especias los niveles variaron entre 0,1 y 16,43 µg/kg. En los productos derivados de carne de cerdo, el promedio de contaminación fue 0,013 µg/kg reemplazando los negativos por LD/2. A continuación se muestran los niveles de contaminación por OTA (Tablas 3 a 14) en algunos alimentos evaluados en distintos países europeos (Task 3.2, 2002).

Tabla 3. Ocurrencia de OTA en trigo

País	N° Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Dinamarca	145/247	0,27 (1)
		0,46 (2)
Finlandia	7/125	0,22 (1)
		1,31 (2)
Francia	1/22	0,28 (1)
		0,90 (2)
Alemania	10/27	0,04 (1)
		0,11 (2)
Italia	0/30	0,025 (1)
Noruega	47/193	0,33 (1)
		1,12 (2)
Portugal	0/34	0,17 (1)
Suecia	55/132	0,34 (1)
		0,73 (2)
Holanda	1/31	0,76 (1)
		8,70 (2)
Reino Unido	7/138	0,17 (1)
		1,90 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 4. Ocurrencia de OTA en maíz

País	N° Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Francia	1/18	0,30 (1)
		1,10 (2)
Alemania	14/31	0,17 (1)
		0,37 (2)
Italia	7/49	0,28 (1)
		1,49 (2)
Reino Unido	12/139	0,09 (1)
		0,50 (2)
España	1/30	0,25 (1)
		2,50 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ

Tabla 5. Ocurrencia de OTA en avena

País	N° Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Finlandia	0/7	0,1 (1)
Francia	0/1	0,25 (1)
Alemania	24/29	0,14 (1) 0,17 (2)
Noruega	15/72	0,35 (1) 0,59 (2)
Suecia	9/33	0,24 (1) 0,76 (2)
Reino Unido	1/22	0,35 (1) 5,90 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 6. Ocurrencia de OTA en centeno

País	N° Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Dinamarca	180/247	0,70 (1) 1,00 (2)
Finlandia	9/52	0,63 (1) 2,80 (2)
Alemania	12/26	0,05 (1) 0,10 (2)
Italia	0/42	0,05 (1)
Noruega	1/8	0,43 (1) 2,50 (2)
Suecia	33/47	1,05 (1) 1,47 (2)
Reino Unido	1/22	0,15 (1) 1,10 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 7. Ocurrencia de OTA en cebada

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Finlandia	4/21	0,20 (1) 0,40 (2)
Francia	1/7	0,50 (1) 2,0 (2)
Alemania	16/22	0,06 (1) 0,08 (2)
Italia	6/25	0,52 (1) 2,52 (2)
Reino Unido	7/67	0,31 (1) 2,30 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 8. Ocurrencia de OTA en café verde

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Finlandia	260/665	1,16 (1) 2,65 (2)
Francia	20/42	6,55 (1) 13,58 (2)
Grecia	17/44	16,14 (1) 25,20 (2)
Italia	132/564	1,21 (1) 4,29 (2)
Noruega	81/98	0,90 (1) 1,08 (2)
Gran Bretaña	110/291	0,80 (1) 1,95 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 9. Ocurrencia de OTA en arroz

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Francia	2/16	0,37 (1) 1,20 (2)
Alemania	2/22	0,07 (1) 0,25 (2)
Italia	0/1	0,25 (1)
España	0/24	0,25 (1)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 10. Ocurrencia de OTA en cacao

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Alemania	Chocolate dulce 297/352	0,10 (1) 0,12 (2)
	cacao 91/96	0,37 (1) 0,38 (2)
Holanda	0/6	0,13 (1)
Gran Bretaña	39/40	1,20 (1)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 11. Ocurrencia de OTA en café procesado

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Dinamarca	11/11	0,51 (1) 0,51 (2)
Finlandia	Tostado 17/86	0,51 (1) 0,89 (2)
	Instantáneo 32/40	1,61 (1) 1,97 (2)
Francia	Tostado 3/34	0,58 (1) 1,04 (2)

Francia (cont.)	Instantáneo 3/13	1,34 (1) 4,30 (2)
Alemania	Tostado 76/183	0,54 (1) 1,07 (2)
	Instantáneo 46/55	1,74 (1) 2,05 (2)
	Descafeinado 45/94	0,60 (1) 1,07 (2)
Grecia	Tostado 10/16	1,79 (1) 2,72 (2)
	Instantáneo 3/3	2,10 (1) 2,10 (2)
	Descafeinado 0/4	0,25 (1)
Italia	Tostado 49/198	0,55 (1) 1,80 (2)
	Instantáneo 3/13	0,4 (1) 1,03 (2)
	Café tostado descafeinado 0/2	0,05 (1)
	Café 0/2	0,125 (1)
Noruega	Tostado 17/86	0,51 (1) 0,89 (2)
	Instantáneo 32/40	1,61 (1) 1,97 (2)
Francia	Tostado 22/50	0,29 (1) 0,41 (2)
Portugal	Tostado 6/33	0,60 (1) 1,54 (2)
	Instantáneo 0/2	0,15 (1) 0,45 (2)
España	Tostado 29/29	1,17 (1) 1,17 (2)
	Instantáneo 9/9	0,50 (1) 0,50 (2)
Suecia	Café 19/20	0,16 (1) 0,17 (2)
	Café instantáneo 5/5	0,37 (1) 0,37 (2)

Holanda	Tostado 64/158	0,81(1) 1,54 (2)
	Instantáneo 6/15	1,33 (1) 2,77 (2)
Gran Bretaña	Tostado 17/20	0,60 (1) 0,70 (2)
	Café instantáneo 60/71	1,0 (1) 1,17 (2)
	Café descafeinado 4/9	0,50 (1) 1,06 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 12. Ocurrencia de OTA en cerveza

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Dinamarca	Instantáneo 21/21	0,05 (1) 0,05 (2)
Finlandia	8/13	0,03 (1) 0,06 (2)
Alemania	Cerveza de bajo contenido de alcohol 49/66	0,01 (1) 0,02 (2)
	Cerveza 39/251	0,03 (1) 0,03 (2)
Italia	Cerveza 0/14	0,01 (1)
	Cerveza doméstica 3/10	0,01 (1) 0,02 (2)
	Cerveza importada 27/51	0,02 (1) 0,04 (2)
Portugal	Cerveza 3/7	0,002 (1) 0,004 (2)
España	Cerveza de bajo contenido de alcohol 8/8	0,02 (1) 0,02 (2)
	Cerveza 29/30	0,04 (1) 0,04 (2)

Suecia	Cerveza 5/5	0,02 (1) 0,02 (2)
Gran Bretaña	Cerveza 0/20	0,1(1)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 13. Ocurrencia de OTA en vinos

País	Nº Postivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Finlandia	vino tinto 113/166	0,14 (1) 0,20 (2)
	vino Blanco 7/10	0,14 (1) 0,19 (2)
	Vino tinto derivado de fruta 0/2	0.03 (1)
	Vino Blanco derivado de fruta 0/1	0,03 (1)
Francia	Vinos domésticos 14/34	0,05 (1) 0,11 (2)
	Vinos importados 50/70	0.22 0.29
Alemania	Vino tinto 79/172	0,23 (1) 0,49 (2)
	Vino rose 18/51	0,14 (1) 0,31 (2)
	Vino blanco 12/56	0,10 (1) 0,43 (2)
	Vino dulce 1/1	1.04 (1) 1.04 (2)
Grecia	Vino tinto 21/38	0,16 (1)
	Vino rose 3/5	0,07 (1) 0,09 (2)
	Vino blanco 23/45	0,13 (1) 0,23 (2)
	Vino dulce 6/7	0,54 (1)

Italia	Vino tinto 210/244	1,29 (1) 1,49 (2)
	Vino blanco 7/20	0,59 (1) 1,70 (2)
	Vino rose 2/4	0,13 (1) 0,26 (2)
	Vino dulce 9/15	0,74 (1) 1,23 (2)
Portugal	Vino rose 0/30	0,01 (1)
	Vino dulce 0/31	0,01 (1)
España	Vino tinto 66/72	0,04 (1) 0,04 (2)
	Vino rose 24/26	0,03 (1) 0,03 (2)
	Vino blanco 35/43	0,03 (1) 0,03 (2)
	Vino espumante 10/12	0,01(1) 0,02 (2)
	Vino aperitivo 23/27	0,06 (1) 0,07 (2)
	Vino dulce 13/16	1,09 (1)
Suecia	Vino tinto 31/32	0,21 (1) 0,21 (2)
	Vino tinto 61/150	0,24 (1) 0,55 (2)
Holanda	Vino blanco 2/20	0,16 (1) 1,25 (2)
	Vino tinto 32/60	0,17 (1) 0,29 (2)
Gran Bretaña	Vino tinto 32/60	0,17 (1) 0,29 (2)
	Vino blanco 0/10	0,10 (1)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 14. Ocurrencia de OTA en frutas desecadas

País	Nº Positivos/ Total	Nivel de contaminación (µg/kg)
Finlandia	22/31	1,34 (1) 1,85 (2)
Francia	6/13	0,66 (1) 1,54 (2)
Alemania	100/106	1,28 (1) 1,35 (2)
Grecia	22/35	2,26 (1) 3,22 (2)
Gran Bretaña	115/120 pasa de uva	5,70 (1) 5,90 (2)

Scientific Cooperation Report for Experts Participating in Task 3.2.7. Enero 2002.

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Los niveles de contaminación en los cereales en general, fueron más altos en el Sur de Europa que en el Norte, mientras que el nivel de contaminación de OTA en el trigo fue más alto en el Norte que en el Sur de Europa; en cuanto al centeno, éste mostró el más alto nivel de contaminación con 50 % de muestras positivas y altos niveles de contaminación respecto al Sur (Italia). Los valores medios de contaminación de maíz en el Sur de Europa (Italia y España) fueron aproximadamente el doble de los encontradas en Europa (Alemania, Francia).

Los valores promedio de contaminación de los granos de café verde en el Sur de Europa fueron más altos que en el Norte, sin embargo el café procesado mostró valores promedio de contaminación de OTA más bajos en el Sur que en el Norte de Europa, observándose que en el Sur se obtiene aproximadamente un 71 % de reducción en la contaminación luego del procesamiento. Las condiciones del proceso de tostado son más drásticas para obtener las variedades Robusta y Arábica respecto del 54 % de reducción en el Norte de Europa.

Los valores de contaminación de cerveza no fueron muy elevados y no se encontraron diferencias entre el norte y el Sur de Europa.

En cuanto al vino si bien en el Sur de Europa, los niveles promedio de contaminación fueron mayores que en el Sur, la gran variedad de vinos evaluados y los distintos métodos de determinación empleados hacen difícil obtener una comparación clara

aunque se concluye que los vinos dulces y tintos serían los más contaminados. Los datos de cacao provienen solamente de tres países (Alemania, Países Bajos y Gran Bretaña) y mostraron bajos niveles de contaminación que se reduce aun más en el alimento procesado. En las frutas desecadas no se observan diferencias entre el Norte y el Sur de Europa y por los elevados valores encontrados de contaminación, se puede concluir que son alimentos muy susceptibles de estar contaminados. En las especias se encuentra una marcada diferencia entre los niveles de contaminación entre el Norte y el Sur (0,980 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. 4,659 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente). Además éstas fueron las que presentaron los niveles de contaminación (Tabla 15) más elevados entre todos los alimentos analizados.

Los alimentos contaminados con ocratoxina A se encontraron en gran cantidad en Europa, cerca del 57 % de 6476 muestras de alimentos que fueron examinados contenían ocratoxina A por encima del límite de detección (0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los más importantes ejemplos son los cereales y los productos derivados del cereal para los cuales la legislación europea ha recomendado que su nivel no supere 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Entre 2374 muestras de granos y de productos derivados de granos: centeno, trigo, cebada, avena, maíz el 1,4 % de muestras presentaron niveles por encima de 3 ppm de OTA. Las harinas contenían la mitad del nivel de contaminación encontrados en los granos. Durante el año 2004, se evaluaron en Turquía los niveles de contaminación por ocratoxina A en cebada, malta y cerveza. Se encontraron 26 muestras positivas sobre 29 muestras de cebada (0,53 a 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 23 muestras positivas sobre 24 muestras de malta con rangos entre 0.5 a 6.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en cerveza el contenido de OTA fue entre 0,1 a 8.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ en 42 de 150 muestras (28 %) y solamente una muestra de cerveza contenía más de 5 $\mu\text{g}/\text{l}$ de ocratoxina A (Gumus y col., 2004).

Entre los años 1998 y 2000 se analizaron en Canadá pasas de uva (n= 85) y uvas sultanas (n= 66) y dos muestras de uvas currants; el 85 % de las muestras de pasas de uva y el 59 % de las uvas sultanas tenían niveles de contaminación por OTA por encima de 0,1 ng/g. El nivel promedio de contaminación de OTA en pasas de uva y uvas sultanas fue de 1,8 ng/g; mientras que en uvas currants fue de 2,8 ng/g (Lombaert y col., 2004).

Tabla 15. Resumen de ocurrencia en Europa de Ocratoxina A en distintos alimentos (Task 3.2, 2002)

Alimento	Muestras positivas (%)	Niveles de contaminación (µg/kg)
Cereales en general	55	0,294 (1) 0,484 (2)
Trigo	28	0,269 (1) 0,700 (2)
Maíz	13	0,165 (1) 0,719 (2)
Avena	30	0,192 (1) 0,465 (2)
Centeno	53	0,597 (1) 1,095 (2)
Cebada	24	0,301 (1) 1,061 (2)
Arroz	6	0,217 (1) 0,725 (2)
Café verde	36	1,62 (1) 3,641 (2)
Café procesado	46	0,724 (1) 1,092 (2)
Cerveza	39	0,028 (1) 0,032 (2)
Vino	59	0,357 (1) 1,072 (2)
Cacao	81.3	0,236 (1) 0,277
Frutas desecadas	73	2,298 (1) 3,078 (2)
Productos derivados carne de cerdo	18	0,013 (1) 0,010 (2)
Espicias	52	1,15 (1) 5,06 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Se analizaron en Brasil distintas muestras de vinos provenientes de Argentina (n=12), Brasil (n=25), y Chile (n=5), se observa que el 23,8% de los vinos tenían concentraciones entre 28,3 y 70,7 ng/l. Los vinos tintos mostraron los más altos niveles de contaminación comparado con los vinos blancos y rosados. La más alta concentración se encontró en una muestra de vino tinto proveniente de Chile; solo los vinos blancos de Argentina presentaron contaminación.

En otro estudio más reciente en Argentina y Chile las muestra de vinos argentinos no presentaron contaminación (Pacin y col., 2005).

Cuando se analizaron maní, maíz y arroz en Cote d' Ivoire entre 1998 y el 2002 se observó que todos los materiales estaban contaminados, en maíz el rango fue entre 3 a 1738 µg/kg, en arroz 9 a 92 µg/kg y en maní entre 0,6-64 ug/kg (Sangare-Tigore y col., 2006, a,b).

En la provincia de Córdoba, Argentina se observó la ocurrencia de *Aspergillus* spp. en el 100 % de las muestras de maní, seguido de *Penicillium* spp. en 87 % y *Eurotium* spp en 6,4 %. La ocratoxina A se encontró en 32 % de las muestras de semillas de maní con rangos promedios entre 0,5 y 170 ng/g (Rosa y col., 2004; Magnoli y col., 2006a).

I.5.2. Fumonisin

Se han estudiado diversos sustratos para identificar la probabilidad de contaminación por fumonisin, encontrándose el maíz como la principal materia prima que puede presentar contaminación por fumonisin. En consecuencia, el conocimiento de los niveles de contaminación por estas toxinas tanto en maíz como en los alimentos derivados permite evaluar los potenciales riesgos que presenta la ingesta de estos alimentos. En la tabla 16 se presentan ejemplos de los niveles de contaminación por fumonisin en el maíz y en alimentos derivados de este cereal y algunas matrices en distintos países que presentaron relativamente alta contaminación (Lino y col., 2004).

Tabla 16. Niveles de fumonisinas en maíz en grano y en alimentos

País	Año	Tipo de alimento	Nivel de contaminación	Referencia
Argentina	1999	Copos de maíz	2-38 ng/g	Solovey y col., 1999
Belgica	2005	Copos de maíz	40-464 ng/g	Paepens y col., 2005
Brasil	2004	Copos de maíz	157-4530	Scaff y Scussel, 2004
Brasil	2000	Copos de maíz	hasta 660 ng/g	Machisnski y Soares, 2000
Brasil	1999 a 2000	Maíz para consumo humano	FB ₁ : 3,2 mg/kg FB ₂ : 3,4 mg/kg FB ₃ : 1,7 mg/kg	Whesthuizen y col., 2003
Brasil (Sao Paulo)	2000	Alimentos a base de maíz	FB ₁ : 1,1 a 15,3 mg/kg FB ₂ : 0,2 a 3,9 mg/kg	Bittencourt y col., 2005
		Harina de maíz	FB ₁ : 0,5 a 7,2 mg/kg FB ₂ : 0,1 a 1,8 mg/kg	
Brasil (Sao Paulo)	2000	Alimentos Infantiles a base de maíz	FB ₁ + FB ₂ + FB ₃ : 2242 µg/kg	Castro y col., 2004
Canadá	1997	Alimentos Infantiles	FB ₁ : 250 ng/kg FB ₂ : 125 ng/kg	Lombaert y col., 2003
Canadá	1998	Alimentos Infantiles	FB ₁ : 250 ng/g FB ₂ : 86 ng/g	Lombaert y col., 2003
Canadá	1999	Alimentos Infantiles	FB ₁ : 250 ng/g FB ₂ : 125 ng/g	Lombaert y col., 2003
Canadá	2003	Cereales para desayuno	FB ₁ : 68 ng/g FB ₂ : 8 ng/g	Kim y col., 2003
Canadá	1996	Cereales a base de maíz para desayuno	hasta 320 ng/g	Kuiper-Goodman y col., 1996
Canadá	2000	Copos de maíz	5, 8 ng/g	Lawrence y col., 2000
Canadá	1994	Bran de maíz	350 ng/g	Scott y Lawrence, 1994
Canadá	2004	Copos de maíz	8-237 ng/g	Park y col., 2004
China	1991	Maíz	FB ₁ : 30300 - 47900 µg/kg	Wedenborner, 2001
Corea	2002	Copos de maíz	21-165 ng/g	Kim y col., 2002
EE UU	-	Productos procesados a partir de maíz	FB ₁ : 0,16 ppm	Dombrinck-Kurtzman y Dvorak, 1999

EE UU	-	Cereales para consumo humano	FB ₁ : 0,028 a 2,679 mg/kg FB ₂ : 0,03 a 0,797 mg/kg	Gutema y col., 2000
EEUU	1991	Copos de maíz	no presentaron contaminación	Sydenham y col., 1991a
EEUU	1996	Copos de maíz	hasta 250 ng/g	Pohland, 1996
España	1994 a 1996	Maíz	FB ₁ : 3,3 µg/g FB ₂ : 1,7 µg/g	Castellá y col., 1999
España	2001	Copos de maíz	16,1-18,5 ng/g	Velluti y col., 2001
España	1994	Copos de maíz	hasta 100	Sanchis y col., 1994
Francia	-	Cereales para desayuno	FB ₁ : 7 - 1113 µg/kg	Molinie y col., 2005
Francia	2005	Cereales para desayuno	41 ng/g	Leblanc y col., 2005
Holanda	1998	Copos de maíz	1430 ng/g	De Nijs y col., 1998
Irán	1998	Maíz	FB ₁ : 1,270- 3,980 µg/g FB ₂ : 0,190 a 1,175 µg/g FB ₃ : 0,155 a 0,960 µg/g	Shepard y col., 2000
Italia	2003	Copos de maíz	FB ₁ : 54-350 ng/g	Cirillo y col., 2003
Italia	2005	Copos de maíz	7-32 ng/g	Faberi y col., 2005
Italia	1994	Copos de maíz	10 ng/g	Doko y Visconti, 1994
Italia	2001	Cereales para desayuno	14-1092 ng/g	Solfrizzo y col., 2001 a, b
Kenia	-	Maíz	FB ₁ : apenas 5 % de las muestras > 1000 ng/g Límite para consumo humano	Kedera y col., 1999
México	-	Productos procesados a partir de maíz	FB ₁ : 0,79 ppm	Dombrinck-Kurtzman y Dvorak, 1999
México (Sonora)	1998/1999 1999/2000	Maíz Maíz	FB ₁ : 1,1 a 4,8 µg/g FB ₂ : 0,4 a 4,4 µg/g	Cortez-Rocha y col., 2003
Nigeria	2001	Maíz	FB ₁ : 70 - 1780 µg/kg FB ₂ : 53 a 230 µg/kg	Bankole y Mabekoje, 2004
Portugal	1992	Maíz	FB ₁ : 2.3 - 90 µg/kg FB ₂ : 4.45 a 250 µg/kg	Doko y col., 1995
Portugal	1992	Té Café Plantas Medicinales	FB ₁ : 20 - 700 µg/kg	Martins y col., 2001

Reino Unido	-	Maíz	FB ₁ + FB ₂ + FB ₃ : > 1000 µg /kg	Scudamore y Patel, 2000
Reino Unido	1997	Cereales para desayuno	11-194 ng/g	Patel y col., 1997
Sudáfrica (Transkei)	1989	Maíz	FB ₁ : 0- 5380 ng/g FB ₂ : 0 - 1320 ng/g FB ₁ : 3020 - 117520 ng/g FB ₂ : 750 - 22960 ng/g	Thiel y col., 1992
Sudáfrica	1991	Copos de maíz	nd	Sydenham y col., 1991a
Suiza	1991	Productos procesados a partir de maíz	FB ₁ : 55 - 790 ng/g FB ₂ : 50 - 160 ng/g	Pittet y col., 1992
Taiwán	1997	Copos de maíz	140-1281 ng/g	Tseng y Liu, 1997
Turquía	-	Té de hebras Plantas medicinales	FB ₁ : 0,160 a 1487 µg/kg	Omurtag y Yazicioglu, 2004
Uruguay	1995 a 1996	Maíz no procesado Maíz procesado Snacks	FB ₁ : 3 688 ng/g FB ₁ : 155 ng/g FB ₁ : 314 ng/g	Piñeiro y col., 1997

Se observa que los más altos niveles de contaminación en maíz, se presentan en Sudáfrica (Transkei).

En alimentos procesados las concentraciones son marcadamente menores aunque en Francia, Molinie y col. (2005) analizaron una muestra de cereal para desayuno que contenía maíz y chocolate con una concentración de FB₁ de 1113 ng/g y que también tenía una alta concentración de OTA. Se ha informado también altos niveles de contaminación en copos, en Brasil, Holanda y Taiwan (Molinie y col., 2005).

En la Argentina (Tabla 17) son diversos los estudios publicados que muestran los resultados de los niveles de contaminación en maíz. En Gran Bretaña, Scudamore y Patel (2000) informaron contaminaciones de fumonisina B₁ de maíz proveniente de la Argentina con niveles de 0,5 a 5 mg/kg. Otros estudios realizados en el país en varias provincias muestran altos niveles de contaminación. Los estudios sobre alimentos procesados anteriores a esta tesis en el país incluyen el que figura en la Tabla 16

Tabla 17. Niveles de contaminación de maíz en la Argentina

Referencias	Zona	Niveles de Contaminación
1995 (Molinie y col., 2005)	Provincia de Buenos Aires, de Córdoba, de Santa Fé	FB ₁ : 460 -9950 µg/kg FB ₂ : 140 - 3060 µg/kg FB ₃ : 90 - 1020 µg/kg
1996 (Chulze y col., 1996)	Córdoba	FB ₁ : 2131 µg/kg (85 - 8.791 µg/kg) FB ₂ : 583 µg/kg (nd - 2267 µg/kg) FB ₃ : 261 µg/kg (nd - 980 µg/kg)
2001 (Torres y col., 2001)	Jujuy	FB ₁ : en dos de seis muestras nd - 1322 µg/kg FB ₂ : 1 muestra 319 µg/kg FB ₃ : 261 µg/kg nd
1999 (Pacin y col., 2001)	Entre Ríos	FB ₁ : 58 % de muestras de maíz 47 - 3347 µg/kg FB ₂ : 33 % 23 - 537 µg/kg FB ₃ : 25 % 24 - 287 µg/kg
2002 (Broggi y col., 2002)	Entre Ríos	14 muestras maíz. FB ₁ 1540 µg/kg (54- 5960 µg/kg) FB ₂ : 716 µg/kg (17 - 3080 µg/kg) FB ₃ : 152 µg/kg (8 - 669 µg/kg)
2003 - 2004 (Broggi y col., 2007)	Entre Ríos (Guauguaychú, Nogoyá, Victoria)	2003 Fumonisinias totales: 10.200 µg/kg 2004 Fumonisinias totales: 4700 µg/kg
1991 (Sydenham y col., 1993)	Provincia de Buenos Aires (9 de Julio, Pergamino)	Fumonisinias totales: 1585 - 9990 µg/kg

donde los niveles de fumonisina son bajos en copos de maíz (Solovey y col., 1999), mientras que en polenta el rango de contaminación de las muestras varió de 60 a 2860 µg/kg y el análisis de 19 muestras de harina y grits de maíz comprados en Buenos Aires desde octubre de 1996 a enero de 1997 con niveles nd a 1860 ng/g y las 16 muestras compradas en enero de 1998 con niveles entre 75 a 4987 ng/g (JEFCA, 2001).

I.6. Procesamiento

I. 6. 1. Ocratoxina A

Algunos estudios han examinado el efecto del procesamiento sobre la concentración de OTA en vino, café y cereales. El tostado de café reduce la concentración de OTA pero los porcentajes de reducción varían según las publicaciones. Un tostado suave causa una reducción de OTA entre 0 a 80 %. El tostado intenso, como el del café expreso, puede causar reducciones de OTA en más del 90 %. La limpieza, remoción del “bran” y horneado del trigo entero causa una reducción de un 75 % de OTA en pan blanco. La vinificación produce la reducción de OTA en vino, independientemente de la concentración de OTA inicial en uvas.

La extrusión de la harina de trigo entero contaminado por OTA resultó en una reducción no mayor al 40 % (JEFCA 2001, 2008).

I.6.2. Fumonisinas

En el mundo se producen aproximadamente 600 millones de toneladas de maíz por año y la mayor parte es usada para alimentación animal (63 %). Solamente el 25 % es procesado a alimentos (para el hombre) a través de métodos en los que intervienen procesos químicos y físicos.

Argentina contribuye al 2,1 % (14.727.600 toneladas) de la producción mundial de maíz, ubicándose en el séptimo lugar y en el contexto del MERCOSUR contribuye en un 25,2 % luego de Brasil. El mercado externo es el principal destino de la producción de maíz de tal manera que ocupa el segundo lugar entre los países exportadores. Del total exportado, el 98.6 % se exporta como maíz sin procesar, el 0,55 % como glucosa y fructosa y solo el 0,028 % es exportado como copos de maíz (Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentos, campaña 2005-2006).

El mercado interno consumió 6 millones de toneladas de maíz , que se distribuyeron según los distintos usos y de acuerdo con estimaciones de especialistas vinculados al tema en: 1 millón de toneladas en molienda húmeda:), 0,25 millones de toneladas para molienda seca:); 3 millones para balanceados (aves) 1 millón para feedlots y suplementos varios: 0,5 millones de toneladas para alimentación de cerdos y otros usos (Robutti, 2004).

El maíz puede ser sometido a distintos procesos luego de la limpieza y molienda del grano, como nixtamalización, horneado, freído, tostado, cocción a presión y extrusión.

La molienda seca y la extrusión son los dos procesos utilizados para la elaboración de copos de maíz, por lo tanto son los dos procesos que son considerados con mayor detalle.

En el siguiente esquema (Figura 7) se presenta en forma general la molienda del maíz con sus productos principales, en donde los copos de maíz están dentro de los considerados cereales para desayuno.

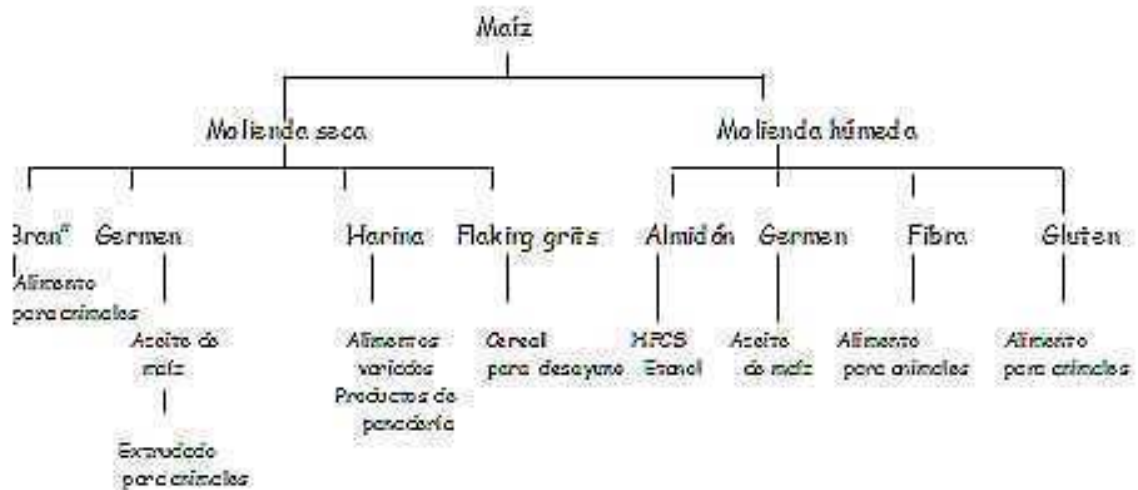


Figura 7. Procesamiento del maíz (Castro y col., 2004)

I.6.2.1. Molienda seca

A partir de la molienda seca se obtiene una importante variedad de productos, entre ellos cereales para desayuno, harinas y sémolas. Estas últimas pueden destinarse a la producción de cerveza, snacks o bien para la preparación de polenta (Hoseney, 1994). La harina de maíz se emplea en la elaboración de productos panificados. El germen al igual que en la molienda húmeda se separa y se destina a la extracción de aceite. La industria de la molienda seca de maíz exige granos duros, que generen grandes proporciones de fracciones gruesas. Por tal motivo, existe una preferencia por los maíces del tipo comercial Flint, que se adaptan adecuadamente al proceso. Dentro de los diferentes tipos de sémolas está la polenta común que puede ser fina, instantánea, precocida. También se puede obtener maíz pisado que en nuestra alimentación se destina al loco o mazamorra. La sémola desgerminada, pelada y gruesa se denomina “grits” también se usa para la producción de láminas u hojuelas denominadas, copos de maíz (corn flakes).

Es decir que lo que se denomina molienda seca es el intento de separar las partes anatómicas del grano (Figura 8) de la forma más limpia posible. Su objetivo es hacer al cereal más aceptable y más deseable como alimento e implica, la remoción del “bran” (pericarpio o cáscara) y el germen, este último es removido debido su alto contenido de grasa ya que puede producir rancidez muy rápidamente. Por otro lado,

considerando que el bran y el germen son relativamente ricos en proteínas, vitaminas B y grasas, el producto molido tiene menor contenido de estas entidades que el grano original, así como resultado de la molienda, el sabor es mejorado pero el valor nutritivo del producto disminuye y se busca reducir el tamaño del endospermo.

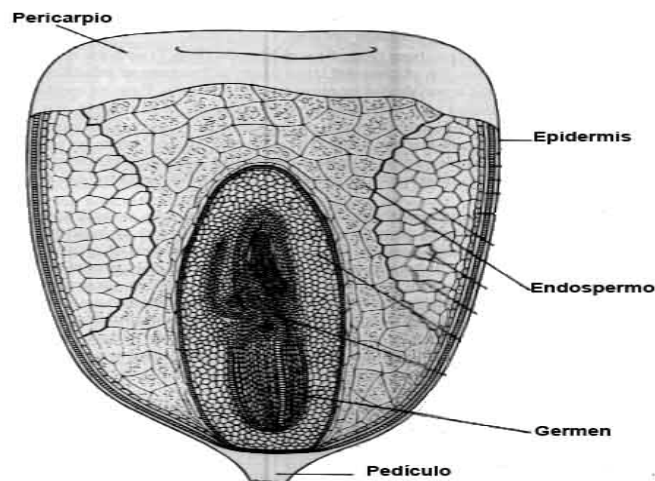


Figura 8. Corte longitudinal del grano de maíz (Hoseney, 1994)

El proceso de molienda seca consiste en:

1. Limpieza de la materia prima con zaranda, aspiración, mesa densimétrica (separador diferencial de igual tamaño pero de distinta densidad) y finalmente imanes magneto-permanentes. En este paso el maíz es separado de los desechos (piedras, tierra y otros objetos extraños) y de granos rotos; éstos últimos son utilizados generalmente para la producción de harina para animales.
2. Luego de la limpieza, se procede a la etapa de atemperado o acondicionamiento, como consecuencia de ello, el nivel de humedad del grano se eleva hasta un 15 a 20 % por agregado de agua para obtener un grano más suave y facilitar el desgerminado.
3. Dos canales están disponibles a la salida del degerminador. El primer canal lleva a un aspirador turbo cónico que permite separar la harina para alimento animal de otros productos, transportados a través del sistema neumático al "plansifter". Los productos son separados de acuerdo a su tamaño en "grits" y

germen de pequeñas y grandes dimensiones. Luego son enviados a diferentes tablas en donde el germen es separado de los grits por diferente densidad.

4. Cuatro diferentes productos son obtenidos: grandes grits, pequeños grits, gran germen, pequeño germen; los cuales son almacenados en tres diferentes celdas: dos para gran y pequeño grits y uno para juntar el germen.
5. Los pequeños grits pueden ser procesados nuevamente usando un proceso cíclico a lo largo de molinos a rodillo y plansifter para obtener harina con la granulometría deseada. Los grits también pueden ser transformados en harina precocida en un recipiente con calentamiento a vapor, una prensa rodante y un secador de harina.

De acuerdo al proceso descrito (Figura 9), se obtienen: granos de maíz, germen (contenido de grasa 20 a 22 %), "bran" grandes grits (tamaño desde 3350 a 6000 μm), pequeños grits (tamaño desde 2500 a 4000 μm), harina (tamaño desde 300 a 800 μm) y harina para alimento animal (tamaño desde 300 a 850 μm).

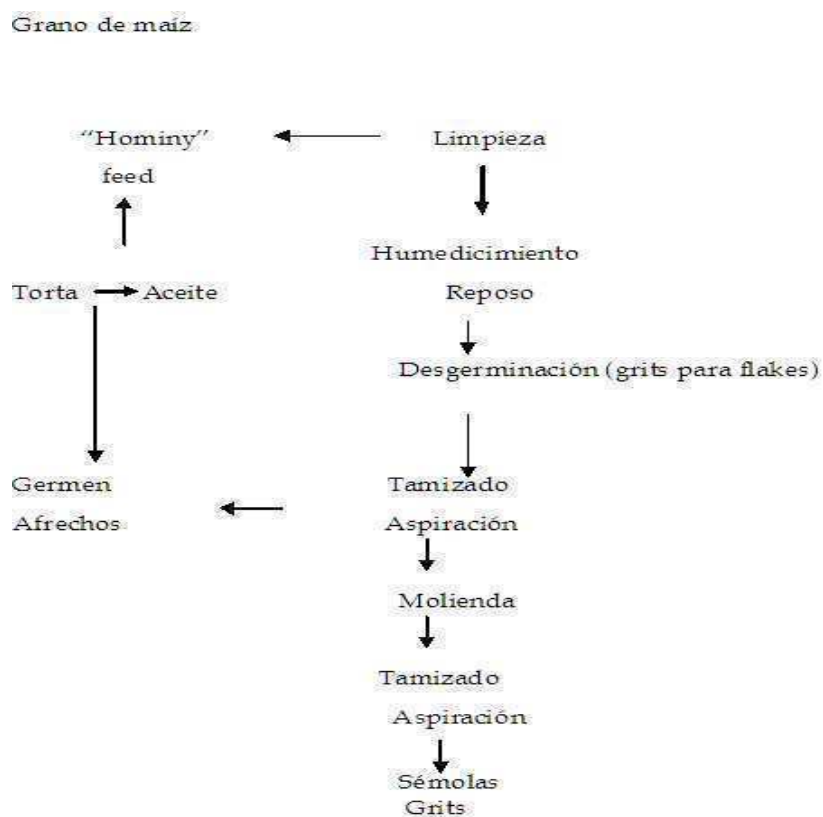


Figura 9. Diagrama general del proceso de molienda seca (Robutti, 2004)

En general los trozos gruesos provenientes del endosperma son destinados a la elaboración de copos (corn flakes) y cereales para desayuno, los trozos medios son utilizados en la producción de alcoholes y bebidas alcohólicas y los trozos finos se utilizan para elaborar sémolas y harinas que pueden ser usadas para cervecería, expandidos (chizitos), polenta, o en la elaboración de galletitas, bizcochos, rebozadores, etc.

I.6.2.2. Extrusión

Cereales para desayuno o cereales listos para comer

El otro proceso que se utiliza en la elaboración de los copos de maíz es el de extrusión. La palabra extrusión proviene del latín “extrudere” que significa forzar un material a través de un orificio. Desde el punto de vista práctico la extrusión de alimentos es un proceso en el que un material (grano, harina o subproducto) es forzado a fluir, bajo una variedad de condiciones de mezclado, calentamiento y cizallamiento (fuerzas de corte), a través de una placa/boquilla diseñada para dar forma o expandir los ingredientes (Harper, 1989). Los objetivos de la extrusión en los alimentos son la cocción, pasteurización, expansión y reducción de humedad. En la extrusión de cereales, el producto se va humedeciendo hasta un porcentaje de humedad entre 22 a 30 % y la temperatura se va incrementando por la transformación de energía mecánica en calor. El agua permanece en el producto en estado líquido a temperaturas superiores a la vaporización debido a las altas presiones aplicadas en el proceso. Cuando el producto sale del tambor de extrusión, el agua que está íntimamente mezclada con éste sufre un brusco cambio de presión y se evapora instantáneamente (Tabla 18).

Cuando se utiliza para la extrusión un tornillo de hélice simple, las temperaturas del producto varían en un rango entre 80 y 140 °C con porcentajes de humedad entre el 15 y 35 %; mientras que cuando el tornillo es de hélice doble las temperaturas varían entre 60-160 °C con porcentajes de humedad entre 10-45 % (Rokey, 1995).

Tabla 18. Parámetros típicos de la extrusión

Extrusión húmeda	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Humedad (%)	Cocción * (%)
Hélice simple	80-140	15-30	15-35	80-100
Hélice doble	60-160	15-40	10-45	80-100

* Extrusión del almidón medida enzimáticamente.

Los componentes físicos del equipo para extrusión (húmeda) se muestran en la Figura 10. Las materias primas ubicadas normalmente en un silo que se encuentran a un nivel superior que la extrusora bajan por gravedad y con un sistema de hélices (hélice de alimentación) a un preacondicionador. La masa del alimento entra al tambor de extrusión a través de un canal que atraviesa el preacondicionador de vapor. El preacondicionador hidrata la masa hasta un 18 a 25 % de humedad y simultáneamente lo calienta hasta 80 a 95 °C en un plazo de tiempo de hasta 2,5 minutos. Esta fase, unida a hélices de conducción positiva en la extrusión permite procesar alimentos con un contenido de grasa de hasta un 27 %. El tambor de extrusión aloja una serie de hélices segmentadas y de cierres de cizalla que conducen y extrusionan el material a través de orificios que controlan el tamaño y la forma del gránulo final. El vapor se inyecta en el tambor de extrusión para alcanzar las condiciones del procesamiento descritas en la tabla anterior. El tiempo de retención en el tambor de extrusión, puede ser tan bajo como 12 segundos. El principio de combinar altas temperaturas con cortos tiempos de procesamiento, ha hecho de la extrusión un método efectivo de tratamiento de ingredientes individuales y mezclados.

Para la preparación de copos de maíz, luego de la molienda seca del grano de maíz, los grits obtenidos que salen del silo de almacenamiento pasan al preacondicionador (cámara presurizada en la cual todos los ingredientes son uniformemente humedecidos y/o calentados con agua o con una corriente de vapor) antes de entrar al tambor de extrusión. En este último, los grits son cocidos a presión de vapor (>20 % de humedad) con una solución que contiene en general, azúcar, malta y sal. Una

cocción adecuada requiere temperaturas de cocción superiores a 150 °C y permite lograr un producto “soplado” (puffed) a la salida del tambor de extrusión. El producto que sale es luego cortado y secado hasta un porcentaje de humedad del 20 %, luego se atempera durante 24 hs para que se equilibre la temperatura y la humedad. Después del atemperado, los grits están listos para el “flaking” (laminado) que se realiza cuando se pasan por rodillos de 1 tonelada y luego son tostados por aproximadamente 50 segundos a 300 °C. El tostado no solamente deshidrata (< 3 % de humedad) sino que también pardea el producto y lo sella.

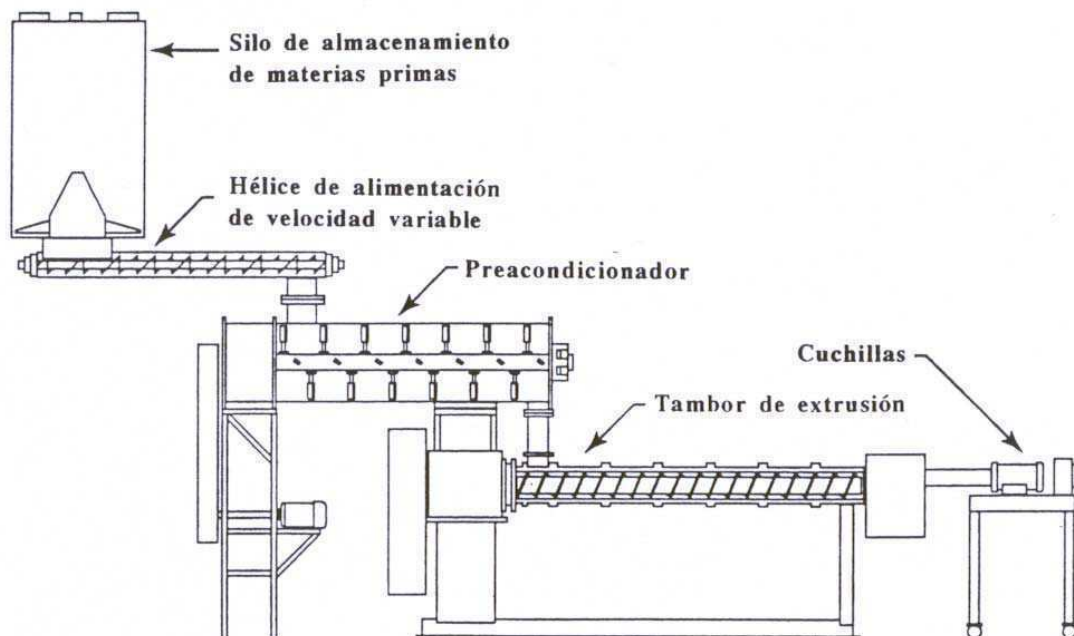


Figura 10. Componentes comunes de un equipo de extrusión (de tornillo simple o doble)

Después de enfriar, los flakes pueden ser cubiertos de un spray con una solución de vitaminas y minerales.

También se debe considerar que la extrusión (Figura 11) puede ser reemplazada por una cocción a presión en donde los “grits” son previamente mezclados con una solución que contiene azúcar, malta (no enzimática) y sal. Se cuecen durante aproximadamente 2 horas a 18 psi de presión de vapor.

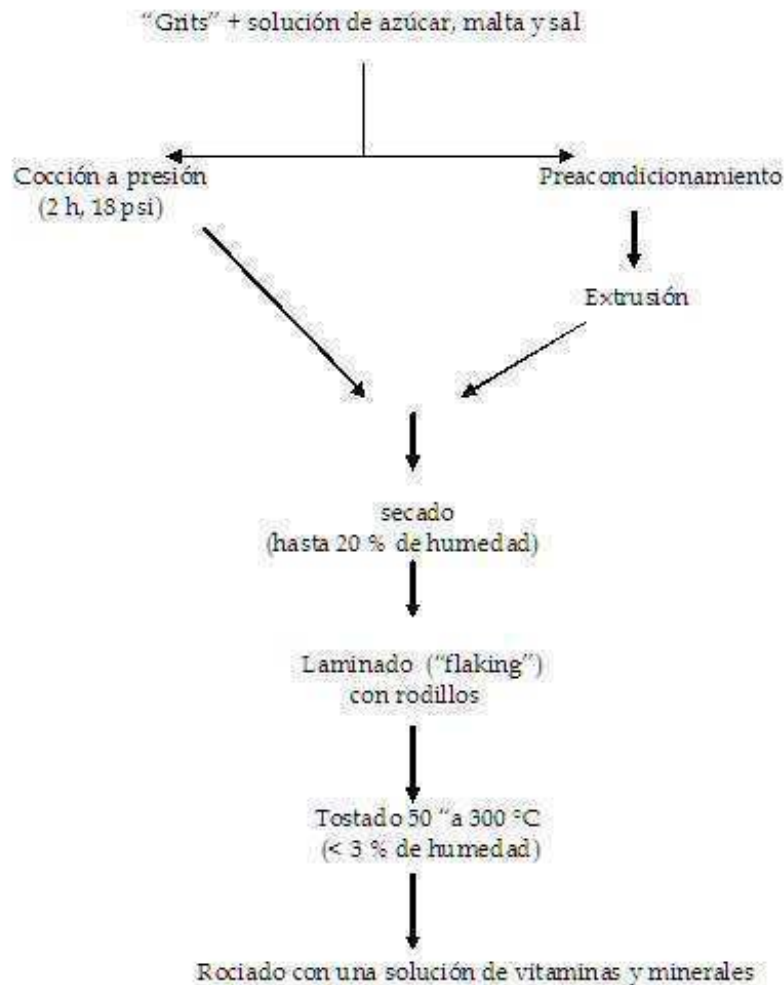


Figura 11. Elaboración de copos de maíz por cocción

I.6.2.3. Efecto de los distintos procesos sobre el nivel de contaminación por fumonisinas en maíz

De acuerdo a lo que se observa cuando se evalúan los niveles de contaminación por fumonisinas, éstos tienden a ser más altos en el grano entero, en los “grits” y en la harina de maíz, éstos últimos obtenidos por tratamiento físico del grano ya sea por trituración o molido; que en aquellos productos a base de maíz altamente procesados ya sea por calor y/ o alcalí como copos de maíz, cereales para desayuno, chips de maíz y tortilla chips. Esto indicaría que las fumonisinas podrían ser degradadas durante el tratamiento térmico (horneado, asado-calor directo y extrusión) y tratamiento con alcalí (nixtamalización).

Aunque en muchos casos, estas reducciones podrían atribuirse en parte al hecho que los métodos analíticos subestiman los niveles de contaminación por fumonisinas en los alimentos altamente procesados debido a los problemas que se presentan en la adaptación de las técnicas a distintas matrices (Solfrizzo y col., 2001 a,b).

Los procesos a las que son sometidas las materias primas en la producción de alimentos conllevan a cambios en las mismas hasta obtener el producto final; en ese proceso también las micotoxinas presentes como contaminantes pueden alterarse; es decir variar su concentración, generalmente disminuye el nivel de contaminación, modificarse químicamente ya sea reaccionando con los componentes del alimento. Estos cambios pueden producir una disminución o aumento de los efectos tóxicos.

Es decir, los niveles de contaminación por las micotoxinas van variando a lo largo del proceso de elaboración, generando nuevos productos o eventualmente reaccionando con la matriz en ese proceso de transformación. Luego, el estudio de la presencia de esas toxinas en los alimentos requiere por un lado conocer los procesos a los que las materias primas son sometidas e identificar los cambios químicos que el alimento experimenta en esos procesos a los que también van a acompañar las micotoxinas contaminantes.

Por ejemplo, la limpieza de granos por tamizado previo a la molienda y las diferentes fracciones que se producen en la molienda y el tratamiento térmico conllevan a cambios importantes en los niveles de contaminación, los niveles de contaminación son dependientes de las condiciones de cada proceso. En la tabla 19 se mencionan algunos procesos y la influencia en el nivel de contaminación.

Generalmente, se observan las más altas concentraciones de FB₁ en harina de maíz, mientras que se encuentran niveles intermedios en productos horneados y asados como los “muffins” de maíz y los copos de maíz. Los productos fritos como los chips tienen niveles de contaminación de FB₁ bajos a no detectables.

Tabla 19. Influencia de los métodos de procesamiento sobre el contenido de fumonisinas

Métodos	Efecto sobre el contenido de fumonisinas en maíz
Limpieza-tamizaje	Al separar partículas de tamaño menor a 3 mm de los granos intactos (0.53-1.89 mg/kg) se reduce el nivel de fumonisinas en un 26-69 % (Sydenham y col., 1994)
Molienda seca Molienda húmeda	Corteza (bran) > germen > harina de maíz (corn meal) - polenta (corn grit) (Brera y col., 2004; Broggi y col., 2002) Gluten (proteína) > fibra (bran) > germen (aceite) (Bennett y col., 1996, a ,b) Almidón no presenta contaminación
Térmico	Hervido: no lo reduce Pasteurización: no lo reduce Horneado: 50 % de reducción Freído: temperaturas > 180 °C comienza a degradarse (Jackson y col., 1997) Asado (roasting): reducción del 100 % Extrusión: la reducción depende de la temperatura, % de humedad, tornillo extrusor (reducción 60 - 70 %) (Katta y col.,1997)
Nixtamalización	50 % de reducción (Dombrink-Kurtzman y Dvorak, 1999)

I.6.2.4. Efecto de la molienda seca sobre los niveles de contaminación de fumonisinas

Considerando que los copos de maíz provienen del procesamiento de grits obtenidos a partir de la molienda seca, es importante conocer el nivel de contaminación esperable luego que un grano de maíz contaminado es sometido a la molienda seca. Broggi y col. (2002) observan que el nivel de contaminación por fumonisinas fue aproximadamente tres veces mayor en el germen y bran que en el grano de maíz entero; trece veces mayor que en la harina C y veintinueve veces mayor que en la

harina y sémola de maíz (Tabla 20). Esto muestra que el nivel de contaminación de los grits es diez veces menor al del grano entero.

Tabla 20. Contenido de fumonisinas en las distintas fracciones obtenidas por molienda seca del maíz. (Broggi y col., 2002)

Muestras	FB₁ (µg/kg)	FB₂ (µg/kg)	FB₃ (µg/kg)
Maíz entero	1540	716	152
Grits (pasan malla 2000 µm)	135	39.1	10.2
Harina C (Pasan a través de malla 350 µm)	358	122	45.9
Corn meal (pasa 2000 µm pero pasa a través de 250 µm)	148	52.5	28.3
Germen + bran	4210	2010	447

Brera y col. (2004) indican que las diferencias observadas en las concentraciones de FB₁ entre el germen, bran y harina para alimento animal con altos niveles de contaminación respecto a los bajos niveles de concentración en pequeños y grandes grits y en las muestras de harina para la preparación de polenta (Tabla 21); pueden estar asociadas al rendimiento de las distintas fracciones durante el proceso. Así la relación (cociente) entre la fracción contaminada y la masa total en el bran y germen (bajo rendimiento) es más alta que la equivalente relación para los grits.

Katta y col. (1997) concluyen que la concentración de fumonisinas aumenta en la medida que el tamaño del grit disminuye (Tabla 22). Es decir que luego del primer proceso a la que es sometida la materia prima se produce una reducción de la contaminación diez veces menor.

Tabla 21. Concentración de fumonisinas en distintas fracciones de maíz obtenidas por molienda seca del maíz (Brera y col., 2004)

Muestras	FB ₁ (mg/kg)
Grano	4,54 (1)
	5,09 (2)
Grandes grits	0,39 (1)
	0,42 (2)
Pequeños grits	0,60 (1)
	1,01 (2)
Harina	0,40 (1)
	0,45 (2)
Bran	7,08 (1)
	8,08 (2)
Germen	8,92 (1)
	9,56 (2)
Animal Feed flour	- (1)
	6,86 (2)

(1) Promedio obtenido con todos los niveles de contaminación registrados, incluidos aquéllos que corresponden a niveles menores al LD (LD/2) o menores al LQ (LQ/2).

(2) Promedio de todos los valores positivos obtenidos por encima del LQ.

Tabla 22. Contenido de fumonisinas en las distintas fracciones de maíz obtenidas por molienda seca del maíz

Muestras	Fumonisinas (FB ₁ + FB ₂ + FB ₃) (µg/g)
Grano entero	< 0,1 - 3,5
Flaking grits	< 0,1
Harina	0,2 - 1,1
Germen	0,1 - 2,0
Bran	1,5 - 3,2

I. 6. 2. 5. Efecto de la extrusión sobre los niveles de contaminación por fumonisinas

La cocción y extrusión del maíz a altas temperaturas (mayor o igual a 190 °C) también reduce la concentración de fumonisinas en los alimentos, en donde la disminución lograda depende del tiempo de cocción, temperatura, receta y otros

factores (Voss y Humpf, 2004). Sin embargo, el destino de las fumonisinas en los alimentos extrudados no es bien conocido y existen evidencias que indican que la reducción en las concentraciones, podría ser el resultado por un lado de la descomposición térmica de las fumonisinas y por otro de la unión a proteínas, azúcares y/ u otros componentes de la matriz alimenticia o a la obtención de otros productos que no son fácilmente detectables por las técnicas convencionales de análisis.

En general durante el proceso de extrusión a mayor temperatura y a mayor disminución de la velocidad del tornillo de extrusión se observa mayor pérdida de FB₁ (Tabla 23). Además se obtiene mayores pérdidas cuando se usan tornillos mezcladores que cuando no se usan, debido al mayor tiempo de residencia y mayor fuerza de corte con los tornillos mezcladores. Por otro lado, a mayor porcentaje de humedad se observa mayores pérdidas debido a la mejor transferencia de calor.

Se puede agregar que la alta presión y las fuerzas de corte generadas contribuyen a que ocurran reacciones químicas y modificaciones moleculares que se presentan en la masa como la gelatinización del almidón, desnaturalización de proteínas e inactivación de enzimas. Los rangos de reducción obtenidos luego de la extrusión llevaron a distintos experimentos tendientes a conocer las causas de esa reducción (Castells y col., 2005).

Estos experimentos pusieron en evidencia que las pérdidas de fumonisinas pueden ser debidas a la baja eficiencia en la extracción o a problemas relacionados con la matriz más que a la descomposición de la fumonisina (Scott y Lawrence, 1994) y observaron también que muy poco o casi nada fue recuperado de harina de "bran" de maíz cuando se realizó la extracción con metanol: agua (70:30). Ellos sugirieron que la pobre extracción era el resultado de la unión o reacción química de las fumonisinas al "bran" de maíz ya que las recuperaciones mejoraron cuando se cambiaba el pH del solvente. Además si los controles de recuperación se realizaban por fortificación con FB₁ antes de la columna, las recuperaciones fueron superiores que cuando se fortificaba directamente el alimento antes de la extracción.

Tabla 23. Porcentajes de reducción de FB₁ luego de la extrusión de “grits” de maíz en distintas condiciones

Temperatura (°C)	Humedad (%)	Tiempo	Sustancias agregadas	Tornillo de mezclado y velocidad	% FB ₁ perdido
120 -160 (Castelo y col., 1998, 2001)	18 - 26			si	31-68 (HPLC)
				no	13-54
140 - 200 (Katta y col., 1999)	14			-	34 - 95
150 - 180 (Piñeiro y col.,1999)	14			Si (un tornillo)	70-90
70-105 170-220 (asado) (Solfrizzo y col., 2001 a,b)	27	5 min		-	60-70
160-180 (extrusión) 90-110 (gelatinización) (Meister, 2001) cocción 130 para flaking roasting 250	16-20				45-70
	24-30	30-90min			35-80
		5 min			65-94
140-180 (Castells y col., 2005)	26		glucosa 0-10 %	40-120rpm	45-71
			fructosa		30-53
			sucrosa		19-39

Por otro lado, Castelo y col. (1998, 2001) analizaron el efecto del agregado de azúcares sobre el contenido de FB₁ en “muffins” (horneado), “grits” de maíz extraídos y observaron que el agregado de glucosa resulta en importantes reducciones en las concentraciones de FB₁ respecto de los controles sin el agregado. Sin embargo esas reducciones en el caso de los “muffins” no pudieron ser atribuidas a la formación de N-(carboximetil) FB₁, uno de los productos obtenidos por reacciones de pardeamiento no enzimático, ya que las concentraciones detectadas de este compuesto no se correlacionaban con las concentraciones de glucosa presentes

inicialmente en los “grits. Tampoco pudieron atribuirse esas reducciones a la hidrólisis de FB₁ ya que no se detectaron productos de hidrólisis de FB₁ (HFB₁ o FB₁ parcialmente hidrolizado) ni en los “muffins” ni en los “grits” extrudados.

Por otro lado, el color marrón observado en las muestras extrudadas tampoco indicó que la pérdida de FB₁ era debida a una reacción de pardeamiento no enzimático ya que Seefelder y col. (2001) en experimentos con “grits” de maíz fortificados con FB₁ y glucosa o sacarosa, observaron que luego de la extrusión, las concentraciones detectadas de N-(carboximetil) FB₁ (NCM- FB₁) fueron muy bajas o no detectables en tanto que en cuatro muestras de copos de maíz comerciales no se detectó NCM- FB₁, en ninguna de las muestras analizadas.

Con la idea de identificar los productos de la degradación térmica de FB₁, Shier y col. (1997) realizaron estudios preliminares por calentamiento de FB₁ a temperaturas correspondientes al proceso de horneado y tostado. El mayor producto que se formó a partir de FB₁ a esas temperaturas fue un anhídrido que resultó de la pérdida de agua de una o ambas cadenas laterales (Figura 12). El producto obtenido fue identificado por NMR y tenía absorciones iguales a las de un anhídrido obtenido a partir de la reacción de las cadenas laterales con ácido acético anhídrido. Éste luego reaccionaría con proteínas a través de los grupos tioles de la cisteína o de los grupos amino de la lisina bajo las condiciones de horneado y tostado. Esta reacción es similar a la reacción del mezclado del anhídrido que ha sido muy utilizada para unir pequeñas moléculas como los haptenos con proteínas para usar luego como antígenos en la producción de anticuerpos.

Para conocer o determinar el destino de FB₁ marcado con tritio durante condiciones simuladas de horneado o tostado se prepararon masas a partir de harina de maíz contaminada con FB₁ marcada que luego fueron sometidas a dos procesos: freído para dar lugar a “corn chips” y tostado (“roasting”) para obtener copos de maíz (Badria y col., 1996; Shier y col., 1997, 1999, 2000). Se observó que luego de la extracción con los métodos convencionales y cuantificación por HPLC, solo el 36,5 % de la radioactividad inicial fue extraída de los copos de maíz, en tanto que un 46 % más de radioactividad pudo ser extraída cuando se utilizó Sodio dodecil sulfato de sodio (SDS) 1 %.; lo que indicó que gran parte de la fumonisina inicial se extrajo con

un solvente capaz de solubilizar proteínas. Además confirmaron por experimentos con electroforesis en poliacrilamida y autorradiografía que la mayor parte de la radioactividad migraba con las proteínas zein (proteínas del maíz) y por hidrólisis alcalina de esa fracción se obtenía HFB₁ marcado lo que mostraba que la unión no involucraba el esqueleto de la micotoxina (Shier y col. ,1999).

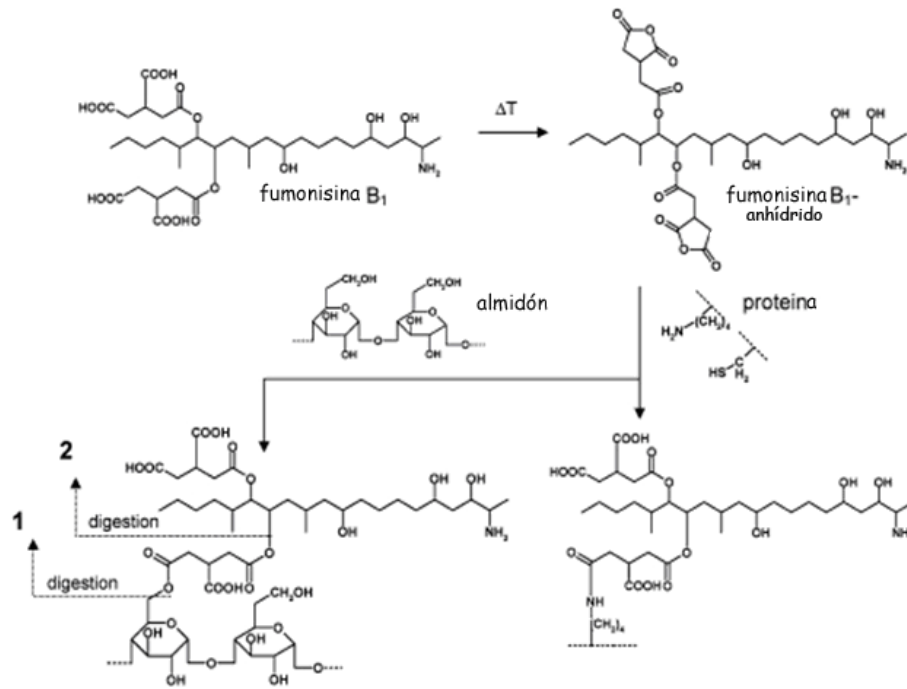


Figura 12. Posibles reacciones entre la fumonisina B₁ y las proteínas y entre la fumonisina B₁ y el almidón durante el calentamiento. Posibles puntos de hidrólisis en esas fumonisinas unidas durante la digestión

Posteriormente, Seefelder y col. (2003) desarrollaron experimentos modelos para conocer las posibles reacciones de las cadenas laterales (TCA) de la FB₁ con polisacáridos y proteínas por tratamiento térmico. Para ello se hizo reaccionar FB₁ con N-acetil-L-lisina-metilester o BOC-L-Cisteina-metilester durante 40 minutos a 105 °C y con metil- α -D-glucopiranosido por 40 minutos a 150 °C sin solventes. El calentamiento de FB₁ con los aminoácidos resultó en la formación de los conjugados pero en muy baja cantidad en tanto que se obtuvo un diéster de la fumonisina con dos moléculas de metil- α -D-glucopiranosido lo que indicó que la unión al almidón también es posible en las condiciones del proceso por extrusión.

En la Figura 13 se encuentran las estructuras de degradación de las fumonisinas ya que el tratamiento por calor y la extrusión pueden inducir una parcial degradación de las fumonisinas por pérdida de las cadenas laterales (fumonisinas hidrolizadas, Figura 13A), reacciones de tipo Maillard con azúcares reductores para dar una base de Schiff (N-(carboximetil) FB₁) que después con el reordenamiento de Amadori resulta en NDF- FB₁ (B y C), reacciones con los grupos amino de los aminoácidos (D) y los grupos oxhidrilos del almidón (E).

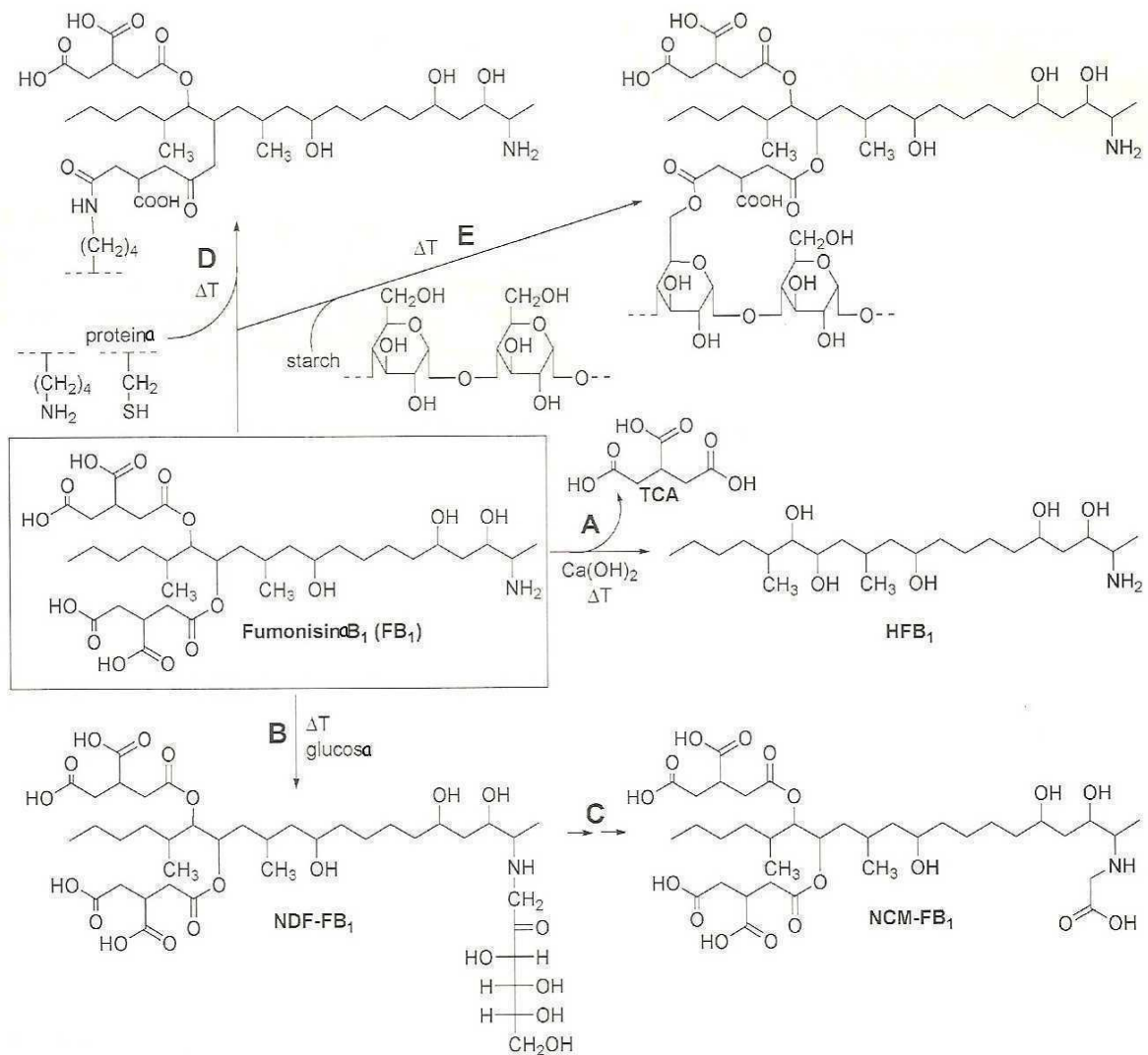


Figura 13. Estructuras de los productos de degradación de FB₁ y FB₁ unida a la matriz formada bajo condiciones de procesamiento térmico

Dall'Asta y col. (2008) lograron hidrolizar las fracciones de las proteínas de maíz extraídas con etanol (Osborne) y detectaron HFB₁ entre las fracciones de las globulinas y de las prolaminas luego de hidrolizar con NaOH 0,2 M. También lograron identificar la presencia de fumonisinas unidas no solamente en productos derivados de maíz obtenidos con tratamiento térmico sino también en aquellos productos obtenidos con tratamiento térmico muy suave o sin tratamiento (pasta, pan, harina).

I. 7. Toxicidad

I.7.1. Ocratoxina A

La OTA está involucrada en muchos mecanismos tóxicos que incluyen efectos neurotóxicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos, inmunotóxicos y cancerogénicos. La toxicidad varía en función de la especie, el sexo y la vía de administración.

El efecto primario de la OTA es la inhibición de la síntesis de proteína que ocurre a nivel post- transcripcional, ya que compite con la fenilalanina por la enzima fenilalanina t-RNA sintetasa, lo cual resulta en una inhibición competitiva de la enzima (Creppy y col., 1979, 1980 a,b, 1983, 1984).

1.7.1.1. Exposición prolongada

El principal órgano blanco, en exposiciones crónicas a OTA a bajas dosis es el riñón. Se ha demostrado a través de diversos estudios que la OTA es nefrotóxica en todas la especies testeadas, observándose cambios degenerativos en los túbulos proximales y en estadios avanzados puede llegar a una fibrosis intersticial (Kuiper-Goodman y Scott, 1989).

1.7.1.2. Metabolismo: absorción, biotransformación, excreción

La cantidad de OTA que es absorbida a través del tracto gastrointestinal varía según las especies 66, 56, 56 y 40 % en cerdos, ratas, conejos y pollos respectivamente. Los

rumiantes absorben poca OTA ya que en el estómago, los protozoarios presentes hidrolizan rápidamente la OTA a α OTA. La OTA que ha sido transferida a través de la mucosa intestinal alcanza el hígado y tan pronto como alcanza la circulación sistémica la toxina se une a la albúmina siendo la fracción libre circulante en la mayoría de las especies muy baja, < 0,2 % (Hagelberg y col., 1989).

La ocratoxina A se puede hidrolizar en el intestino por las enzimas carboxipeptidasa y quimotripsina para dar fenilalanina y α ocratoxina (Figura 14), por otro lado en estudios con animales de experimentación se han encontrado otros metabolitos como (4S)- hidroxiocratoxina A, 10- hidroxiocratoxina A, (4 R)-hidroxiocratoxina A, éstos últimos han sido encontrados en orina (Galtier et al., 1979; Kuiper-Goodman y Scott, 1989).

La ocratoxina A se excreta por orina y heces, y la cantidad excretada depende del grado de recirculación enterohepática y de su unión a las proteínas séricas.

La transferencia hacia la leche ha sido demostrada en ratas, conejos y humanos pero muy poca ocratoxina A es transferida a la leche de rumiantes, debido a la hidrólisis de la unión amida por la microflora en el rumen, para dar fenilalanina y α ocratoxina lo que determina en este caso la baja biodisponibilidad que tiene la toxina en los rumiantes. Estos factores son importantes en la determinación de la vida media sérica de la ocratoxina A, que varía de acuerdo a la especie considerada (Figura 14).

La OTA tiene una larga vida media en algunos mamíferos no rumiantes como las ratas entre 1 a 5 días en ratas, de 2 a 5 días en ratones, de 3 a 5 días en cerdos y de hasta 20 días en macacos y monos vervet y 35 días en humanos. En un voluntario se determinó la vida media mediante la ingesta de ^3H -OTA 20 hs durante los primeros 6 días y de 35,6 días después del día 6. También se determinó una variación intraindividual cuando se analizaron los niveles en suero de OTA de 8 personas durante 2 meses; los niveles en plasma de algunos permanecieron constantes mientras que en otros casos variaba constantemente, debido posiblemente a diferentes niveles de exposición y/o metabolismo.

La OTA se presenta como contaminante de muchos alimentos y una vez ingerida se distribuye en distintos tejidos tales como sangre, riñón, hígado y músculo.

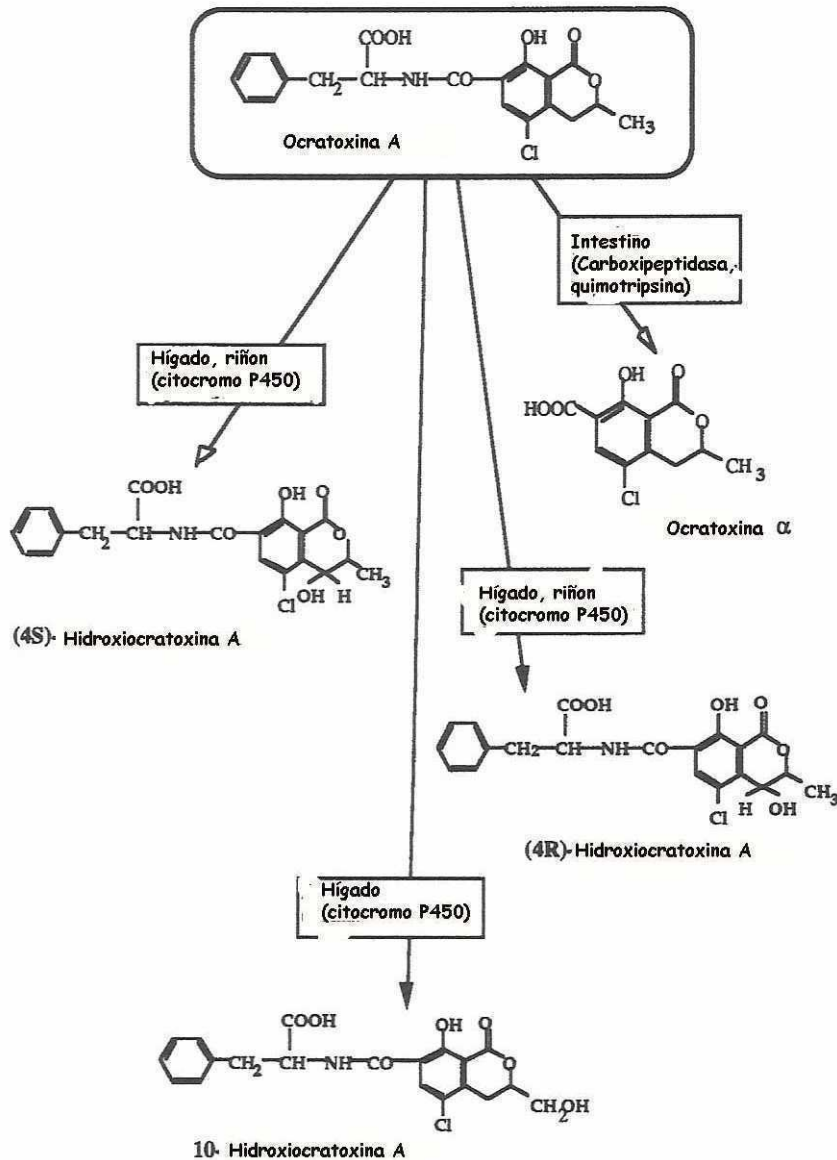


Figura14. Ocratoxina y sus metabolitos (Studer-Rohr, 1995)

I.7.1.3. Evaluación de la exposición

Cuando se estudia la toxicidad de una micotoxina (Figura 15), es importante considerar cuál es el grado de exposición a la misma en la población, ya sea conociendo la exposición externa a través del nivel de contaminación de la micotoxina en los alimentos (ocurrencia) y qué cantidad de esos alimentos es ingerida diariamente o determinando la exposición interna a través de los niveles de concentración de la micotoxina (biomarcador) en los líquidos biológicos (plasma,

orina o en el caso de animales de experimentación también por el análisis de la micotoxina en diversos órganos).

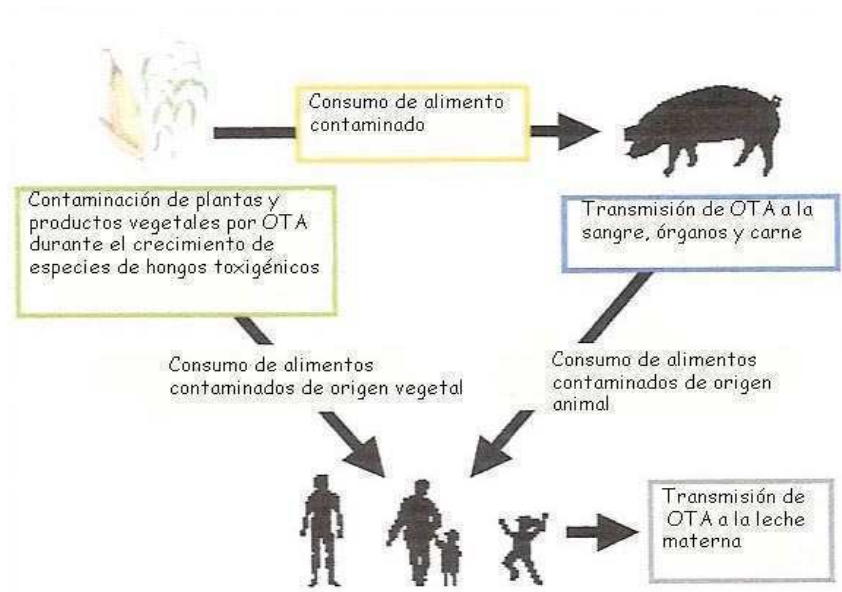


Figura 15. Fuentes de exposición a OTA

Por lo tanto, cuando se estima la exposición externa o sea la Ingesta Estimada Diaria (IED) de un contaminante, de acuerdo a lo planteado anteriormente, es necesario conocer la concentración del contaminante en los alimentos susceptibles y el nivel de consumo de esos alimentos. Este método de aproximación se llama “determinístico” o de “estimación de punto”. El IED total es obtenido realizando la suma de la ingesta del contaminante presente en todos los alimentos consumidos y se expresa como la cantidad del contaminante ingerido por una persona en un día. Esta unidad puede ser convertida en unidad de masa por kg de peso corporal por día usando un promedio de peso corporal, que en las publicaciones internacionales se estima en 70 kg.

De tal manera que el IED se calcula como:

$$\text{IED (ng/kg peso corporal/ día)} = \sum_i (C_i \times L_i)$$

C_i : Cantidad consumida del alimento i (g/persona/día)

L_i : Concentración del contaminante en el alimento ($\mu\text{g/kg}$)

El IED de un contaminante es obtenido multiplicando la cantidad consumida del alimento i por la concentración de ese contaminante en el alimento i .

Diferentes fuentes pueden ser usadas para obtener el dato de consumo (C_i) y contaminación (L_i). Los datos de consumo se pueden obtener de bibliografías internacionales, de la base de datos de la Organización Mundial de la Salud o de las encuestas regionales de los alimentos, mientras que los niveles de contaminación en los distintos alimentos también pueden ser extraídas de publicaciones de la base de datos de la Organización Mundial de la Salud o de estudios de ocurrencia locales. Dependiendo de cómo se combinen los datos, diferentes tipos de ingesta diaria pueden ser calculadas. El caso más ajustado a la realidad sería el obtenido a través de una encuesta de alimentos y de los datos de contaminación en esos alimentos.

Los valores calculados de IED adquieren importancia cuando se comparan con la Ingesta Diaria Tolerable (TDI o IDT). Este último parámetro es sugerido por JEFCA basado en estudios toxicológicos.

Otro parámetro importante de definir desde el punto de vista toxicológico es el nivel de contaminación de la toxina donde no se observa efecto tóxico (NOEL) que se define como la mayor concentración o cantidad de sustancia, encontrada o determinada que no causa alteraciones de la morfología, capacidad funcional, crecimiento del organismo en estudio. (JEFCA, 2008).

Un grupo de expertos que participaron en el Task 3.2 realizaron en el año 2002 un informe con los datos de exposición a OTA en distintos países europeos. En este informe se expresó que la estimación de la ingesta total por OTA como la sumatoria de lo ingerido de OTA a través de todos los alimentos susceptibles, calculada con la ingesta diaria promedio de la población en estudio multiplicada por el promedio de la contaminación en cada alimento (incluido aquellos niveles de contaminación que están por debajo del LD que se integran en el cálculo como LD/2).

El rango de ingesta de ocratoxina A proveniente de los cereales fue entonces entre 0,06 ng/kg peso corporal/diario (Italia) a 1,28 ng/kg peso corporal diario (Holanda); para el café fue entre 0,06 ng/kg peso corporal /día (Italia) a 0,42 ng/kg peso corporal/día (Finlandia). Para la cerveza, la ingesta diaria de ocratoxina A está entre 0,01 ng/kg peso corporal diario (Italia) a 0,14 ng/kg peso corporal diario

(Dinamarca); en el caso del vino, la ingesta diaria está entre 0,02 ng/kg/día (Portugal) a 0,86 ng/kg peso corporal/día (Italia), frutas secas 0,001 ng/kg peso corporal diario (Grecia) y 0,02 ng/kg peso corporal diario (Finlandia), para consumidores y no consumidores. En el caso del cacao, determinado por niños fue 0,67 ng/kg peso corporal/día en Gran Bretaña y 0,66 ng/kg peso corporal diario en Alemania. En la siguiente tabla (Tabla 24), se indica el porcentaje de contribución de distintos alimentos a la ingesta de OTA.

Tabla 24. Contribución de distintos alimentos a la ingesta de OTA en Europa

Alimento	Contribución porcentual ⁽¹⁾
Cereales	50
Vino	13
Café	10
Especias	8
Otros	6
Cerveza	5
Cacao	4
Frutas secas	3
Carne	1

⁽¹⁾ Países considerados Francia, Noruega y Suecia.

En Suecia, el 49 % de la ingesta de OTA en la población general es aportada por los cereales; en Suecia y Finlandia el 37 % es aportado por la de centeno; en Alemania, el 33 % es aportado por el pan y la ingesta de roscas; en Holanda hasta un 80 % corresponde al trigo, en tanto que en el Reino Unido, el 39 % fue aportado por el trigo y cacao (cacao en polvo y chocolate), en Dinamarca el 42 % por el pan de centeno, mientras que en Portugal, el 85 % provenía de trigo y harina de trigo.

En Argentina (Llorens y col., 2001) el suministro de energía alimentaria (SEA) por persona y por día es de 3000 Kcal y la ingesta de cereales contribuye con el 30 % y constituye la principal fuente de energía (Figura 16), seguidos por carne/huevos (16.0%), edulcorantes (14 %), aceites y grasas (12 %).



Figura 16. Porcentaje del suministro de energía alimentaria proveniente de los principales grupos de alimentos en Argentina

Según Britos y Scacchia (1998) aproximadamente son 20 los productos individuales, que integran mayoritariamente la dieta argentina: pan, harinas y fideos, carne vacuna, azúcar, leche, quesos, aceite de girasol, papa, verduras de hoja, arroz, naranja, manzana, banana y tomate.

En la Argentina, el mayor porcentaje de la ingesta de los alimentos susceptibles de estar contaminados por OTA (según datos de otros países) se supone que son los cereales por lo que es esperable que también como en Europa sean los que en general más podrían aportar a su ingesta.

La estimación de la ingesta de OTA a partir de las concentraciones plasmáticas se calcula a través de la ecuación de Klassen. La mayoría de los estudios usaron dos versiones de la ecuación de Klassen que relacionan la ingesta dietaria continua de OTA con la concentración plasmática, el clearance plasmático (considerando solo la filtración renal) y la biodisponibilidad (Breitholtz y col., 1991b; Miraglia y col., 1996):

$$K_o = 0.99 \times C_p / 0.5 = 1.97 \times C_p$$

$$K_o = 0.67 \times C_p / 0.5 = 1.34 \times C_p$$

Ko = ingesta dietaria continua (ng/ kg peso corporal / día); 0.99 o 0.67 que es el clearance renal (ml / kg peso corporal / día), 0.5 es la biodisponibilidad (fracción de OTA ingerida) y Cp es la concentración plasmática (ng / ml).

El clearance o aclaramiento renal es la forma de describir cuantitativamente la excreción renal de sustancias, se denomina aclaramiento renal (Clr) al resultado neto de la filtración glomerular, más la secreción tubular menos la reabsorción tubular. Es decir resulta:

$$\text{Clr} = \frac{\text{Co} \times \text{Vo} / \text{t}}{\text{Cp}}$$

siendo Co y Cp la concentración de la toxina en orina y plasma respectivamente.

Vo/t es el volumen de orina eliminado en un tiempo determinado (ml/min).

El grado de filtración renal de 0,67 ml /kg de peso corporal/ día fue calculada de la velocidad de filtración glomerular de inulina en el hombre y la fracción libre de OTA (0,02 %) (Hagelberg y col., 1989). La disminución de la concentración en plasma fue calculada considerando la filtración renal como la única ruta de eliminación de la toxina.

La Cp de OTA en plasma se puede considerar igual a la Cp en suero. Mientras que la relación entre las concentraciones en sangre y suero fueron estimadas entre 0,37 - 0,5 (Schlatter y col, 1996; Studer-Rohr y col., 2000). En algunos estudios se han encontrado diferencias entre las concentraciones de OTA en sangre de pacientes afectadas con Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN) respecto de controles sanos (Petkova-Bochanova y col., 1988; Petkova-Bochanova y Castegnaro, 1991).

Así, cuando se evaluó la ingesta de OTA en la población (n = 2172) de los países miembros de la Unión Europea (Alemania, Italia, Noruega, España, Suecia y Reino Unido), los rangos fueron 0,35 - 2,34 ng/kg peso corporal /día para una concentración plasmática promedio de 0,18 - 1,19 ng / ml usando un factor de 1,97. Los valores de IED informados por la Unión Europea (Task 3.2, 2002) fueron 0,1, 1,0 y 3,5 ng/kg peso corporal /día para los valores más bajos, medios y altos respectivamente. En este caso los valores fueron considerados bastante altos en comparación con los valores de TDI (5 ng/kg peso/ día).

Cuando se comparan los resultados de la ingesta diaria de OTA (ng/kg peso corporal/ día) obtenidos a partir de las concentraciones plasmáticas de OTA (ng/l plasma o suero) con los datos de la ingesta diaria de OTA calculados de los datos de ocurrencia de OTA en distintos alimentos y datos de consumo en toda la población, los resultados fueron distintos. En Alemania, Suecia y Noruega los niveles de ingesta diaria estimada a partir de los líquidos biológicos fueron más bajos que aquellos derivados de los datos de ocurrencia de los alimentos. España y el Reino Unido presentaron la tendencia opuesta ya que los cálculos de ingesta estimados a partir de las concentraciones de OTA en los fluidos biológicos humanos fueron más altos que aquellos de ocurrencia en los alimentos.

Del análisis para ocratoxina A (Tabla 25) de 83 muestras plasmáticas de mujeres residentes en la provincia de Granada (España); se detectó un 72 % de las muestras positivas con una concentración media de 0,63 ng/ml y un rango de concentración de 0,11 ng/ml a 6,96 ng/ml. Los rangos obtenidos de las concentraciones plasmáticas en distintas regiones españolas analizadas por Pérez de Obanos y col. (2001) estuvieron entre 0,02 ng/ml y 6,96 ng/ml.

El valor de ingesta diaria promedio calculada con la ecuación de Klassen sería para la ciudad de Granada de 0,74 ng/kg pc/día mientras que si se hiciera el cálculo con la concentración plasmática máxima de 6,96 ng/ml, la ingesta diaria resultante sería de 8,18 ng/kg peso corporal/día, superior al aconsejado por el Comité Nórdico de expertos de 5 ng/kg peso corporal / día (Tabla 25).

Tabla 25. Concentraciones plasmáticas de OTA (ng/ml) en diferentes regiones españolas

Rango de concentraciones (ng/ml)						
Localidad	N	LD (ng/ml)	% de positivos	Media (DE)	Mínimo	Máximo
Granada	83	0,22	84,7	0,63 (0,41)	<0,22	6,96
Madrid	168	0,02	100	0,89 (?)	0,02	5,58
Navarra	75	0,52	55,3	0,71 (0.69)	<0,52	4,00

En Italia, se han realizado diversos estudios sobre los niveles plasmáticos de ocratoxina A; en la región de la Toscana se encontraron un 97 % de las muestras con niveles detectables de ocratoxina A en un con rango entre 0,12 a 2,84 ng/ml y una media de concentración de 0,56 ng/ml y mediana de 0,48 ng/ml después de excluir un persona con una concentración en plasma de 57,2 ng/ml. Cuando se estudió un subgrupo de pacientes no se encontró una buena correlación entre los valores de OTA plasmáticos repetidos en el transcurso de un año y los niveles de ingesta de OTA, salvo en dos personas que tenían niveles de OTA en plasma superiores a 1 ng/ml. Los autores concluyen que el nivel plasmático de ocratoxina A podría ser un biomarcador útil en un período muy corto y tendría un valor limitado para evaluaciones individuales. En este caso, cuando se estimó la ingesta diaria a través de la ecuación de Klassen, un 24,8 % de la población estudiada tuvo una ingesta superior a 1 ng/kg peso corporal diario.

En Canadá cuando se analizaron muestras plasmáticas humanas (n=144) todas estaban contaminadas con ocratoxina A y se encontraron concentraciones promedio significativamente más altas en Winnipeg que en otras ciudades como Toronto, Vancouver, Saint John y New Brunswick; siendo los rangos encontrados en todo el país entre 0,29 y 2,37 ng/ml, no encontrándose diferencias por edad o sexo (Scott y col., 1998).

El comité de expertos sobre aditivos en alimentos de la FAO/ WHO basado en la nefrotoxicidad de OTA, propusieron un ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) para OTA de 0,1 ug/kg de peso corporal. Sin embargo, el grupo Nórdico de Consejo de Ministros, tal como fuera nombrado anteriormente, propuso una ingesta diaria máxima provisional tolerable de 5 ng/kg peso corporal /día similar a la Ingesta Provisional Diaria Tolerable (PTDI) establecida en Canadá (1,2 - 5,7 ng/kg peso corporal)

I.7.1.4. Encuesta

Para tener una estimación de la exposición a un contaminante es imprescindible conocer el consumo de aquellos alimentos que pueden estar contaminados. El

método más apropiado para obtener los niveles de ingesta es un cuestionario o encuesta relacionado al consumo.

Existen distintos tipos de encuestas. Por ejemplo:

- Encuesta de frecuencia de ingesta.
- Recordatorio dietético de 24 hs
- Registro dietético

Los cuestionarios de frecuencia de ingesta y la historia dietética valoran el tipo y cantidad de alimentos consumidos de manera semicuantitativa. Los métodos de frecuencia de ingesta constan de un cuestionario compuesto por una lista de alimentos, que se le presenta al encuestado y se le solicita que indique con qué frecuencia ingiere cada uno de ellos, utilizando términos fáciles de precisar, tales como veces por día, por semana o por mes. Los alimentos se eligen según los fines de estudio y no es indispensable valorar la ingesta total diaria. Por lo tanto, este tipo de encuestas no sirven para reflejar exacta y precisamente la verdadera ingesta calórica. Estas encuestas permiten la clasificación epidemiológica de los individuos según la frecuencia de ingesta de un determinado grupo de alimentos y los hábitos dietéticos que han adquirido.

Con el recordatorio dietético de 24 hs se le insta a recordar al encuestado el alimento que consumió durante algunos días habitualmente el día anterior o las anteriores 24 hs al momento de la entrevista. Este tipo de encuesta refleja con exactitud la ingesta energética de un grupo determinado pero ha demostrado mala correlación al comparar el gasto energético de un individuo con su ingesta energética.

El registro dietético es el término utilizado para los métodos en los que se anotan o registran los alimentos consumidos durante unos ciertos días generalmente entre 3 o 4 días. El registro dietético se puede realizar mediante porciones de alimento valoradas según medidas caseras (tazas, cucharas, etc.), anotando el peso del alimento servido y retirado del plato, pesado individual de todos los componentes de las comidas o fotografiado sistemático de cada una de las comidas realizadas.

Para fines específicos como es la evaluación de la ingesta de micotoxinas se han utilizado distintas encuestas, en este trabajo de tesis se utilizara la encuesta de frecuencia.

I.7.2. Fumonisin

I.7.2.1. Metabolismo de las fumonisin en distintas especies. Mecanismo de acción

Estudios con FB₁ puro demostraron que ésta interviene en dos enfermedades de interés para la agricultura causada por el consumo de alimentos contaminados con *Fusarium*, como leucoencefalomalacia en equinos y el edema pulmonar en porcinos ; también se ha observado que puede causar cancer en ratas y en humanos está asociado a una mayor tendencia a desarrollar cáncer de esófago (Gelderblom y col., 1991; Harrison y col., 1990; Kellerman y col., 1990; Marasas y col., 1988; Marvasi y col., 2006; Riley y col., 1993).

Es hepatotóxica y nefrotóxica, lo que se ha comprobado en todas las especies.

La Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC) designa a la toxina como posible carcinógeno para el hombre (grupo 2 B), se basaron principalmente sobre estudios epidemiológicos de cáncer de esófago asociados al consumo de alimentos contaminados con *F. verticillioides* en Sudáfrica y China (Marasas y col., 1988). Si bien se conoce un mecanismo común de toxicidad de la FB₁, las patologías según la especie son distintas y esto podría estar relacionado a la presencia de metabolitos de FB₁ distintos según la especie y el tejido involucrado. En una primera aproximación (Figura 17), Marvasi y col. (2006) observan que FB₁ es reconocida por una isoforma específica del citocromo P₄₅₀ que puede ser inducida por clofibrato y en esas condiciones, capaz de metabolizar FB₁ a sus formas hidrolizadas (HFB₁ y PHFB₁) y a otro metabolito probablemente hidrolizado que podría ser producido a diferentes concentraciones según la especie y el tejido.

Riley y col. (1991, 1993) fueron los primeros que observaron que la fumonisin B₁ tiene una estructura análoga a la esfingosina, y esto llevó al descubrimiento que FB₁, es un efectivo inhibidor de la ceramida sintetasa, una enzima clave en la biosíntesis de esfingolípidos. Los esfingolípidos se definen por su estructura de 1,3-dihidroxi, 2-aminoalcano. La esfingosina (Figura 18) es la estructura prevalente, base de los esfingolípidos, también se la nombra como D-eritro-1,3-dihidroxi-2-aminooctadec-4-esfinganina. Las bases esfingoides varían en la longitud de la cadena alquilo, posición del doble enlace y otros grupos funcionales como el grupo hidroxilo en posición 4 (Figura 18).

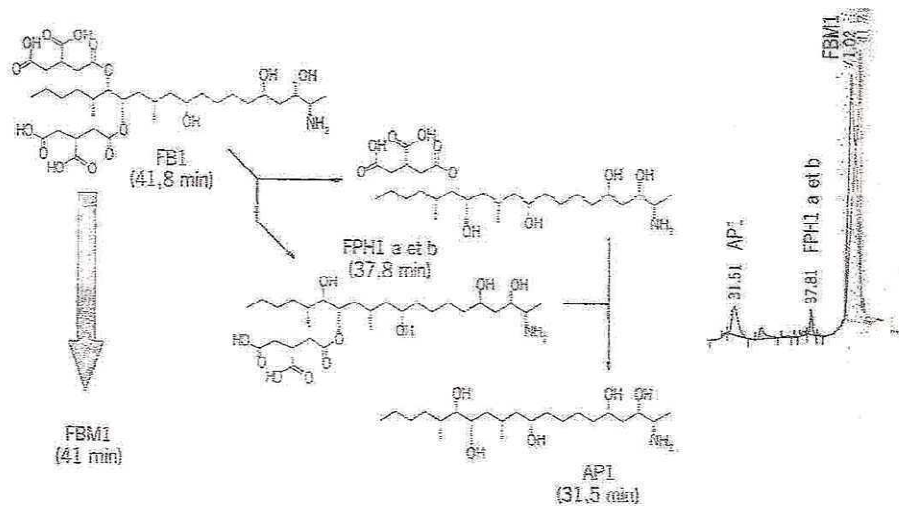


Figura 17. Fumonisina B₁ y sus metabolitos obtenidos luego que el citocromo P₄₅₀ es inducido por clofibrato

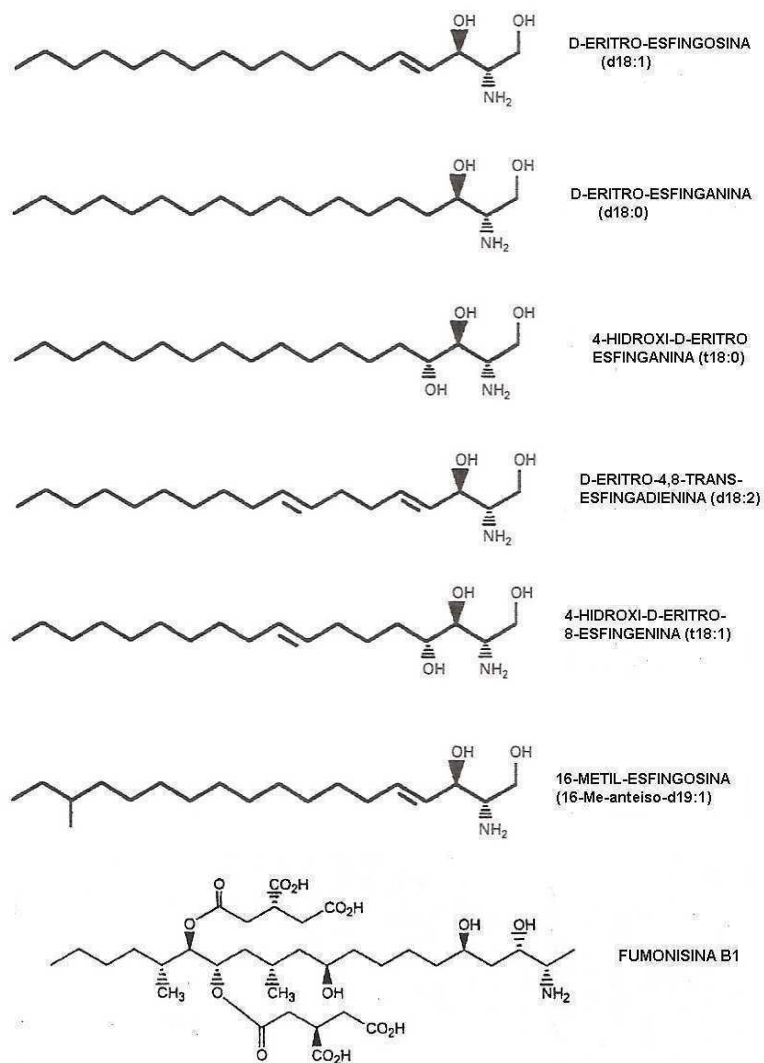


Figura 18. Estructura de fumonisina B₁, de esfinganina y esfingosina

Los esfingolípidos complejos (Figura 19) tienen un ácido graso unido mediante una unión amida (formando ceramidas) y una cabeza polar. Los ácidos grasos varían en longitud de la cadena, grado de insaturación (la mayoría están saturados) y presencia o ausencia de grupos hidroxilos en el átomo de carbono α o ω . Las cabezas polares varían en complejidad de simples fosfodiésteres a complejos carbohidratos.

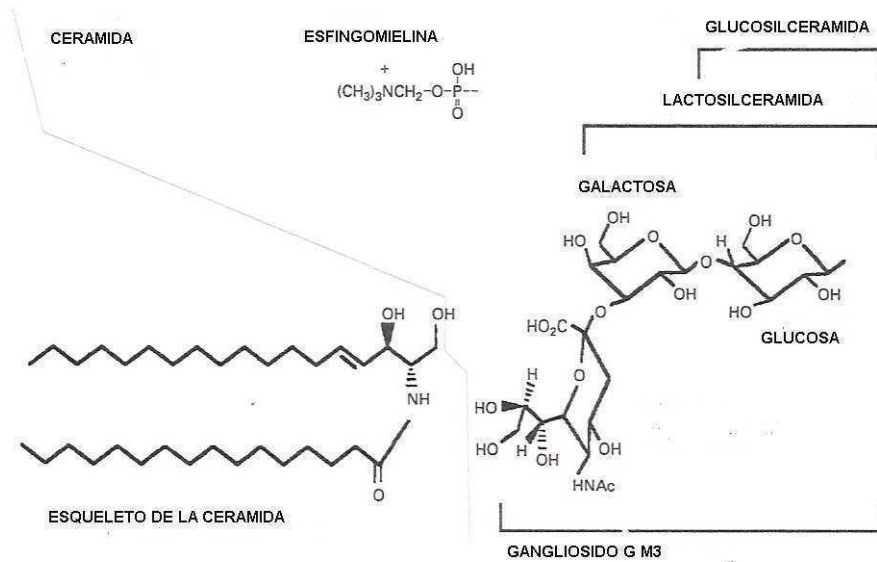


Figura 19. Estructura de esfingolípidos complejos

Los intermediarios de la biosíntesis “*de novo*” de esfingolípidos (esfingosina, dihidroceramidas y ceramidas) en condiciones normales se mantienen en bajas cantidades, pero en condiciones de stress (como la presencia de fumonisinas) se puede inducir la síntesis “*de novo*” de esfingolípidos y como las fumonisinas inhiben la ceramida sintetasa que es la enzima que acetila las bases esfingoides (esfinganina proveniente de síntesis de novo y esfingosina proveniente del turnover de esfingolípidos), se produce acumulación de la esfinganina y más tarde esfingosina y cuando hay injuria celular se inicia la degradación de las membranas (Figura 20).

Los primeros pasos ocurren en el retículo endoplásmico donde la serina se une a la palmitoil Co A (Pal-Co A) para dar 3-cetoesfinganina (KSa), la cual es reducida a esfinganina (Sa). La esfinganina es acetilada a dihidroceramidas (también llamada N-acil esfinganina, N-acil- Sa) por la ceramida sintetasa usando varias cadenas de ácidos grasos de cadenas largas. El turnover de los esfingolípidos incluye la

internalización de los esfingolípidos, seguido de la hidrólisis en los compartimientos ácidos (lisosomas y endosomas) a ceramidas (N acyl Co A), luego a esfingosina (So). La esfingosina puede ser reacetilada o fosforilada (a So-P) y clivada a aldehído de ácido graso y etanolamina fosfato, la cual es incorporada como fosfatidil etanolamina.

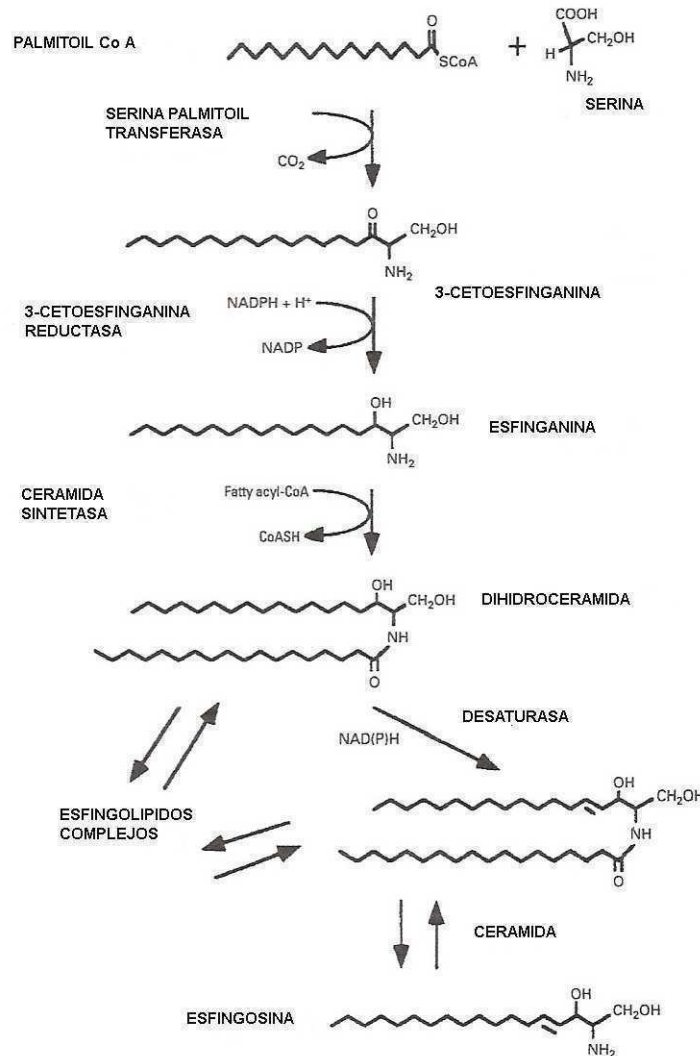


Figura 20. Biosíntesis “*de novo*” y “*turnover*” de esfingolípidos

Por un lado se tiene la síntesis *de novo*, en donde la biosíntesis de esfingolípidos ocurre primero con la condensación de la serina con la palmitoil-CA por la serina palmitoiltransferasa que resulta en la formación de 3-cetoesfinganina, esta última es luego reducida a esfinganina usando NADPH. La esfinganina es luego acilada a hidroceraidas por la ceramida sintetasa usando distintos acil-Co de ácidos grasos. Luego de la acilación del grupo amino de la esfinganina, la enzima dihidroceraida

desaturasa desatura el esqueleto de la esfinganina en posición 4,5- trans para generar esfingosina.

La esfingosina no es un intermediario en la biosíntesis *de novo*. Durante el “turnover” de los esfingolípidos se produciría la hidrólisis de los esfingolípidos complejos a ceramidas y luego a esfingosina (Figuras 21 y 22). La esfingosina puede reacetilarse o fosforilarse y luego clavarse a aldehído de ácidos grasos y etanol amina fosfato. El aldehído de ácido graso y el fosfato de etanolamina puede ser redireccionado hacia la biosíntesis de glicerolfosfolípidos y otras grasas. En presencia de FB₁, la esfinganina se acumula y hay un aumento en esfinganina 1 fosfato (Sa-P).

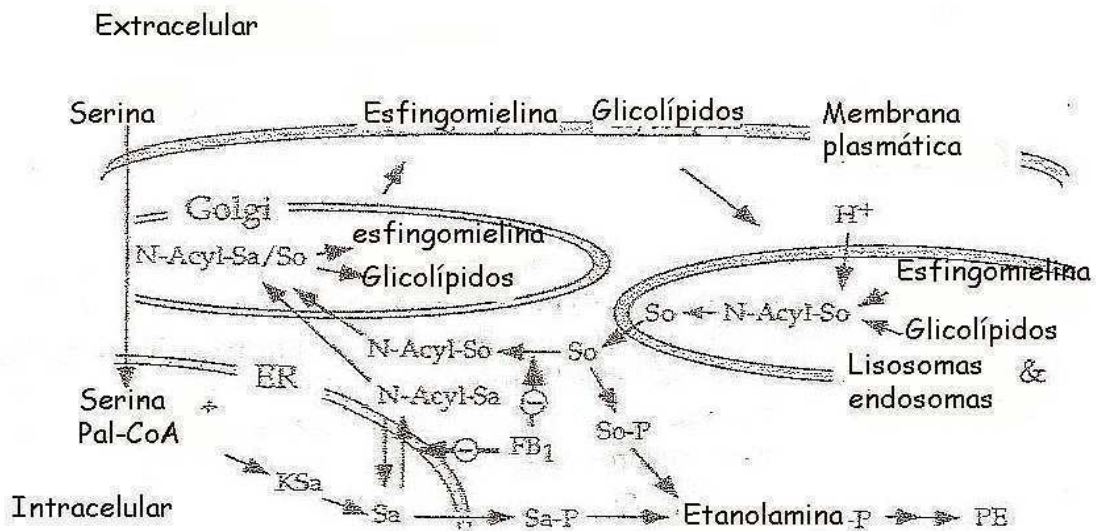


Figura 21. Inhibición de la ceramida sintetasa por FB₁ y las consecuencias de la acilación de esfinganina (en el camino de biosíntesis *de novo*) y esfingosina (en el turnover de esfingolípidos) y /o formación de esfingolípidos complejos (Jackson y col., 1996).

La ceramida sintetasa parece interactuar con FB₁ por intermedio del grupo amino libre (como análogo de esfingosina) y por intermedio de las cadenas laterales (consistente con las cargas negativas de uno o ambas cadenas laterales) interactuando con el sitio de unión de la ácido graso acyl CoA (Figura 23). De acuerdo con esto, la FB₁ intacta sería un mejor inhibidor que HFB₁.

FB₁ posiblemente interactúe con los sitios de unión de la esfinganina y ácido graso-CoA, ya que su potencia depende de los dos sustratos (Riley y col., 2001).

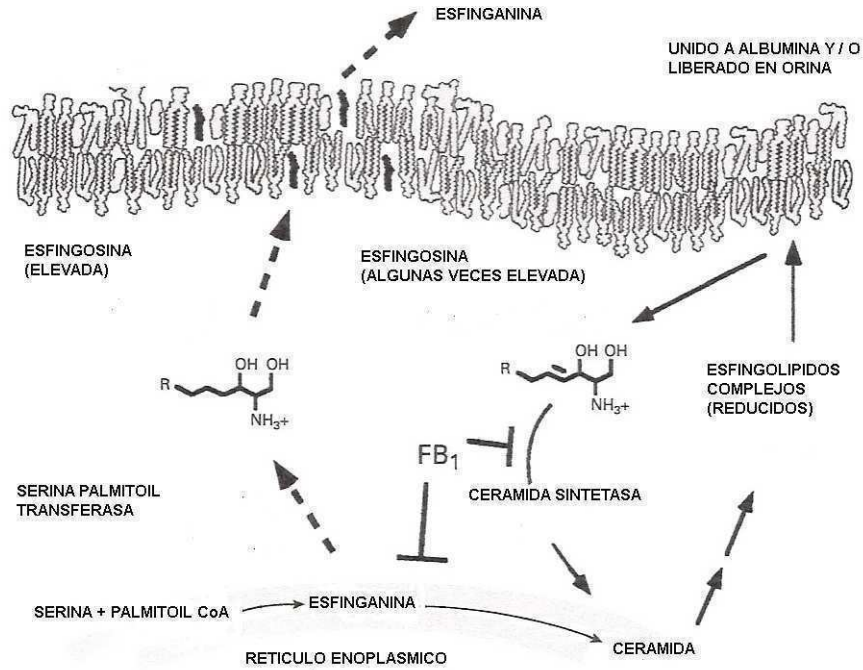


Figura. 22. Puntos de inhibición de FB₁ en el metabolismo de esfingolípidos

Por lo tanto, basado en la acción inhibitoria de FB₁ en el metabolismo lipídico, se propuso la relación esfinganina y esfingosina como un biomarcador temprano de exposición de animales domésticos a fumonisinas.

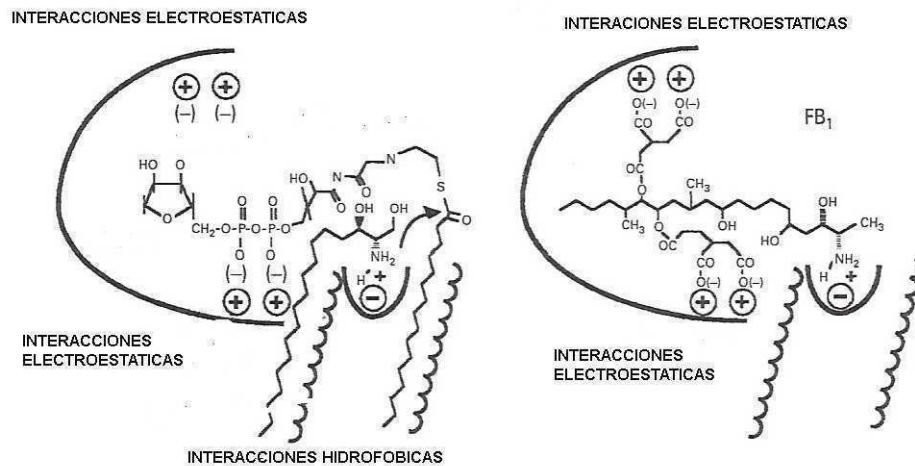


Figura 23. Modelo de sitio activo de la ceramida sintetasa y de cómo FB₁ imita las regiones de las bases esfingoides y de los sustratos de ácido graso acil Co A.

Sin embargo, se ha observado que la remoción de los ácidos tricarbálicos disminuye la potencia de la inhibición de la ceramida sintetasa *in vitro*, por lo tanto HFB₁ tendría menor poder inhibitorio que FB₁. Sin embargo si HFB₁ es sustrato de la enzima ácido graso acetyl Co A se produce el N-palmitoil AP₁ (PAP₁), que también es un inhibidor de la ceramida sintetasa *in vitro* y resulta más tóxico que FB₁ o AP₁ ya que en experimentos realizados sobre líneas celulares (Figura 24), PAP₁ produce mayor cantidad de esfinganina que FB₁ y HFB₁.

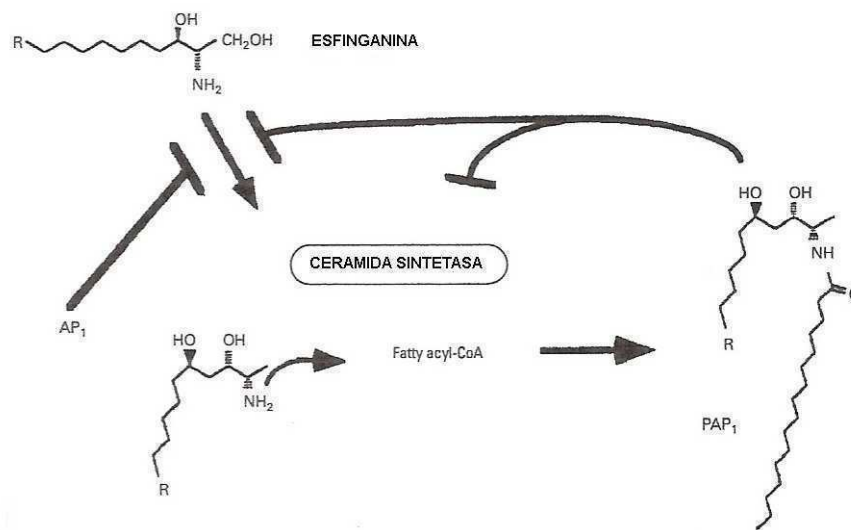


Figura 24. Inhibición de la acilación de esfinganina por AP₁, acilación de AP₁ e inhibición de la ceramida sintetasa por el producto PAP₁

La inhibición de la ceramida sintetasa puede afectar las células de distintas maneras. La esfingomielina es requerida para la estabilidad de las membranas y células. Luego del bloqueo de la biosíntesis de la esfingomielina se genera la necrosis retardada tal como ocurre en leucoencefalomalacia del equino (ELEM) y edema pulmonar del porcino (PPE). Por otro lado, Landeros y col. (2005) encuentran una asociación entre el nivel de ingesta de alimentos elaborados con maíz contaminado con fumonisinas y el nivel de Sa/So en orina. Además la relación encontrada en este trabajo de Sa/So en orina fue mayor (1,19) que la encontrada en otras poblaciones con menor ingesta de maíz contaminado (0,39, 0,35, 0,11, 0,20) como fue encontrado en los trabajos de Castegnaro y col. (1996) y Solfrizzo y col. (2004). Cuando se analizó la relación Sa/So en la orina de dos grupos poblacionales: uno con bajo nivel de consumo de maíz

(zona central de Argentina) y el otro con alto nivel de consumo de maíz (norte de Argentina y Sur de Brasil); se observa que los bajos niveles de consumo de maíz en el grupo control se correlacionaron con el bajo valor de la relación Sa/So. En cambio los resultados de la relación Sa/So fueron discordantes entre las dos zonas de alto consumo de maíz, ya que en un caso se obtuvieron altos valores de Sa/So a diferencia de la otra zona de alto consumo que resultó con bajos valores de Sa/So (Solfrizzo y col., 2004).

Estos resultados contradictorios determinaron que no se eligiera Sa/So como indicador biológico.

I.7.2.2. Biodisponibilidad de FB₁

Los alimentos de origen animal pueden presentar contaminación por micotoxinas debido a la ingesta de cereales contaminados; por lo tanto desde el punto de vista de seguridad alimentaria, es importante conocer la distribución, tiempo de vida media en sangre y biodisponibilidad de la micotoxina en las distintas especies animales, como también conocer cómo se elimina es decir si hay excreción renal, por heces y/o biliar. Para este último caso es importante tener en cuenta que la circulación enterohepática (Figura 25) puede llevar a incrementar la toxicidad de la sustancia en estudio.

Una vez formada la bilis pasan al intestino para ser excretada con las heces o reabsorbidos y llevados de nuevo al hígado. Los productos del metabolismo hepático pueden ser liberados a la sangre circulante (excreción renal) o excretados en la bilis. Este fenómeno, como se mencionó anteriormente, se conoce como el ciclo enterohepático y es la causa de que se incremente la permanencia del tóxico en el organismo. Los primeros estudios de la toxicocinética de FB₁ mostraron que la micotoxina era rápidamente absorbida (Tabla 26) después de una inyección intraperitoneal en ratas (7,5 mg/kg) alcanzando el máximo de concentración en plasma a los 20 minutos (Shepard y col., 1994c). A las 24 hs el 66 % de la dosis inicial se encontró en heces, 32 % en orina, 1 % en hígado y solamente trazas en riñón y otros órganos; cuando la misma cantidad se administró por vía oral, 101 % se eliminó

en heces. Norred y col. (1993) encontraron que a las 96 hs de la administración por vía oral de 5 mg/kg p.c., el 80 % fue eliminado en heces, 3 % en orina, 0,5 % en hígado, 0,2 % en sangre, mientras que por inyección intravenosa (22,5 µg/kg). Ellos encontraron que el 35 % aparecía en heces, 10 % en orina, 25 % en hígado y 7 % en riñón y además observaron excreción biliar cuando canalizaban los ductos biliares.

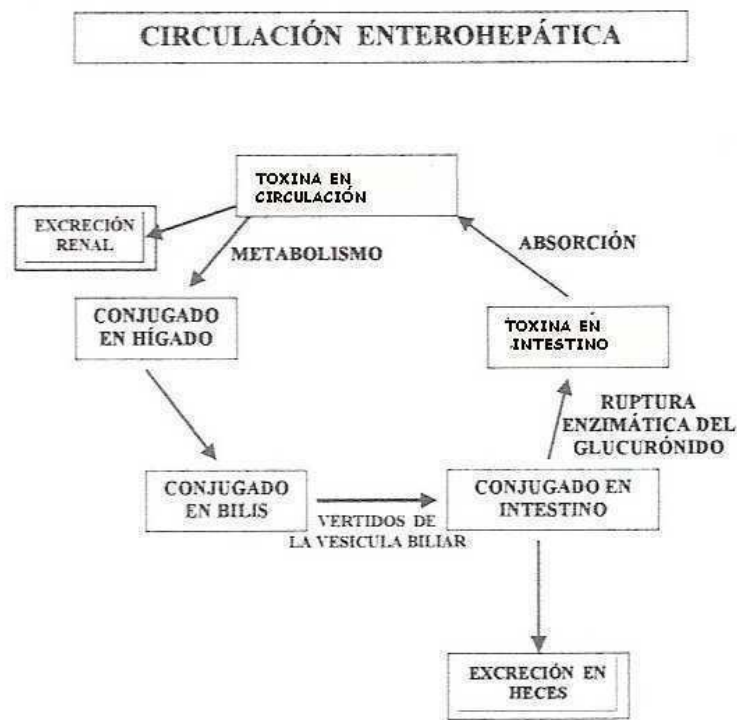


Figura 25. Esquema, circulación enterohepática

Shepard y col. (1994b) observaron que cuando se canaliza el ducto biliar de ratas y luego de una inyección i.p. de 7,5 mg/kg peso corporal de FB₁, el 67 % fue excretado en bilis luego de 24 hs de la inyección a diferencia que cuando la administración fue oral donde solo el 0,2 % fue eliminada en la bilis, lo que muestra la baja biodisponibilidad que conlleva a una baja absorción de la micotoxina. Shepard y col., (1994a), después de la administración intravenosa de FB₁ marcada (1,6 mg/kg) en monos vervet observaron que la vida media de la toxina en sangre era de solo 40' y luego de 5 días de la administración, el 47 % era recuperado en heces y orina, 72 y 28 % respectivamente. . Después de tres días de administración oral (8,0 mg/kg), el 61 % fue encontrado en heces, 12 % en contenido intestinal, 1,2 % en

orina, 1 % en músculo, 0,4 % en hígado y trazas en otros órganos. Shepard y col. (1995) observaron después de 24 hs de la administración intravenosa de FB₁ (1,72 mg/kg) que sólo 1,92 % se recuperó en el hígado, 0,62 % en músculo, 0,14 % en riñón y mucho menos en otros órganos, mientras que el 68 % de la radioactividad inicial se encontró en heces, bilis y contenido intestinal. La FB₁ marcada en la bilis estaba intacta mientras que en las heces casi un tercio de la FB₁ estaba parcialmente hidrolizada debido a la remoción de la cadena lateral en C-14. También en el caso de la administración oral de FB₂ (Shepard y col., 1999) a monos, la excreción mayoritaria correspondió a la micotoxina intacta y en menor cantidad a la toxina parcial (PHFB₂) y totalmente hidrolizada (HFB₂). Estos resultados muestran que los microorganismos presentes en el intestino de mono tienen una enzima capaz de remover solamente la cadena lateral del C-14 de la FB₁. Prelusky y col. (1994) estudiaron la toxico cinética de FB₁ en cerdos, luego de la administración intravenosa de FB₁ marcada (0.4 mg/kg) y también en el caso de la administración oral de FB₂ (Shepard y col., 1999) a monos, la excreción mayoritaria correspondió a la micotoxina intacta y en menor cantidad a la toxina parcial (PHFB₂) y totalmente hidrolizada (HFB₂). Ellos observaron que después de 72 hs las heces contenían un 58 % de la toxina, orina 21 % y en otros tejidos el 20 %. En cerdos con los ductos biliares canalizados el 71 % aparece en bilis, indicando la circulación enterohepática. En las tablas 26 y 27 se resumen los resultados de los experimentos anteriores, realizados para determinar la toxicocinética de FB₁.

Coincidencia con los experimentos anteriores muestran que la mayor parte de la toxina es eliminada por heces y muy poca es absorbida. Es así que la biodisponibilidad se define como la cantidad de toxina ingerida que alcanza la circulación sistémica y llega a los distintos órganos y tejidos periféricos. La biodisponibilidad de FB₁ (Tabla 27) determinada en distintos estudios es baja, está entre 0-6 %, lo que indica que la concentración de toxina que llega a los tejidos es baja.

Tabla 26. Resultados de la toxicocinética de FB₁ en distintos animales

Animal	Vías de administración Dosis (FB ₁) mg/kg peso corporal	Materia fecal (% dosis original)	Orina (% dosis original)	Otros tejidos o fluídos (% dosis original)	Referencia
Ratas	i.p 7,5 mg/kg oral 7,5 mg/kg	66 101	32 -	1 (hígado) -	Shepard y col., 1994a
Ratas	oral 5 mg/kg i.v. 22,5 µg/kg	80 35	3 10	0.5 (hígado) 0.2 (sangre) 25 (hígado) 7 (riñón)	Norred y col., 1993
Ratas	canalización en conducto biliar i.p 7,5 mg/kg oral 7,5 mg/kg	-	-	67 (bilis) 0.2 (bilis)	Shepard y col., 1994a
Cerdo	i.v. FB ₁ (0,4 mg/kg)	58	21	20	Prelusky y col., 1994
Mono	i.p 1,6 mg/kg oral 8 mg/kg	72 (del 47 % recuperado respecto al inicial) 61 (1/3 PHFB ₁)	28 (del 47 %) 1,2 %	 12 (contenido intestinal) 1 (músculo) 0,4 (hígado)	Shepard y col., 1994b
Mono	1,72 mg/kg FB ₁ i.v. 6,42 mg/kg oral	68 (heces + bilis = contenido intestinal) 64 (heces + bilis = contenido intestinal)	-	1,92 (hígado) 0,62 (músculo) 0,14 (riñón) 0,64 hígado 0,14 músculo 0,03 riñón	Shepard, 1995

En función de los experimentos anteriores se puede afirmar que la exposición proveniente de la ingesta de los alimentos de origen animal no presentan riesgo para la salud humana. Así en la carne de vaca, FB₁ puede ser detectada solo después de una prolongada exposición del ganado a dosis extremadamente elevadas de la toxina (Smith y Thakur, 1996). Todos los experimentos realizados *in vivo* muestran una muy baja biodisponibilidad de las fumonisinas cuando se administra en forma oral. Por

otro lado, la presencia de productos parcialmente hidrolizados en heces señalaría como responsables de la hidrólisis a las esterasas intestinales o a la acción de microorganismos que hidrolizarían solamente uno de los dos grupos tricarbálicos.

Tabla 27. Biodisponibilidad de FB₁ determinada en distintas especies animales de forma experimental

Animales	Dosis Vías de administración mg/kg peso corporal	Biodisponibilidad (%)	Referencia
Cerdos	0,5 mg/kg ¹⁴ C FB ₁ oral	3-6	Prelusky y col., 1994
Cerdos	3 mg/kg 12 días + 2 mg/kg 12 días oral	0.7	Prelusky y col., 1996
Gallinas Vacas	oral	< 1	Prelusky y col., 1995

Pagliuca y col. (2005) desarrollaron un método para la determinación simultánea de FB₁ y su metabolito HFB₁ en hígado de cerdo y en resultados preliminares detectan FB₁ y HFB₁ en el hígado, después de la administración oral de una dieta con 30 mg/kg peso corporal de FB₁ durante seis semanas, lo que indica que FB₁ se metabolizaría a HFB₁ o al menos podría ser hidrolizada y luego absorbida en el intestino. Sin embargo, no hay experimentos *in vivo* que indiquen cuál es la biodisponibilidad de HFB₁ aunque es esperable que HFB₁ sea más fácilmente absorbida en el intestino que FB₁. Caloni y col. (2002) evaluaron la absorción de FB₁ y sus metabolitos (PHFB₁, HFB₁) *in vitro*; utilizando para ello la línea celular Caco-2. Ellos determinaron que solamente HFB₁ fue absorbible por las células, lo que está de acuerdo con el hecho que HFB₁ es menos polar que FB₁ y por lo tanto más fácilmente absorbible por las células intestinales y en experimentos posteriores se observó que la glicoproteína-P estaría involucrada en la entrada y salida del aminopentol de las células intestinales (Caloni y col., 2005). Bouhet y col. (2004) determinaron en experimentos *in vitro* realizados con células de intestino de cerdo que FB₁ fue capaz de alterar la proliferación y función de las células del epitelio intestinal. Es así que por exposición crónica a FB₁ (mayor a 7 días) se produciría un aumento de la

permeabilidad de la membrana que podría llevar a un aumento de absorción de FB₁ y también a una disrupción en el metabolismo de FB₁. Como consecuencia se alterarían los receptores de membrana para las bacterias de las células del epitelio intestinal, llevando a un incremento de colonización de las bacterias patógenas en el intestino delgado y grueso. Thakur y col. (1996) no observaron productos de hidrólisis de FB₁ luego de 9 hs de incubación de fluido ruminal proveniente de vacas con FB₁ y se recuperó entre un 65 – 87 % de FB₁ intacta (Caloni y col., 2000; Jackson y col., 1996). En tanto que la incubación del contenido del ciego con FB₁ resulta en la hidrólisis de FB₁ a PHFB₁ en un 49 % y a HFB₁ en 1 %, luego de 72 hs de incubación. Todos los resultados anteriores muestran una muy baja biodisponibilidad oral de FB₁ en ratas, cerdos, pollos, vacas y monos; además casi toda la toxina FB₁ administrada por cualquier ruta (oral, intragástrica, intraperitoneal intravenosa) es rápidamente clarificada por la vía biliar y excretada ampliamente sin cambio en heces, de tal manera que solamente trazas de FB₁ son encontradas en hígado y otros órganos. Sin embargo, en experimentos realizados con otro sistema de digestión *in vitro*, (TIM) que simula las condiciones *in vivo* de tracto digestivo del cerdo, se determinó que cerca de un 90 % de las fumonisinas contaminantes fueron recuperadas en el yeyuno (como porcentaje de absorción intestinal) cuando se analizó una mezcla de granos contaminados simultáneamente con FB₁, FB₂, deoxinivalenol y zearalenona (Avantaggiato y col., 2007). Los experimentos realizados administrando ya sea por vía oral o i.p. ¹⁴C FB₁ en distintos animales (cerdos) muestran que entre 65 y 99 % de la radioactividad pudo ser recuperada (heces, orina, contenido intestinal y en otros órganos tejidos, especialmente hígado y en menor cantidad en riñón). Lo que indicaría nuevamente que la ingesta de alimentos de origen animal no presentaría riesgo de toxicidad para el hombre.

I. 7. 2. 3. Modelo de digestión *in vitro*

Una de las principales rutas de exposición a muchas contaminantes es la ingestión de alimentos. La cantidad total ingerida de un contaminante no siempre refleja la cantidad que queda disponible para su absorción y que alcanza luego la circulación

sistémica. Solamente la fracción del contaminante que es liberada del alimento (bioaccesible) y que queda biodisponible (concentración en sangre, órganos y tejidos) puede ejercer efectos tóxicos. La biodisponibilidad se considera como el resultado de tres procesos (Figura 26).

1. Liberación del compuesto de su matriz a los jugos digestivos en el tracto gastrointestinal (bioaccesibilidad).
2. Transporte a través del epitelio intestinal hacia la vena porta.
3. Degradación y/o metabolización de un compuesto en el hígado e intestino.

Bioaccesibilidad se define como la liberación de un contaminante desde el alimento ingerido hacia el tracto gastrointestinal.

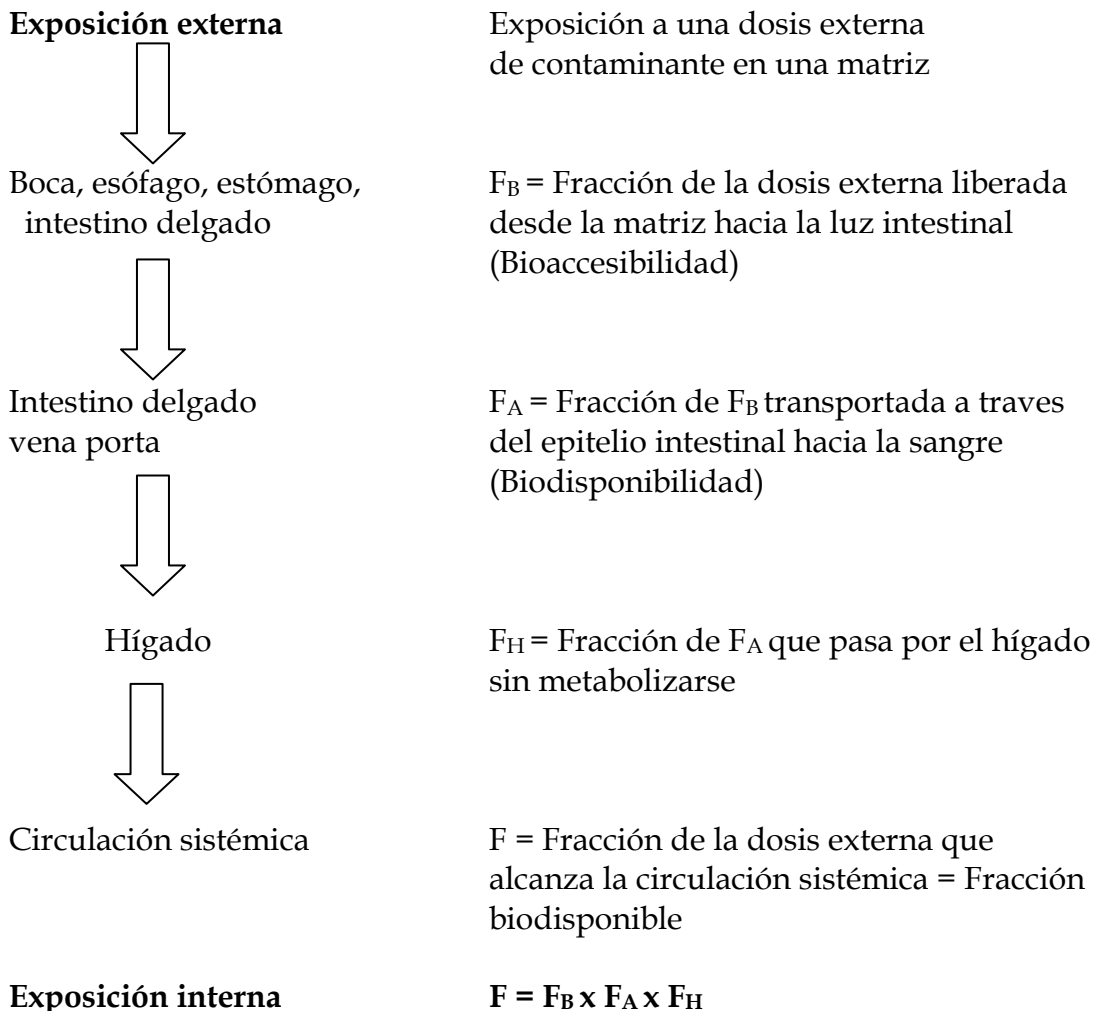


Figura 26. Representación esquemática de los procesos que determinan la biodisponibilidad oral

La matriz en la cual un contaminante está presente puede afectar la fracción del contaminante que es liberado (bioaccesible) desde la misma hacia el tracto gastrointestinal después de la ingestión. Una vez liberado de la matriz, la fracción liberada del contaminante queda bioaccesible o disponible para la absorción intestinal (Versanvoort y col., 2004). En tanto que, el transporte a través del epitelio intestinal (absorción) y el metabolismo en el hígado son dos procesos que no son afectados por el tipo de matriz en donde está presente el contaminante. Estos dos procesos dependen principalmente de las propiedades específicas del compuesto (contaminante), tales como el peso molecular (PM), la lipofiliidad y la afinidad por el citocromo P450, entre otros. La matriz por sí misma no afectará las propiedades específicas de los compuestos y luego es poco probable que ésta pueda tener por sí misma efecto sobre la absorción o metabolismo de los contaminantes (biodisponible). Estudios realizados en animales experimentales y humanos sugieren que la biodisponibilidad oral de un compuesto puede ser significativamente distinta dependiendo de la fuente alimenticia (alimento), procesamiento del alimento o preparación del alimento. Como consecuencia de ello, la ingesta de un contaminante de una matriz alimenticia A puede ser tóxica mientras que la ingesta de la misma cantidad del contaminante en el alimento B puede no ejercer efectos tóxicos. La matriz en donde está el contaminante es la que influye sobre la bioaccesibilidad de un compuesto y considerando que el transporte intestinal y el metabolismo del compuesto ingerido no son afectados por la matriz, se puede asumir que la diferencia de biodisponibilidad de un compuesto en dos diferentes matrices es una consecuencia de la diferente bioaccesibilidad del compuesto en las dos matrices. Es decir que si se quiere comparar la biodisponibilidad de un contaminante en dos matrices diferentes se puede determinar un factor de biodisponibilidad oral relativo (F):

$$F = F_{B \text{ matriz A}} / F_{B \text{ matriz B}}$$

Para estudiar la bioaccesibilidad de un contaminante es relativamente fácil y confiable, aplicar modelos de digestión *in vitro*. En este modelo el proceso de digestión en el tracto digestivo en humanos es simulado (imitado) cuando se aplican

condiciones fisiológicas: composición química de los jugos digestivos, pH y tiempo de residencia típico de cada compartimiento. Así como su nombre lo indica, el tubo digestivo es un largo conducto que se inicia en el orificio de la boca y finaliza en el esfínter externo del ano. En la luz de este conducto vuelcan sus productos órganos anexos como el páncreas, hígado y las glándulas salivares (Scacchi, 1988). Éste tiene como funciones la incorporación de sustancias, excreción y función defensiva, es decir que la digestión es el conjunto de procesos de transformación de macromoléculas, tal como se ingieren, en micromoléculas en condiciones de ser absorbidas. Para cumplir con las funciones digestivas propiamente dichas, se dispone de cuatro mecanismos principales: motilidad, secreción, digestión y absorción. La motilidad es el conjunto de fenómenos mecánicos que se producen en el tubo digestivo y que permite el contacto directo entre las distintas sustancias, propulsión es el que produce la progresión del contenido luminal a través de las distintas porciones; mientras que la secreción es el movimiento transmembrana de agua, electrolitos, solutos y proteínas entre el citosol y la luz del medio interno. Absorción es el pasaje de los constituyentes de la dieta desde la luz intestinal hacia el medio interno. El tracto digestivo (Figura 27) consta de boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y glándulas anexas.

Muchos intentos se han realizado para simular el tracto gastrointestinal humano con el fin de testear drogas, contaminantes o la ingesta de probióticos. Entre ellos está el modelo SHIME (“Simulator of intestinal microbial ecosystem”); fue diseñado para simular íntegramente el sistema digestivo y permite obtener resultados de bioaccesibilidad. El modelo original consistía de cinco reactores que representaban el duodeno/yeyuno, ileon, ciego y colon ascendente, transverso y descendente, al que se le inoculaba materia fecal humana para establecer una población bacteriana que se pareciera a la encontrada *in vivo*. Posteriormente se incluyó un sexto reactor para simular las condiciones del estómago (Molly y col., 1993). Otro modelo es el de Minekus y col. (1995) denominado TNO. El “upper gastrointestinal model” (TIM) con cuatro reactores (estómago, duodeno, yeyuno, ileon) y cuatro computadoras que controlan los recipientes que simulan las condiciones de temperatura, pH, mezclas



Copyright © 2005 McKesson Corporation and/or one of its subsidiaries. All Rights Reserved.

Figura 27. Representación del sistema digestivo humano

corporales, salivares, gástricas, intestinales con movimientos peristálticos y que tiene en cuenta a diferencia del modelo anterior, los movimientos peristálticos. Este último modelo permite estimar además la biodisponibilidad de un compuesto ya que, los productos de la digestión obtenidos en el ileon y yeyuno se dializan por un sistema de bombas a través de membranas que permiten pasar compuestos con pesos moleculares no mayores a los 5000 Dalton (Avantaggiato y col., 2007). Por otro lado fue desarrollado otro modelo de digestión “*in vitro*” llamado “modelo *in vitro*, dinámico del tracto digestivo superior” adaptado especialmente para determinar la estabilidad de los probióticos cuando son ingeridos y que utiliza dos reactores: el estomacal y duodenal (Li-Chan y col., 2006; Mainville y col., 2005). A pesar de los resultados altamente confiables obtenidos a través de los estudios *in vivo*, los modelos *in vitro*, son preferidos en muchos casos sobre los *in vivo* ya que reducen el uso de animales de experimentación y permiten el seguimiento a más largo plazo, además el tiempo consumido y costos son en general más bajos. En general, todos los modelos de digestión considerados anteriormente fueron realizados sobre el alimento previamente molido, por lo tanto la desintegración que se lleva a cabo en la

boca y continua en el estómago en general no es evaluada. Sin embargo, aquellos estudios relacionados con la velocidad de desintegración de un alimento podrían contribuir a mejorar o modificar los alimentos con el objetivo de mejorar la disponibilidad de nutrientes (Singh y Kong, 2008). En el modelo de digestión *in vitro* introducido por Oomen y Sips (2003), se simulan las condiciones de digestión en tres pasos: la boca; el estómago y el intestino delgado, ya que a partir de lo que ocurre en estos compartimentos se puede calcular la bioaccesibilidad de un compuesto. El intestino grueso no se considera porque debido que *in vivo*, la absorción de los nutrientes se produce principalmente en el intestino delgado. Versantvoort y col. (2005) aplicando el modelo de digestión *in vitro* a dos matrices distintas determinaron la bioaccesibilidad de aflatoxina y ocratoxina A con buena reproducibilidad. Se implementó este modelo para la determinación de la bioaccesibilidad de FB₁ y sus posibles productos presentes en copos de maíz.

“Nada es tan fácil como parece.” (Primer corolario de Murphy)

II. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo se enfoca hacia dos formas de estimar la exposición humana a micotoxinas. Por una parte, Ocratoxina A (OTA) a través del análisis de esta micotoxina en plasma, para en conjunto con la ingesta de alimentos, posibilite la identificación de el o los alimentos responsables de la exposición. Y, por otra parte, la evaluación de la biodisponibilidad final de fumonisinas, en copos de maíz, resultante de los procesos de elaboración que modifican químicamente la/s molécula/s de fumonisinas.

Para alcanzar estos objetivos se cumplimentaron los siguientes objetivos parciales:

- ❖ ponderar a través de una encuesta la ingesta de los alimentos más susceptibles de presentar contaminación por OTA
- ❖ implementar un método para el análisis de OTA en plasma humano en Argentina
- ❖ estimar la exposición a la OTA a partir de la ingesta y del grado de contaminación de los alimentos y de los niveles plasmáticos determinados
- ❖ implementar métodos para el análisis de fumonisinas unidas a la matriz alimentaria en Argentina
- ❖ determinar el nivel de contaminación de fumonisinas libres y unidas en alimentos altamente procesados por calor
- ❖ evaluar la bioaccesibilidad de las fumonisinas luego de incubar copos de maíz con soluciones gastrointestinales que simulan la saliva, estómago y jugos duodenales (por acción de un modelo de digestión *in vitro*)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Ocratoxina A

III.1.1. Reactivos y solventes

Tanto el metanol como el acetonitrilo fueron de grado HPLC, Baker.

Todas las otras drogas utilizadas fueron de grado analítico. Se indican en el texto el origen de las más específicas o de mayor pureza.

III .1.2. Preparación de soluciones

La solución al 12 % de trifluoruro de boro (BAKER C701-07) fue preparado en metanol como solvente.

El buffer fosfato salino (PBS) contiene 0,201 g de cloruro de potasio; 1,14 g de fosfato diácido de sodio; 0,26 g de fosfato ácido de disodio; 7,02 g de cloruro de sodio y 0,5 g de azida sódica en 1 litro de agua destilada, ajustada a pH 7,4 con HCL 1M.

III.1.3. Estándares

El estándar de OTA (O-1877) fue comprado en Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co, St. Louis. MO); las soluciones "stock fueron preparadas disolviendo 1 mg del compuesto de referencia en 1 ml de acetonitrilo: agua (3:1, v/v). Las soluciones de trabajo se prepararon realizando diluciones según fueron requeridas con metanol o con fase móvil utilizada en el cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC).

III.1 .4. Características de las muestras y de la población

Las muestras de sangre de donantes de dos localidades de la provincia de Buenos Aires fueron obtenidas, en febrero del 2004 (verano) en el Centro Regional de Hemoterapia de Mar del Plata y entre abril y julio (otoño/invierno) del 2005 en el Hospital Vicente López y Planes de General Rodríguez. El número de muestras fue 205 para Mar del Plata y 275 para General Rodríguez. Sin embargo, después de excluir muestras de donantes con serología positiva para HIV y enfermedad de

Chagas, el número de muestras se redujo a 199 para Mar del Plata y 236 para General Rodríguez (Tabla 28).

Tabla 28: Donantes de sangre en Mar del Plata y General Rodríguez

Ciudad	Cantidad de muestra		
	Mujer	Hombre	Total
Mar del Plata	57	142	199
General Rodríguez	43	193	236

El 71 % y 82 % de los donantes fueron hombres en Mar del Plata y General Rodríguez respectivamente (Figura 28). Las muestras de sangre luego de su extracción fueron recibidas en tubos vacutainer con anticoagulante K₃EDTA. Los plasmas fueron separados por centrifugación y mantenidos a -18 °C hasta su análisis.



Figura 28. Planos de la provincia de Buenos Aires que muestra la ubicación de ambas poblaciones

III.1.5. Ocratoxina A en plasma

III.1.5.1. Extracción y limpieza del plasma

La presencia de ocratoxina A fue analizada en el plasma por el método de Scott y col. (1998) con algunas modificaciones.

Un mililitro de plasma fue mezclado con 0,25 ml de solución saturada de cloruro de sodio y 5 ml de metanol con agitador, vortex durante 15 segundos en un tubo de centrífuga, luego centrifugado a 500 g durante 15 minutos. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y mezclado con 5 ml de ácido ortofosfórico 0,015 M antes de agregar a una columna Bakerbond® C-18 (art. 7020), precondicionado con 10 ml de metanol seguido de 6 ml de metanol: ácido ortofosfórico 0,015 M (1: 1, v/v). Los solventes fueron eluidos a través de la columna por gravedad a una velocidad de flujo de 1 a 2 gotas por segundo.

Luego del agregado del sobrenadante, la columna fue lavada para eliminar interferencias con 5 ml de ácido ortofosfórico seguido de 5 ml de metanol: ácido ortofosfórico 0,015 M (1:1, v/v). Se agregaron 2 mililitros de metanol al cartucho y se dejó durante 3 minutos antes de la elución. Se colectaron el extracto y el eluato y se evaporó el extracto a 60 °C en vacío. El extracto evaporado fue disuelto con tres porciones de 2,5 ml de una solución de buffer fosfato salino PBS: metanol (85:15, v/v) y agregado a una columna Ochraprep®. Todos los solventes fueron eluidos a través de la columna por gravedad. La columna fue lavada con 5 ml de solución de PBS: metanol (85:15, v/v) seguido de 10 ml de agua destilada.

La OTA fue eluída con dos pasos de aspiración y expulsión con jeringa de 10 ml conectada a la columna. En el primer paso se usaron 3 ml de metanol y en el segundo 1,5 ml de metanol. Las porciones eluidas se colectaron y el eluído fue evaporado a sequedad con vacío, a 30 °C. El extracto evaporado fue disuelto en 200 µl de la fase móvil dentro de un vial silanizado para su análisis por HPLC.

Un esquema del método se observa en la figura 29.

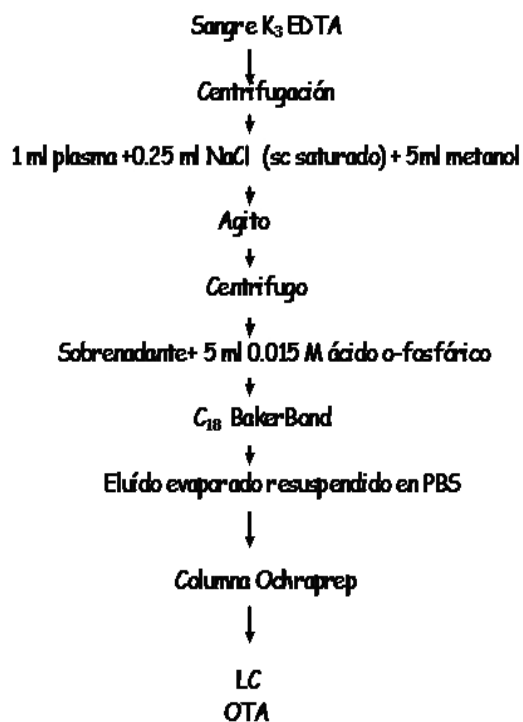


Figura 29. Método de extracción y limpieza de ocratoxina A en plasma

La estabilidad de los resultados del test fueron chequeados siguiendo una muestra control fortificada a lo largo del período. En la figura 30 se encuentra la carta de control correspondiente.

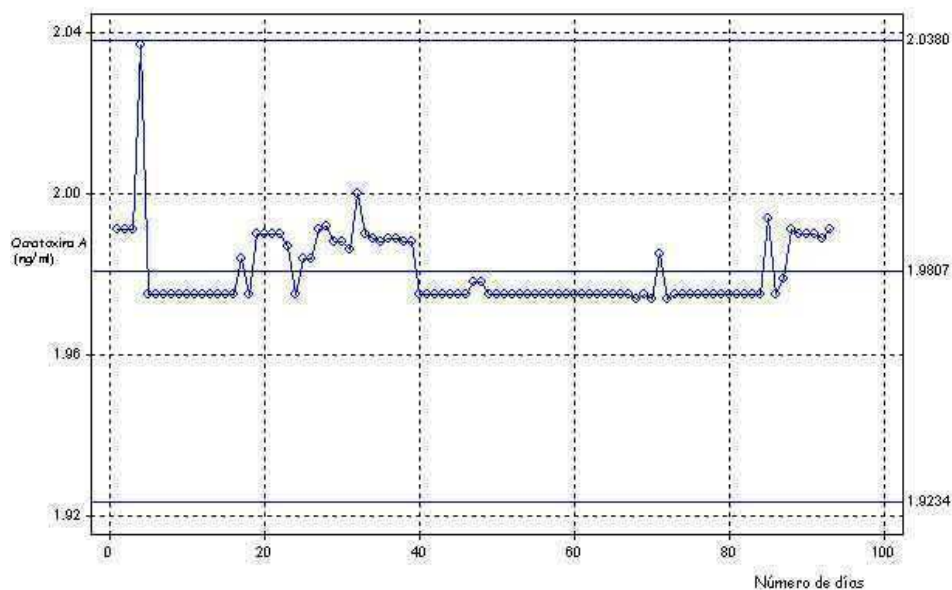


Figura 30. Carta control de una muestra fortificada con ocratoxina A

III.1.5.2. Cromatografía Líquida

El sistema de HPLC fue un Agilent® 1100 serie, que comprende un “degasser” (G1322A), un “autosampler” (G1313A), un detector de fluorescencia (G1321A), una bomba cuaternaria (G1311A) un compartimiento termostatzado para columna (G1316A) y una estación de trabajo. La columna utilizada fue una C18 de fase reversa (4 mm i.d. x 125 mm) conteniendo 5 µm de tamaño de partícula, Hypersil BDS, Hypersil® con un guarda columna de la misma fase (Hypersil BDS C18 4 mm i.d. x 4 mm, 5 µm). La velocidad de flujo de la fase móvil fue 1 ml min⁻¹.

Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron fijadas a 330 nm y 470 nm respectivamente. Los tiempos de retención de OTA estuvieron en el rango de 2-3 min.

III.1.5.2. 1. Confirmación de OTA por formación del metil éster

La confirmación de la presencia de OTA fue realizada a través de la formación del metil éster de OTA.

El metil éster de ocratoxina A fue preparado por la técnica de Grosso y col. (2003) con algunas modificaciones. Es así que, una porción cuantificada de la fase metanólica proveniente de la columna inmunológica fue evaporada a sequedad y resuspendida en 200 µl de una solución metanólica de trifluoruro de boro. Después de 15 minutos de calentamiento a 60 °C, el derivado fue analizado por HPLC. Los límites de detección y cuantificación expresados como OTA fueron calculados a una relación señal-ruido de aproximadamente 3:1 y 5:1 respectivamente (0,017 ng ml⁻¹ y 0,028 ng ml⁻¹). La confirmación de OTA como metil éster fue realizada sobre todas las muestras contaminadas. Los tiempos de retención del metil éster de OTA fue de aproximadamente 16,3 min.

III.1.6. Encuesta alimentaria

En el momento de la extracción de sangre se realizó una encuesta de frecuencia alimentaria sobre la ingesta de ciertos alimentos ingeridos en los últimos tres meses previo a la extracción de sangre, por medio de un formulario que permite recoger

información sobre la frecuencia de consumo y las cantidades ingeridas. En la encuesta se consignó la edad, sexo, peso y talla. Se encuestó sobre 43 tipos de alimentos en Mar del Plata y 40 en General Rodríguez; en este último caso el café fue encuestado junto con las infusiones, el chocolate con las golosinas y el riñón de cerdo con la carne de cerdo. En la encuesta se incluyeron 18 alimentos que se consideraron importantes como fuente de contaminación por OTA. Entre ellos cerveza, vino, café, polenta, mezcla de cereales, carne de ave, otras carnes, avena, legumbres, frutas secas, pasta de maní, fiambres crudos, fiambres cocidos, panificados, galletas, fideos secos, chocolate, riñón de cerdo. El tamaño de la porción de los diferentes alimentos fue convertido a peso teniendo en cuenta las porciones estándares (Ver encuestas anexo 1).

III. 1.7. Estimación de la ingesta de ocratoxina A basada en los niveles en plasma

El promedio de los niveles de ocratoxina A en sangre fue usado para estimar la ingesta dietaria continua de acuerdo a la ecuación de Klassen (Breitholtz y col., 1991a; Thunvander y col., 2001).

$$\begin{aligned} \text{Ecuación de Klassen} \quad K_0 &= 0,99 \times C_p / 0,5 = 1,97 \times C_p \text{ y/o} \\ K_0 &= 0,67 \times C_p / 0,5 = 1,34 \times C_p, \end{aligned}$$

K_0 : ingesta dietaria continua (ng kg^{-1} peso corporal por día⁻¹)

C_p : Concentración plasmática de OTA (ng ml^{-1})

III.1.8. Análisis estadístico

El ingreso de datos de la encuesta se realizó a través de un programa para ingreso y validación de datos estadísticos con lenguaje Visual Basic (2004) para macros de Excell.

El software S-Plus 7.0 fue utilizado para el análisis estadístico (SAS Institute, Inc., SAS Online Doc® 1999).

Se calcularon las medias, media winsorizada, medianas, desviación estándar y desviación estándar winsorizada.

Un test t winsorizado fue usado, para testear la hipótesis que los promedios de las concentraciones plasmáticas de OTA de los dos grupos poblacionales son iguales.

El estadístico de este test está dado por:

$$t_{wt} = \frac{\bar{y}_{wt}}{\text{STDERR}(\bar{y}_{wt})}$$

donde STDERR es el error estándar de: X_{wk}

$$\text{STDERR}(\bar{y}_{wt}) = \frac{n-1}{n-2k-1} \frac{s_{wk}}{\sqrt{n(n-1)}}$$

Para calcular el promedio winsorizado a las muestras con resultados no detectados se le asignaron valores de LD/2 y se le asignaron a las muestras con niveles de contaminación por OTA entre el LD y LQ los valores obtenidos.

Los estudios de correlación se analizaron por el coeficiente de correlación de Pearson (Tsokos, 1987).

La media alfa winsorizada fue calculada con todos los datos, menos los datos extremos que fueron reemplazados por el valor del último dato no reemplazado e integrados en el cálculo de la media.

La comparación o contraste de las medias fue realizado para evaluar la hipótesis si las medias de dos grupos de datos son iguales. (Hampel, 1968; García Perez, 2002).

III.2. Fumonisin

III. 2.1. Reactivos y solventes

Los solventes metanol y acetonitrilo utilizados eran de grado HPLC (OmniSolv® EMD). Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

Se indican en el texto el origen de las más específicas o de mayor pureza.

El reactivo de O-ftaldialdehído (P 0657, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) (OPA) se preparó como una solución de 40 mg de OPA diluido en 1 ml de metanol y 5 ml 0,1 M de tetraborato de sodio con el agregado de 50 µl de 2-mercaptoetanol (M6250,

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) (MCE). Esta solución fue guardada al resguardo de la luz por un período de tiempo no superior a 1 semana (De Girolamo y col., 2001b).

El buffer fosfato salino (PBS) contiene 0,2 g de cloruro de potasio; 0,2 g de fosfato diácido de potasio; 1,16 g de fosfato ácido de disódico; 8 g de cloruro de sodio y 1 g de azida sódica en 1 litro de agua destilada, ajustada a pH 7,0 con HCL 1M.

La solución buffer pH 13,51 fue preparada por mezcla de 25 ml de KCl 0,2 M con 66 ml NaOH 0,2 M hasta un volumen final de 100 ml con agua destilada.

La urea utilizada fue (U 5128, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) reactivo ACS, 99-100,5 % y la albúmina bovina sérica (A 7906, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

Bilis bovina (Sigma B 3883, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

La α -Amilasa (A 4551, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) de *Bacillus licheniformis*, 500-1500 unidades/mg proteína. Acción: capaz de liberar 1 mg de maltosa del almidón en 3 minutos a 37 °C, pH 6,9.

Pancreatina (P 8096, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) de páncreas de cerdo, reúne las especificaciones de USP. Acción: Puede convertir no menos de 25 veces su peso de almidón de papa en carbohidrato soluble en 5 minutos en agua a 40 °C; puede liberar no menos de 25 veces su peso de caseína en 60 minutos a pH 7,5 a 40 °C y puede liberar no menos de 2 microequivalentes de ácido por minuto por mg de pancreatina de aceite de oliva a pH 9,0 a 37 °C, Contiene muchas enzimas como amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa.

Pancreatina (P 7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) de páncreas de cerdo, que presenta 8 veces las especificaciones de USP. Puede convertir no menos de 25 veces su peso de almidón de papa en carbohidrato soluble en 5 minutos en agua a 40 °C; puede liberar no menos de 25 veces su peso de caseína en 60 minutos a pH 7,5 a 40 °C y puede liberar no menos de 2 microequivalentes de ácido por minuto por mg de pancreatina de aceite de oliva a pH 9,0 a 37 °C. Contiene muchas enzimas como amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y proteasa.

Lipasa (L 1754, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) de *Candida rugosa*, 1,410 unidades/mg sólido; mucina (M 3895) tipo I-S. Acción: tri, di y mono glicéridos son

hidrolizados en cantidad decreciente desde tri a mono glicéridos. Una unidad puede hidrolizar un microequivalente de ácido graso a partir de triglicérido en 1 hora a pH 7,7 a 37 °C.

Pepsina (P-7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU)), de mucosa porcina gástrica, 800-2500 unidades/ mg de proteína. Cliva principalmente a nivel del C-terminal de fenilalanina, leucina y ácido glutámico. Actividad óptima a pH 2-4. Es irreversiblemente inactivada a pH > 6,0.

III.2.2. Estándares

La fumonisina B₁ (FB₁) utilizada como estándar fue adquirida en Sigma-Aldrich (F-114,7 St. Louis. MO, EEUU); el aminopentol o la fumonisina B₁ totalmente hidrolizada (HFB₁) fue una donación de R.M. Eppley, US Food and Drug administration (5100 Paint Branch Parkway, College Park, MD, 20740, USA). Las soluciones "stocks" fueron preparadas disolviendo 1 mg del compuesto de referencia en 1 ml de acetonitrilo: agua (3:1, v/v). Las soluciones de trabajo se realizaron por dilución a partir de la solución madre con acetonitrilo: agua (3:1, v/v).

Fumonisina B₁ parcialmente hidrolizada (PHFB₁) fue preparada por hidrólisis de 1 ml de solución de 10 ng/μl de FB₁ con el agregado de 1 ml de KOH 2M. Se hidrolizó a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se acidificó la solución hasta pH 4,5 con ClH 5 M para detener la reacción. Luego, se realizó una limpieza de 2 ml de la muestra hidrolizada en una columna de extracción de fase sólida C-18 (SPE), preacondicionada con 3 ml de metanol y 3 ml de agua. La columna se lavó con 3 ml de agua y la elución se realizó con 6 ml de metanol y 2 ml de metanol: 8% de ácido acético (75:25, v/v). Esta solución también contenía FB₁ y HFB₁. (Rice y Ross, 1994; Sydenham y col., 1995; Thakur y Smith, 1996; Xie y col., 1997).

III.2.3. Muestras

Se compraron 22 muestras al azar de copos de maíz de diferentes marcas que se comercializaban en Mar del Plata durante el año 2002 (Tabla 29).

Tabla 29. Características de las muestras de copos de maíz adquiridas en Mar del Plata



Nombre	Número muestras con distinto lote (n)	Carbohidratos (porción: 30 g)				Proteína (g)	Sodio (mg)
		Fibra	Azúcar	Carbohidratos Total	(Otros carbohidratos) Almidón		
PP ⁽¹⁾	3	1,4	<u>2,0</u>	24	<u>20,6</u>	1,9	190
GR ⁽²⁾	2	1,2	<u>2,0</u>	26	<u>22,8</u>	2,5	279
TA ⁽³⁾	3	1,8	<u>2,0</u>	25	<u>21,2</u>	1,9	200
NE ⁽⁴⁾	3	1,4	3,0	<u>25</u>	<u>20,6</u>	2,0	190
NU ⁽⁵⁾	3	<u>1,8</u>	<u>2,0</u>	<u>25</u>	<u>21,2</u>	<u>1,9</u>	<u>200</u>
KE ⁽⁶⁾	2	0,9	2,1	25	22	2,4	330
SO ⁽⁷⁾	2	<u>1,4</u>	<u>3,0</u>	<u>25</u>	<u>20,6</u>	<u>2,0</u>	<u>190</u>
BE ⁽⁸⁾	1	1,2	<u>2,0</u>	25	<u>21,8</u>	2,4	270
FN ⁽⁹⁾	1	<u>1,4</u>	<u>2,0</u>	<u>24</u>	<u>20,6</u>	<u>1,9</u>	<u>190</u>
SA ⁽¹⁰⁾	1	<u>1,2</u>	<u>2,0</u>	<u>26</u>	<u>22,8</u>	<u>2,5</u>	<u>279</u>
CA ⁽¹¹⁾	1	1,2	<u>2,0</u>	23,8	<u>20,2</u>	2,0	270

⁽¹⁾Primer Precio, ⁽²⁾ Granix, ⁽³⁾ Tres Arroyos, ⁽⁴⁾ Nestle, ⁽⁵⁾ Nutridía, ⁽⁶⁾ Kelloggs, ⁽⁷⁾ Solcitos, ⁽⁸⁾ Bell's, ⁽⁹⁾ Fitness Nestle, ⁽¹⁰⁾ Sol de Acuario, ⁽¹¹⁾ Carrefour.

Nota: Los números subrayados corresponden a los calculados a partir del rótulo.

Ocho muestras de copos de maíz, dos de “corn bran”, 1 de “corn pops”, 1 de “corn dunks” y una de “corn crispix” fueron compradas en comercios de Ottawa, Canadá entre mayo-junio del año 2005 y abril-julio 2006 (Tabla 30).

Aproximadamente 300 g de cada muestra fueron molidas con una licuadora (Osterizer, Sunbeam Inc. Boca Raton, FL) durante 3 minutos y luego conservadas en freezer hasta su análisis. En la Figura 31 se muestra el rótulo de una de las muestras que va a ser utilizada posteriormente para medir la bioaccesibilidad.



Figura 31. Frente del envase de los copos de maíz rotulados como FN12

Tabla 30. Características de las muestras a base de maíz adquiridas en Ottawa, Canadá

Tipo de muestra	Nombre (1)	Carbohidratos (cada 30 g)			Proteínas (g)	Sodio (mg)	Potasio (mg)
		Fibra	Azúcar	Almidón			
"Corn pops"	PK1	0	11	16	1	200	35
"Corn bran"	BQ2	4,8	6,1	13	2	275	72
"Corn flakes"	FK3	1	2	23	2	220	30
"Corn flakes"	FM4	0,8	2,3	2,3	2,1	290	30
"Organic honey corn flakes"	FN5	2	4	20	2	(3)	-(3)
"Corn flakes"	FP6	1	2	23	2	240	-(3)
"Corn dunks"	DP7	0	9	17	2	190	-(3)
"Crispix"	CK8	0,5	3,2	22	2,2	245	30
"Corn flakes"	FK9	1	2	23	2	220	30
Corn bran	BQ10	4,6	6,1	13	2	275	72
"Corn flakes"	FP11	1	2	23	2	240	-(3)
"Corn flakes"	FN12	2	4	20	2	170	-(3)
"Corn flakes"	FMC13 (2)	1	2	24	2	280	-(3)

(1) El nombre elegido para cada producto indica el tipo de producto, marca y número de orden

(2) Origen Estados Unidos, el resto de los productos provienen de Canadá

(3) Valores no presentes en la información nutricional

III.2.4. Determinación y análisis

III.2.4.1. Extracción y limpieza de fumonisinas libres

Las muestras de copos de maíz de Mar del Plata fueron analizadas por dos métodos para la determinación de las fumonisinas libres. El primero de ellos se realizó la extracción y limpieza de los extractos de acuerdo al método de AOAC (Sydenham y col., 1992) para maíz (Figura 32). La extracción se realizó con Metanol: H₂O y limpieza con columna de intercambio aniónico (SAX). Mientras que, el segundo se realizó la extracción con metanol: acetonitrilo: agua (25:25:50, v/v/v) y limpieza con columna inmunológica.

Cincuenta g de copos de maíz molidos fueron extraídos con 100 ml de metanol: agua (3:1, v/v) por 2 minutos. Luego el extracto es filtrado por papel de filtro Whatman N°4 y centrifugado posteriormente 10 minutos a 500 g. Se ajustó el pH del extracto a 6,0 con I o II de NaOH 1 M. Diez mililitros del extracto se pasan a través de una columna SAX activada previamente con 5 ml de metanol y 5 ml de metanol: agua (3:1, v/v), posteriormente se lavó con 5 ml de metanol: agua (3:1, v/v) y 5 ml de metanol. Se eluyó con 10 ml de acetonitrilo: metanol (1:99, v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml/minuto. El eluido se evaporó a sequedad al vacío a 60 °C (Figura 31).

En el método inmunológico 20 g de copos de maíz molidos fueron extraídos dos veces con 50 ml de acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50 v/v/v) por 30 minutos en un agitador horizontal desarrollado en el laboratorio, luego centrifugado por 10 minutos a 2200 g (Rolco, Argentina). Cuarenta mililitros de PBS fueron agregados a diez mililitros de los extractos combinados y luego de homogeneizado, diez mililitros fueron agregados a la columna de inmunoafinidad.

Fumonitest™ (IAC) (Vicom, Watertown, MA, USA); la columna fue lavada luego con 10 mililitros de PBS y por último las fumonisinas fueron eluidas con 1.5 mililitros de metanol (Figura 32).

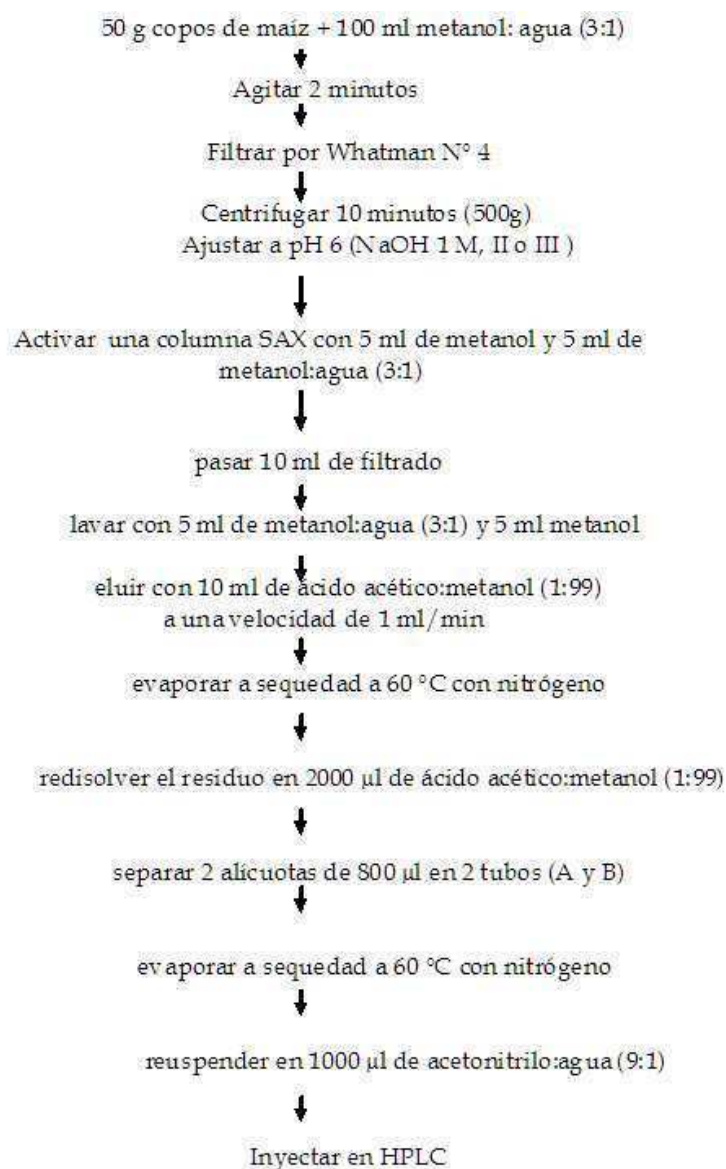


Figura 31. Extracción y limpieza de fumonisinas libres en copos de maíz (Método AOAC, (Sydenham y col., 1992) de Mar del Plata

Las muestras de copos de maíz y otros productos detallados en la tabla 30 en Canadá se analizaron de la siguiente manera: diez g de copos de maíz molidos fueron extraídos dos veces con 50 ml de acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50, v/v/v) por 30 minutos en un agitador horizontal (Eberbach Corporation, modelo 6010), luego centrifugado por 10 minutos a 2200 g (Hettich Rotina model 35) (De Girolamo y col., 2001a y b; Scott y Lawrence, 1996), se agregaron cuarenta mililitros de PBS a diez mililitros de los extractos combinados y luego de homogeneizado, diez mililitros fueron agregados a la columna de inmunoafinidad, Fumonitest™ (IAC) (Vicom,

Watertown, MA, USA); la columna fue lavada luego con 5 mililitros de PBS y por último las fumonisinas fueron eluidas con 3,5 mililitros de metanol, Para la determinación de HFB₁, 5 ml de los extractos combinados fueron agregados a una columna SPE, Varian HF C₁₈ (3 cc), previamente acondicionada con 3 ml de agua y 3 ml de metanol. La columna fue lavada con 3 ml de agua y luego 3 ml de metanol: agua (25:75, v/v).

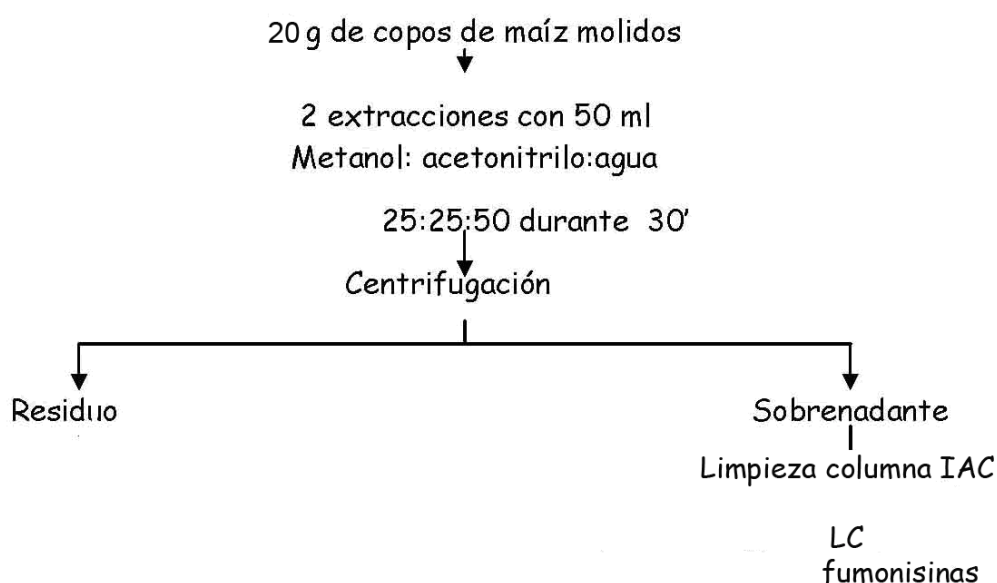


Figura 32. Extracción y limpieza de las fumonisinas en columna de inmunoafinidad

La elución de HFB₁ fue realizada con 6 ml de metanol y 3 ml de metanol: 8 % ácido acético (75:25, v/v).

Los eluidos fueron evaporados bajo una corriente de nitrógeno a aproximadamente 55 °C en un bloque calentador y el residuo fue disuelto en 300 µl de acetonitrilo: agua (3:1, v/v).

Un esquema de la extracción y limpieza de las fumonisinas libres de copos de maíz se puede observar en las Figuras 33 y 34.

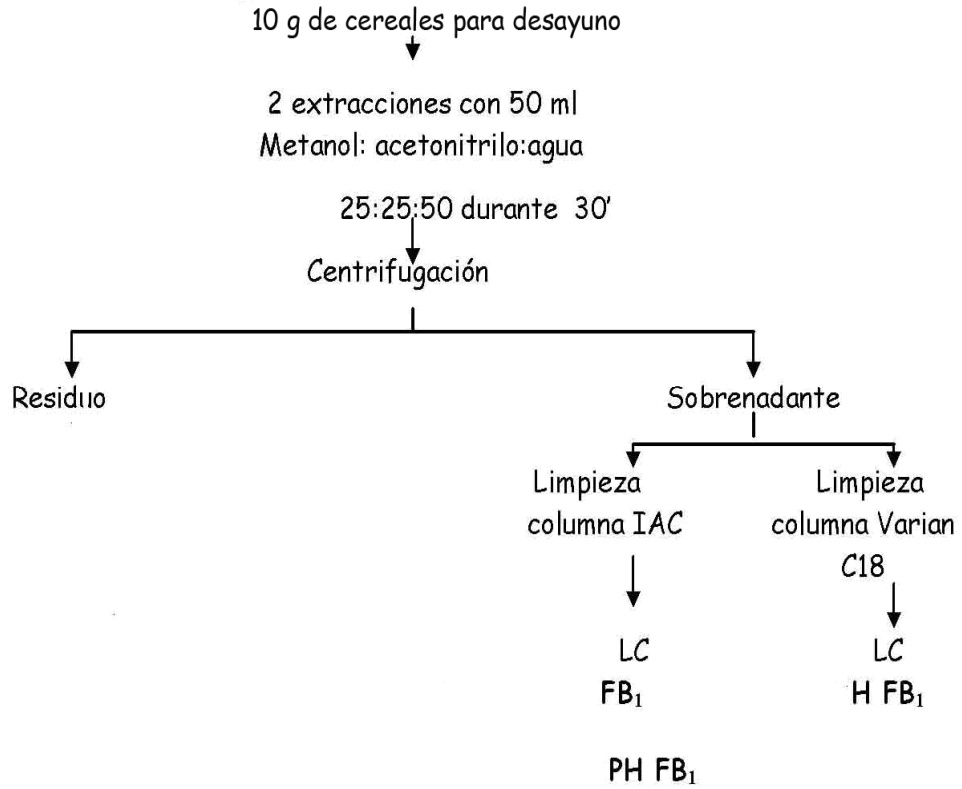


Figura 33. Extracción y limpieza de fumonisinias libres en copos de maíz

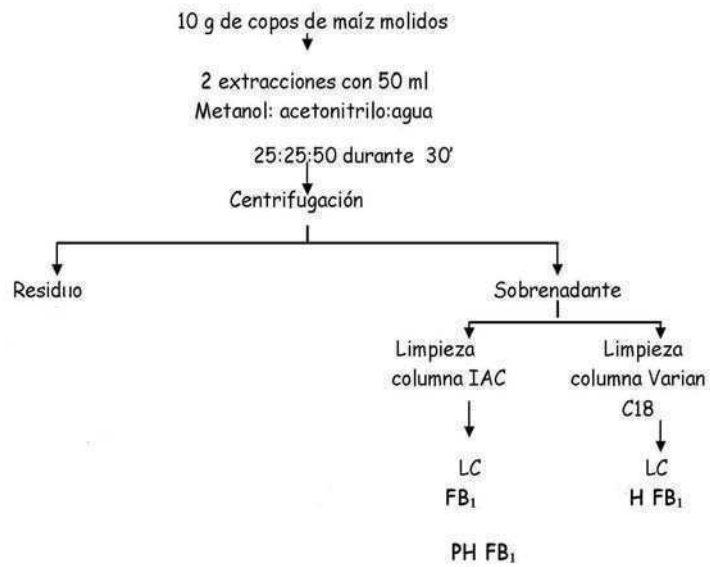


Figura 34. Extracción y limpieza de fumonisinias libres en copos de maíz

III.2.4.2. Extracción y limpieza de fumonisinas unidas

Las fumonisinas unidas a proteínas (PBFB₁) y fumonisinas unidas totales (TBFB₁) fueron determinadas por el método de Kim y col. (2003) y Park y col. (2004) con algunas modificaciones.

Para PBFB₁, 10 g de copos de maíz fueron extraídos tres veces con acetonitrilo: metanol:agua (25:25:50, v/v/v) y una vez con agua, los extractos fueron descartados; el sólido remanente fue extraído con 25 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Para sacar el SDS, ya que puede interferir en el análisis por HPLC, 5 ml del sobrenadante provenientes de la extracción con SDS, fueron trasvasados a una ampolla de decantación de 60 ml y luego mezclados con 5 ml de KOH 2 M y 2 ml de azul de metileno en agua 1 % (p/v). La mezcla fue lavada con 30 ml de hexano: iso-amil alcohol (80:20, v/v) tres veces y la fase acuosa inferior fue hidrolizada a 60 °C durante 1 h en un baño de agua con agitación (Julabo modelo SW 22) a 190 rpm. Después de enfriar, 3 ml de la fase acuosa hidrolizada fueron sometidos a una limpieza en una columna de extracción OASIS® HLB 3 cc (60 mg, Waters, Milford, MA, EEUU), preconditionada con 3 ml de metanol y 3 ml de metanol: agua (50:50, v/v). Se eluyó con 2,5 ml de metanol: solución acuosa de ácido acético 8 % (75:25, v/v) (Figura 35).

Para TBFB₁, 10 g de copos de maíz fueron extraídos tres veces con acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50, v/v/v) y una vez con agua. El sólido remanente fue hidrolizado con 20 ml de KOH 4M a 60 °C durante 1 h con agitación constante a 190 rpm, luego de esto, la mezcla fue enfriada bajo canilla. El hidrolizado fue extraído tres veces con 60 ml de ácido etilen diamino tetrácetico (EDTA) 0,01 M: metanol (7:3, v/v) durante 30 minutos y luego separado por centrifugación a 11200g en una centrífuga Sorvall modelo SS-4.

Doce mililitros de los extractos combinados fueron agregados a una columna OASIS® HLB 3 cc, preconditionada con 3 ml de metanol y 3 ml de metanol: agua (20:80, v/v). La columna fue lavada con 3 ml de metanol: agua (20:80, v/v), 3 ml de metanol: agua (50:50, v/v) y 3 ml de metanol: agua (67:33, v/v). Para la elución de HFB₁, 1 ml de metanol: agua (75:25, v/v) y 2 ml de metanol: solución acuosa de ácido acético 8 % (75:25, v/v) fueron agregados a la columna. Todos los líquidos pasaron a

través de la columna por gravedad. El eluido fue evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y reconstituido en acetonitrilo: agua (75:25, v/v) (Figura 36).

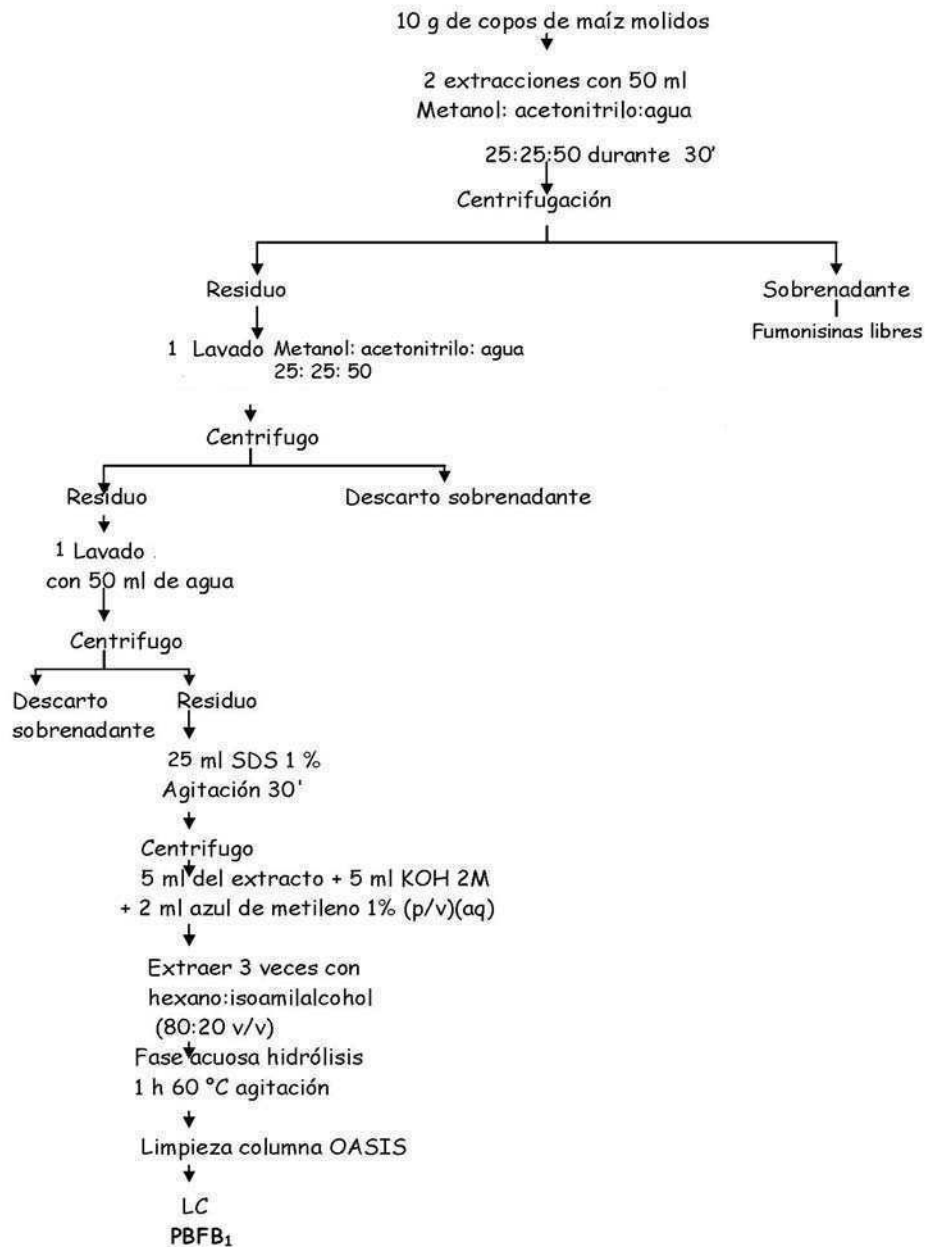


Figura 35. Extracción y limpieza de fumonisinas unidas a proteínas en copos de maíz

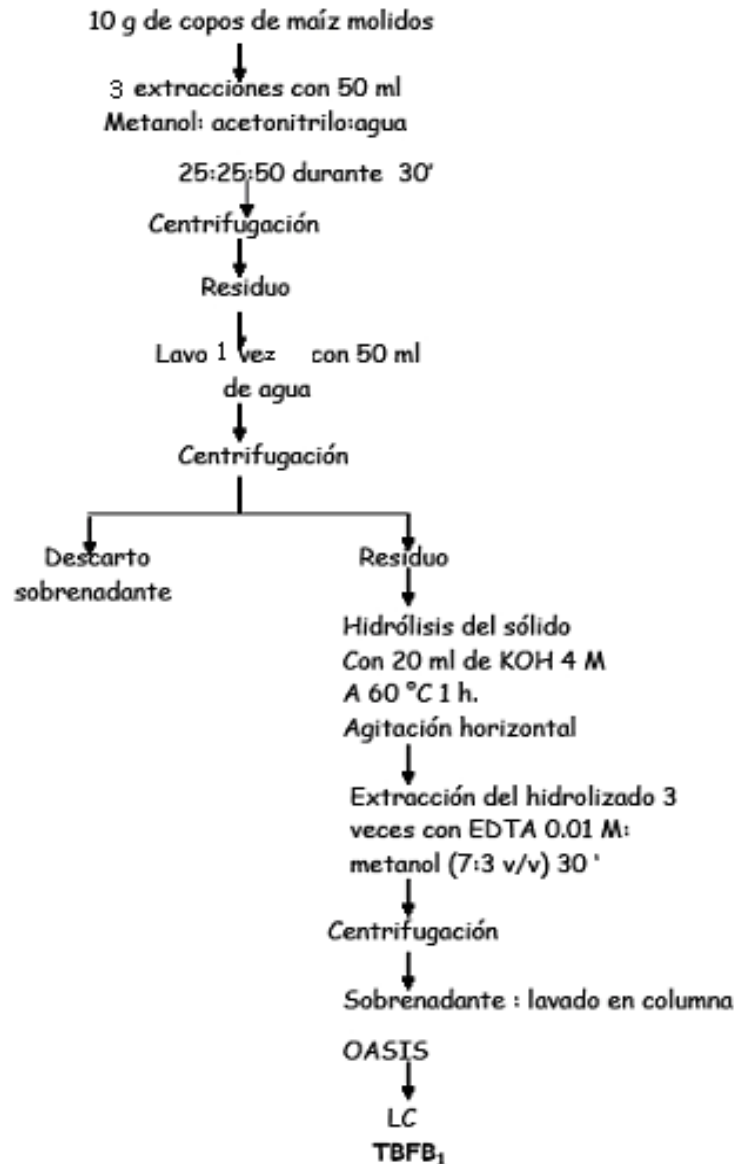


Figura 36. Extracción y limpieza de fumonisinas unidas totales en copos de maíz

III.2. 4.3. Extracción y limpieza de las muestras del quimo

Diez mililitros del quimo (sobrenadante obtenido luego de la digestión de los copos de maíz) fueron extraídos con diez mililitros de metanol en un agitador horizontal (Eberbach Corporation, modelo 6010) durante 15 minutos, luego se centrifugó por 10 minutos a 2200 g.

Para la limpieza de FB₁ y PHFB₁, 10 ml de la mezcla de 10 ml de PBS y 10 ml del extracto anterior fueron aplicados a una columna Fumonitest™ IAC (Vicam); la columna fue lavada con 7 ml de PBS y luego eluidos con 3,5 ml de metanol.

Para la determinación de HFB₁, 8 ml del extracto fueron mezclados con 12 ml de NaH₂PO₄ 0,05 M, el pH fue ajustado a 3,6 con HCl 1 M y 10 ml de la mezcla fue agregada a una columna OASIS® HLB 3 (Waters, Milford, MA, USA), previamente acondicionada con 3 ml de metanol y 3 ml de metanol: agua (20:80, v/v). La columna fue lavada con 3 ml de metanol: agua (20:80, v/v) y luego con 3 ml de metanol: agua (50:50, v/v). La elución se realizó con 3 ml de metanol: agua (70:30, v/v). Los extractos evaporados fueron disueltos en 300 µl de acetonitrilo: agua (3:1, v/v). En la Figura 37 se puede ver un esquema de las etapas de extracción y limpieza de las muestras de quimo.

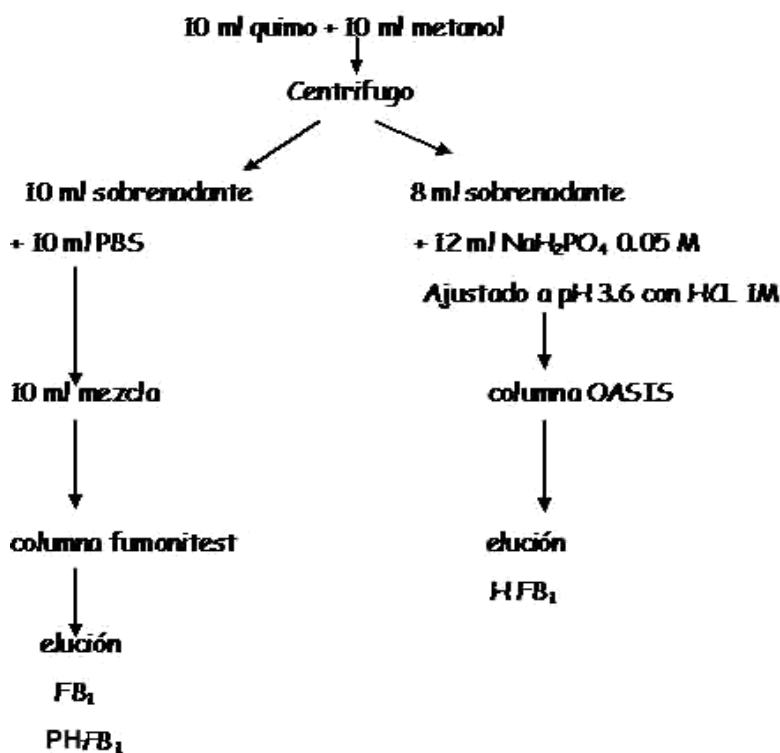


Figura 37. Extracción y limpieza FB₁, PHFB₁ y HFB₁ en quimo

III. 2.4.4. Extracción y limpieza de TB FB₁ en el quimo

Diez mililitros del extracto metanólico proveniente de los copos de maíz previamente lavados tres veces con acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50) y una vez con agua, se sometieron a digestión, se incubaron con 10 ml de KOH 3 M durante 1 hora a 60 °C en agitador horizontal. Luego 10 ml del hidrolizado (Figura 38) fueron agregados a una columna OASIS® HLB 3 cc, preacondicionada con 3 ml de metanol y 3 ml

metanol: agua (20:80, v/v). La columna fue lavada con 3 ml de metanol: agua (20:80, v/v), 3 ml de metanol: agua (50:50, v/v) y 3 ml de metanol: agua (67:33, v/v). Para la elución de HFB₁, 1 ml de metanol: agua (75:25, v/v) y 2 ml de metanol: solución acuosa de ácido acético 8 % (75:25, v/v) fueron agregados a la columna. Todos los líquidos pasaron a través de la columna por gravedad. El eluido fue evaporado a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y reconstituido en acetonitrilo: agua (75:25, v/v).

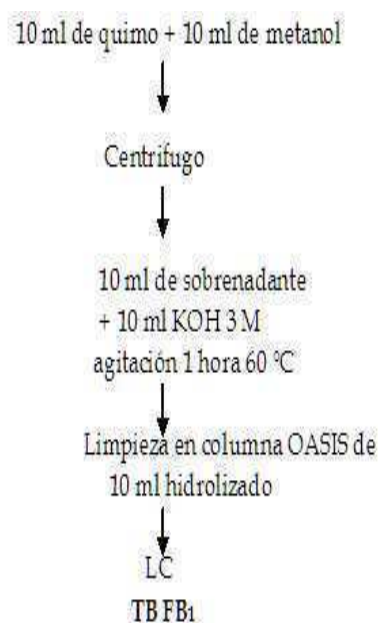


Figura 38. Extracción y limpieza del quimo hidrolizado

III.2.4.5. Cromatografía líquida

III.2.4.5.1. Condiciones analíticas

El análisis de las muestras se realizó por cromatografía líquida usando un equipo marca Agilent® 1100 serie, equipado con un “degasser” (G 1322A), un “autosampler” (G1313A), una bomba cuaternaria (G1311A), un detector de fluorescencia (G1321A) fijando la longitud de onda de extinción a 335 nm y la de emisión a 440 nm y con un compartimiento de columna termostaticado (G13116A). El “autosampler” fue programado para mezclar 5 µl del reactivo OPA, 5 µl de la

muestra y 5 µl del reactivo OPA en la aguja 10 veces y se inyectó 10 µl de la mezcla después de 0,5 minutos de incubación (Scott y Lawrence, 1996).

La separación se realizó con una columna Inertsil 5 µ ODS-2 150 Å, 150 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU) con un guarda columna Supelguard LC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU).

La fase móvil utilizada para separar FB₁, PH FB₁ y HFB₁ fue habitualmente (A) metanol y (B) metanol: NaH₂PO₄ 0,05 M (65:35, v/v) acidificado hasta un pH aparente de 6,0 con ácido ortofosfórico. El gradiente varió desde 100 % B (0 min.) hasta 20 % A y 80 % B a los 40 min. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml min⁻¹.

La fase móvil isocrática para la separación de FB₁ y HFB₁, utilizada fue metanol: fosfato dihidrógeno de sodio 0,05 M (70:30, v/v) acidificada hasta un pH aparente de 3,3 con ácido ortofosfórico y corrida isocráticamente a una velocidad de flujo de 0,8 ml min⁻¹.

La cuantificación fue realizada considerando el área del pico y comparando con una curva de calibración externa. Los límites de detección obtenidos por derivatización a una señal ruido de 3:1 fueron de 5 ng/g para HFB₁ y el equivalente de 15 ng/g para TBFB₁ en copos de maíz.

En la Tabla 31 se sintetizan las características y las condiciones aplicadas ya sea para la evaluación de las fumonisinas, HFB en copos como en quimo.

En la evaluación de los copos de maíz de Mar del Plata se utilizó la misma fase móvil que en Canadá, que figura en la Tabla 31 pero con una velocidad de flujo de 1 ml/minuto.

III.2.4.5.2. Confirmación por HPLC-MS

Con el fin de confirmar la formación de fumonisina B₁ parcialmente hidrolizada (PHFB₁), los extractos evaporados del punto III.2.3 fueron disueltos en acetonitrilo: agua (3:1, v/v) y analizados por HPLC-MS. Se utilizó un espectrómetro de masa Quatro II en tandem con ionización por electrospray (ESI) en modo ion positivo (Micromass, Manchester, Inglaterra) acoplado a un sistema HP 1100 de cromatografía líquida (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) equipado con

una columna Luna C₁₈, (2,1 x 150 mm, 3 μm; Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). Los analitos fueron eluidos con un gradiente de ácido fórmico 0,02 % en agua (A) y acetonitrilo: metanol (1:1) (B) desde 65 % de A entre 0 y 1 min a 50 % de A a los 10 min, luego a los 23 min 40 % de A, 24 min 65 % de A y 35 min 65 % de A. La velocidad de flujo fue fijada a 0,175 ml/min. El espectro de masa fue obtenido escaneando entre m/z 390 a 748. El voltaje capilar y la fuente de temperatura fueron 4 KV y 120 °C. La temperatura del gas de desolvación fue de 350 °C. La velocidad del gas seco y del flujo del gas nebulizado fue 23 y 463 l/h respectivamente. FB₁ (m/z= 722,4), FB₂ (m/z= 706,4), PHFB₁ (m/z= 564,4), PHFB₂ (m/z= 548,4), HFB₁ (m/z= 406,4), HFB₂ (m/z= 390,4) fueron monitoreados en modo de ion selectivo (SIM).

Tabla 31. Condiciones analíticas aplicadas para la evaluación de las fumonisinas en copos y en quimo

	HPLC-FD (FB₁, HFB₁) (en copos de maíz)	HPLC-FD (FB₁ HFB₁ PHFB₁) (en copos de maíz y quimo)
Columna	Phenomenex Inertsil ODS-2 5 μm, 150 x 4,6 mm 37 °C	Phenomenex Inertsil ODS-2 5 μm, 150 x 4,6 mm 37 °C
Fase móvil	Metanol: NaH ₂ PO ₄ 0,05 M (70:30, v/v) acidificado hasta pH aparente de 3,3 con ácido ortofosfórico	(A) Metanol y (B) Metanol: NaH ₂ PO ₄ 0,05 M. (65:35, v/v) acidificado hasta pH aparente de 6,0 con ácido ortofosfórico Gradient:e 100 % B (0 min) to 20 % A and 80 % B (40 min)
Velocidad de flujo	0,8 ml/min	0,8 ml/min
HPLC	Agilent 1100	Agilent 1100
Detector	G 1321 A	G 1321 A

III.2.5. Modelo de digestión “*in vitro*”

III.2.5.1. Composición. Preparación. Implementación

El proceso de digestión del tracto gastrointestinal humano fue simulado por el agregado a los copos de maíz molidos de líquidos digestivos preparados en el laboratorio y luego incubados a un pH, temperatura y tiempo de residencia como fue descrito por Versantvoort y col. (2005).

La saliva, el jugo gástrico, el jugo duodenal y los jugos biliares consisten en una mezcla de sales inorgánicas y componentes orgánicos. Todos los líquidos digestivos preparados incluyen urea.

La saliva artificial fue preparada por mezcla de soluciones salinas con componentes orgánicos suplementados con α -amilasa, ácido úrico y mucina. Las soluciones inorgánicas y orgánicas del jugo gástrico fueron mezcladas con pepsina, mucina y albúmina bovina; la mezcla de componentes inorgánicos y orgánicos del jugo duodenal fueron suplementadas con pancreatina, lipasa y BSA y el jugo biliar consistió de una mezcla de soluciones inorgánicas y orgánicas con BSA, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ y bilis.

En la Tabla 32 se puede observar las composiciones utilizadas para simular el proceso de digestión.

Tabla 32. Soluciones inorgánicas y orgánicas usadas en la preparación de los líquidos para el modelo de digestión *in vitro*

	Saliva	Jugo gástrico	Jugo duodenal	Jugos biliares
Soluciones inorgánicas	10 ml KCL 89,6 g/l 10 ml KSCN 20 g/l 10 ml Na H ₂ PO ₄ 88,8 g/l 10 ml Na ₂ SO ₄ 57 g/l 1,7 ml Na CL 175,3 g/l 20 ml Na HCO ₃ 84,7 g/l	15,7 ml NaCL 175,3 g/l 3,0 ml NaH ₂ PO ₄ 88,8 g/l 9,2 ml KCL 89,6 g/l 18 ml CaCL ₂ .2 H ₂ O 22,2 g/l 10 ml NH ₄ CL 30,6 g/g 6,5 ml HCL 37 % g/g	40 ml NaCL 175,3 g/l 40 ml Na HCO ₃ 84,7 g/l 10 ml Na H ₂ PO ₄ 8 g/l 6,3 ml KCL 89,6 g/l 10 ml MgCl ₂ 5 g/l 180 µl HCL 37 % g/g	30 ml NaCL 175,3 g/l 68,3 ml Na HCO₃ 84,7 g/l 4,2 ml KCL 89,6 g/l 150 µl HCL 37 % g/g
Soluciones orgánicas	8 ml urea 25 g/l	10 ml glucosa 65 g/l 10 ml ácido glucurónico 2 g/l 3,4 ml urea 25 g/l 10 ml glucosamina hidrocloruro 33 g/l	4 ml urea 25 g/l	10 ml urea 25 g/l
Agregado a la mezcla de soluciones orgánicas e inorgánicas	290 mg α-amilasa 15 mg ácido úrico 25 mg mucina		9 ml CaCL ₂ .2 H ₂ O 22,2 g/l 1 g BSA 9 g pancreatina 1,5 g lipasa	10 ml CaCL₂ .2 H₂O 22,2 g/l 1,8 g BSA 30 g bilis
pH	6,8 +/- 0,2	1,3 +/- 0,02	8,1 +/- 0,2	8,2 +/- 0,2

III.2.5. 2. Procedimiento

En la figura 39 se observa el modelo de digestión *in vitro*.

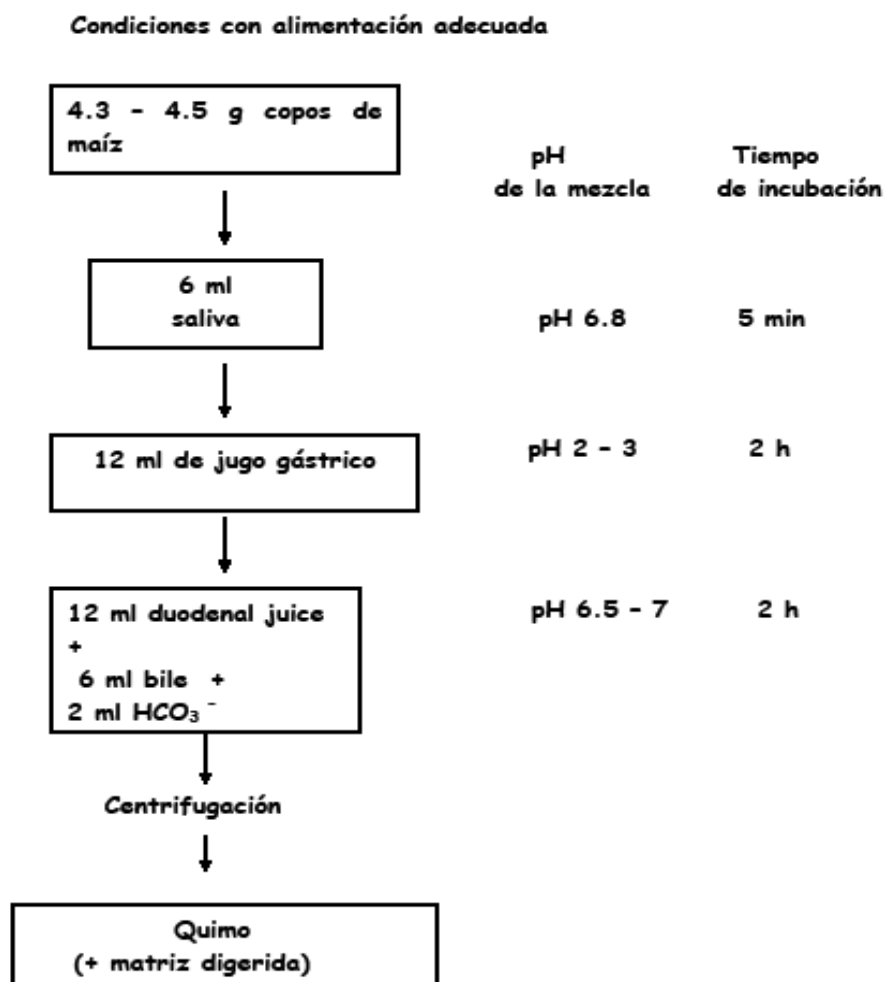


Figura 39. Modelo de digestión *in vitro*

Primero, 6 ml de saliva de pH 6,8 fueron incubados en frascos de teflón con 4,5 g de copos de maíz molidos durante 5 minutos en un baño de agua con agitación a 37 °C a 190 rpm. (Julabo model SW 22, Figura 40). Luego, 12 ml del jugo gástrico fueron agregados a la mezcla, el pH se ajustó entre pH 2 y 2,5 y se incubó con HCl 1 M y se incubó en el baño de agua con agitación a 37 °C. Después de 2 horas de incubación, 12 ml del jugo duodenal y 6 ml de bilis fueron agregados a la mezcla anterior y el pH ajustado entre 6,5 a 7 con bicarbonato de sodio e incubado durante 2 hs más.

El quimo fue separado por centrifugación 10 minutos a 2200 g (Hettich Rotina model 35) y mantenido en la heladera para su análisis el día siguiente.

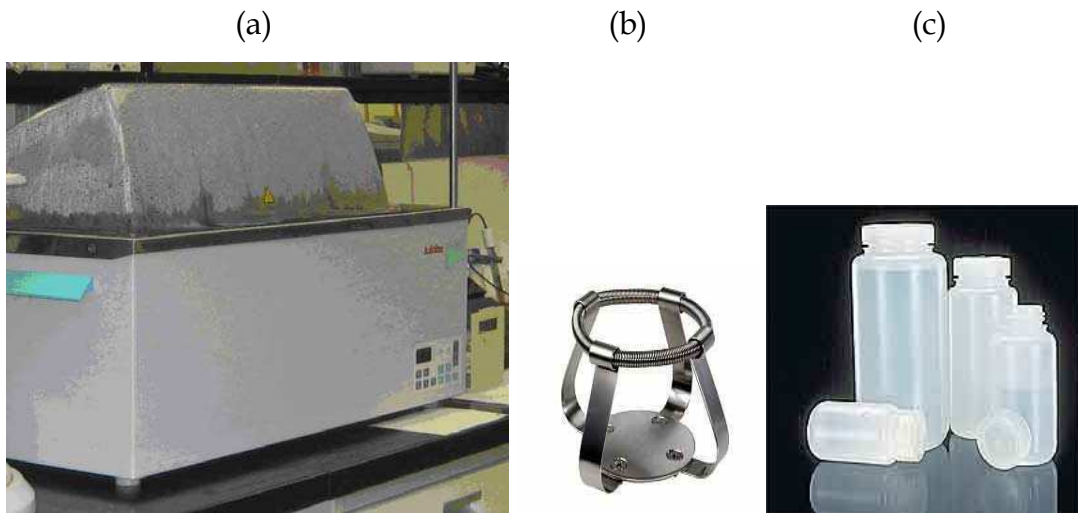


Figura 40. (a) Baño-agitador termostatzado Julabo, (b) sujetadores utilizados en el interior del agitador, (c) frascos para la digestión

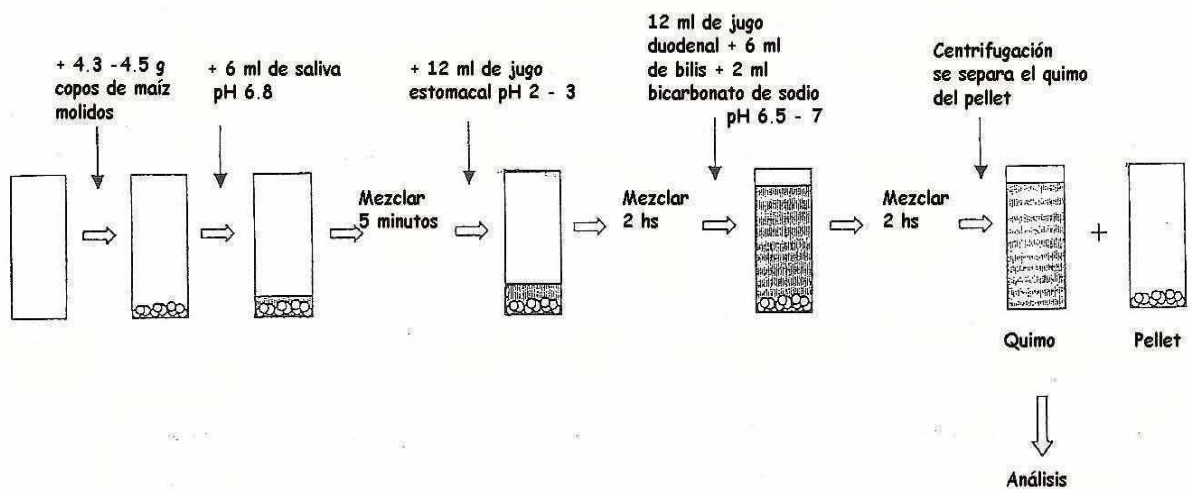


Figura 41. Representación esquemática del procedimiento del modelo de digestión *in vitro*

Diferentes estudios de recuperación fueron realizados fortificando el extracto de los copos de maíz o el quimo con FB_1 , HFB_1 y $PHFB_1$ (Tabla 33). Las recuperaciones de $PHFB_1$ fueron hechas fortificando esas muestras con volúmenes conocidos de la solución hidrolizada que contenía un área medible en el cromatograma de ambos isómeros de $PHFB_1$.

Tabla 33. Recuperaciones de FB₁ libre, PHFB₁ y HFB₁ del extracto de los copos de maíz; recuperaciones parciales de PBFB₁ y TBFB₁ (medido como HFB₁ después de la fortificación con HFB₁ o FB₁ antes de la hidrólisis); y FB₁, HFB₁ y PHFB₁ de quimo

Fortificación	Nivel de fortificación (ng/g)	Recuperación (%) ± SD
FB ₁ (antes de la columna de inmunoafinidad)	200	86,6 ± 10,9 n= 2
PHFB ₁ (antes de columna de inmunoafinidad)	?	58,2 ± 18,1 n= 3
HFB ₁ (antes de columna C ₁₈)	40	122 ± 0 n= 2
PB FB ₁ (HFB ₁ agregado antes del paso de hidrólisis)	100	71,3 ± 13,0 n= 2
TB FB ₁ (FB ₁ agregado antes del paso de hidrólisis)	120	68,5 ± 22,7 n= 8
FB ₁ agregado al quimo	226	86,0 ± 5,6 n= 2
PHFB ₁ agregado al quimo	?	12,0 ± 1,0 n= 2
HFB₁ agregado al quimo	444	86,0 ± 10,6 n=3

El rango de linealidad fue entre 5 ng/g y 200 n/g/g ($r^2 = 0,9953$, n = 5) para FB₁ en el extracto de copos de maíz; mientras que para HFB₁ en la misma matriz, el rango de linealidad fue entre 5 ng/g y 200 ng/g ($r^2 = 0,9973$, n=6).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Ocratoxina A

IV.1.1. Evaluación de la encuesta de alimentos en dos poblaciones de donantes de la provincia de Buenos Aires. Frecuencia de consumo y cantidades ingeridas de distintos alimentos

La estimación de la ingesta de alimentos es esencial para la evaluación de riesgo ya que permite conocer la relación entre los efectos adversos observados en el humano y la exposición a ciertas sustancias o compuestos (Pacin y col. 1999)

La OTA ha sido encontrada como contaminante en cereales: trigo, centeno, maíz, cebada y avena, también en distintas especies de habas y legumbres, en café, cacao y frutas desecadas. También puede presentarse una contaminación secundaria como consecuencia de la acumulación de metabolitos tóxicos, en carne, vísceras y subproductos (salchichas, huevos) de animales alimentados con cereales contaminados por OTA (De Almeida y col., 2007; Gumus y col., 2004; Hurst y Martin Jr., 1998; Leoni y col., 2000; Otteneder y Majerus, 2001; Sangare-Tigori y col., 2006; Visconti y col., 2000).

Los resultados de la encuesta de alimentos realizada en Mar del Plata en donantes de sangre (Tabla 34), teniendo en cuenta aquellos alimentos que son considerados a nivel mundial como fuente de contaminación de OTA, mostraron que el 84 % de la población consumió diariamente alimentos panificados, el 65 % galletas, el 26 % café y el 20.6 % vino. Semanalmente el 83% consumió fideos, el 73% aves de corral, el 45% y el 46 % fiambres crudos y cocidos respectivamente y el 17% consumió café. Es interesante destacar que de la población muestreada no consumieron un 75.1 % frutas desecadas, 85 % avena, 62 % pasas de uva y el 62.7 % frutas secas, productos muy contaminados por OTA en otras regiones del mundo.

Si se considera aquellos alimentos que a nivel mundial pueden contribuir a la ingesta de OTA de acuerdo a la encuesta alimentaria realizada en Mar del Plata; más del 50 % de la población consultada (indicado en letras blancas en la Tabla 34), ingirió diariamente alimentos derivados de cereales, como los productos panificados y galletas.

Tabla 34. Frecuencia de consumo de alimentos de los 199 donantes de sangre, encuestados en la ciudad de Mar del Plata

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		Algunas veces		Nunca	
	*N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Infusiones	192	94,1	5	2,5	0	0,0	0	0,0	7	3,4
Productos panificados	174	84,5	25	12,1	2	1,0	4	1,9	1	0,5
Azúcar	160	78	3	1,5	0	0,0	4	2,0	38	18,5
Vegetales crudos	135	65,9	57	27,8	3	1,5	1	0,5	9	4,4
Galletas	134	65,0	35	17,0	2	1,0	15	7,3	20	9,7
Frutas Frescas	129	62,9	55	26,8	7	3,4	5	2,4	9	4,4
Frutas ácidas	107	52,2	49	23,9	10	4,9	19	9,3	20	9,8
Carne de vaca	96	47,6	97	47,1	7	3,4	2	1,0	2	1,0
Leche y subproductos	82	39,8	62	30,1	23	11,2	13	6,3	26	12,6
Vegetales cocidos	74	35,4	86	41,7	14	6,8	2	1,0	30	14,6
Mermelada (Dulce de fruta)	71	34,6	53	25,9	6	2,9	19	9,3	56	27,3
Riñón de cerdo	0	0,0	0	0,0	3	1,5	16	8,0	181	90,5
Otras carnes	1	0,5	64	31,1	66	32,0	37	18	38	18,4

* N°= Número de personas

Tabla 34 (cont.), Frecuencia de consumo de alimentos en 199 donantes de sangre en Mar del Plata

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		A veces		Nunca	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Jugo de frutas	67	33,3	29	14,4	5	2,5	12	6,0	88	43,8
Todo tipo de quesos	58	28,2	120	58,3	8	3,9	11	5,3	9	4,4
Café	53	26,2	35	17,3	9	4,5	34	16,8	71	35,1
Golosinas	43	21,1	49	24,0	10	4,9	46	22,5	56	27,5
Vinos	42	20,6	40	19,6	4	2,0	11	5,4	107	52,5
Soja	32	15,6	38	18,5	19	9,3	14	6,8	102	49,8
Dulce de Leche	29	14,2	45	22,1	21	10,3	38	18,6	71	34,8
Edulcorantes	27	13,2	4	2,0	0	0,0	0	0,0	173	84,8
Cereales: Nestum, muesli, barras de cereal	24	11,8	29	14,2	11	5,4	21	10,3	119	58,3
Cerveza	20	9,8	72	35,1	10	4,9	21	10,2	82	40,0
Fiambre cocido	19	9,2	95	46,1	38	18,4	32	15,5	22	10,7
Fiambre crudo	17	8,3	92	45,1	34	16,7	27	13,2	34	16,7
Aves de corral	17	8,3	150	72,8	18	8,7	8	3,9	13	6,3
Snacks salados	16	7,9	76	37,6	30	14,9	40	19,8	40	19,8
Tallarines	15	7,3	170	82,5	7	3,4	4	1,9	10	4,9
Carne de cerdo	0	0,0	21	10,2	37	18,0	67	32,5	81	39,3

* N°= Número de personas

Tabla 34 (cont.) Frecuencia de consumo de alimentos en los 199 donantes de sangre en Mar del Plata

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		A veces		Nunca	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Chocolate	12	<u>5,9</u>	53	25,9	16	7,8	28	13,7	96	46,8
Huevos	11	<u>5,4</u>	157	77,3	10	4,9	16	7,9	9	4,4
Arroz y derivados	10	<u>4,9</u>	151	73,3	16	7,8	13	6,3	16	7,8
Repostería	8	3,9	51	25,1	48	23,6	63	31,0	33	16,3
Frutas desecadas	7	3,4	18	<u>8,8</u>	11	5,4	15	7,3	154	75,1
Frutas secas	6	3,0	10	<u>5,0</u>	10	5,0	43	21,4	132	65,7
Todo tipo de gaseosas con azúcar	5	2,4	3	1,5	1	0,5	5	2,4	191	93,2
Avena y derivados	5	2,4	8	3,9	10	4,9	8	3,9	175	85,0
Porotos, lentejas, garbanzos	4	2,0	41	<u>20,2</u>	32	15,8	41	20,2	85	41,9
Todo tipo de sopas en sobre	4	1,9	14	<u>6,8</u>	11	5,8	11	5,3	165	80,1
Pasta de maní	1	0,5	19	<u>9,4</u>	25	12,4	32	15,8	125	61,9
Bebidas alcohólicas	1	0,5	6	3,0	0	0,0	1	0,5	195	96,1
Polenta y productos derivados del maíz	1	0,5	57	27,8	36	17,6	44	21,5	67	32,7

* N°= Número de personas

El café se encontró entre los alimentos ingeridos por un 25 a 50 % de la población (gris en Tabla 34); mientras que el vino, cerveza, aves de corral (pollo), cacao (chocolate) y frutas secas (pasas de uva) fueron ingeridas por menos del 25 % de la población encuestada (números subrayados en la Tabla 34).

En General Rodríguez, los resultados de la encuesta mostraron que el 81,8 % de la población consumió diariamente alimentos panificados, el 53,8 % galletas, el 98,3 % infusiones (te, mate, café), el 15,3 % vino, mientras que semanalmente el 78,4 % aves de corral, 77,1 % fideos envasados y el 36 y 50,4 % ingirieron jamón crudo y cocido respectivamente (Tabla 35). En tanto, el 72,4 % de la población nunca ingirió ni barras de cereal, el 91,9 % avena y el 91 % pasas de uva.

Para comparar los niveles de ingesta de los productos con alta probabilidad de contaminación por OTA en el mundo, información mayoritariamente proveniente de Europa, se decidió utilizar un estudio de evaluación de la exposición realizado por los países pertenecientes a la Comunidad Europea donde se incluyen datos recopilados de ingesta en esos países (Task 3.2., 2002) (Tabla 36).

Tabla 35. Frecuencia de consumo de alimentos en 236 donantes de sangre en General Rodríguez

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		Algunas veces		Nunca	
	*N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Infusiones	232	98,3	2	0,8	0	0,0	0	0,0	0	0
Productos panificados	193	81,8	25	10,6	0	0,0	3	1,3	12	5,1
Carne vacuna, vísceras y derivados	168	71,2	67	28,4	1	2,4	0	0	0	0
Galletitas dulces y saladas	127	53,8	72	30,5	4	10	4	1,7	8	3,4
Leche, manteca, crema de leche	94	39,8	85	36	12	5,0	17	7,2	16	6,8
Frutas frescas	84	35,6	100	42,4	12	5,0	5	2,1	23	9,7
Todo tipo de gaseosas con azúcar	73	30,9	72	30,5	4	2,0	19	9,3	20	9,8
Frutas ácidas	69	29,2	100	42,4	7	3,0	15	6,3	38	16,1
Golosinas	64	27,1	61	25,8	6	2,5	2	1,0	2	1,0
Dulces de frutas	57	24,2	67	28,4	19	8,0	11	4,7	77	32,6
Verduras crudas	53	22,5	158	66,9	2	0,8	3	1,3	12	5,1
Verduras cocidas	51	21,6	166	70,3	7	3,0	2	0,8	8	3,4
Queso blando, rallar, fresco, mar del plata	50	21,2	143	61	16	7,0	7	2,9	15	6,3
Jugos de naranja, pomelo, manzana	41	17,4	68	28,8	11	5,0	7	3,0	84	35,6
Todo tipos de vinos	36	15,3	67	28,4	10	4,2	13	5,5	101	42,8

* N°= Número de personas

Tabla 35 (cont.) Frecuencia de consumo de alimentos en 236 donantes de sangre en General Rodríguez

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		Algunas veces		Nunca	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Fideos envasados no frescos	35	<u>14,8</u>	182	77,1	5	2,1	2	0,8	8	3,4
Dulce de leche	33	<u>14,0</u>	83	35,2	10	4,2	20	8,5	66	28,0
Todo tipo de gaseosas	30	<u>12,7</u>	22	<u>9,3</u>	9	3,8	6	2,5	71	30,1
Huevos	19	<u>8,1</u>	164	69,5	13	5,5	1	8,4	25	10,6
Jamón cocido, matambres, salchichón	16	<u>6,8</u>	119	50,4	29	12,2	13	5,5	47	19,9
Mantecol, manteca de maní	16	<u>6,8</u>	59	<u>25</u>	12	5,1	28	11,9	108	45,9
Arroz, galletas de arroz, arroz inflado	15	<u>6,4</u>	180	76,3	11	4,7	3	1,3	20	8,5
Jamón crudo, bondiola, salames, panceta	14	<u>5,9</u>	85	36	21	8,9	21	8,8	89	37,7
Cereales: Nestum, muesli, barras de cereal	14	<u>5,9</u>	26	<u>11,0</u>	4	1,7	14	5,9	171	72,4
Repostería	14	<u>5,9</u>	67	28,4	40	16,9	7	3,0	62	26,3
Todo tipo de sopas en sobre	10	4,2	22	<u>9,3</u>	6	2,5	10	4,2	78	33,0
Carnes de aves, vísceras y derivados	9	3,8	185	78,4	25	10,6	3	1,3	10	4,2

* N°= Número de personas

Tabla 35 (cont.) Frecuencia del consumo de alimentos en 236 donantes de sangre en General Rodríguez

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		A veces		Nunca	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Snacks salados	7	3,0	75	31,8	16	6,8	12	5,1	88	37,3
Todo tipo de cervezas	6	2,5	85	36	16	6,8	5	2,2	89	37,7
Avena y derivados	5	2,1	5	2,1	2	0,8	7	3,0	217	91,9
Soja y derivados	3	1,3	18	7,6	11	4,7	63	31,0	33	16,3
Porotos, lentejas, garbanzos	2	0,8	63	26,7	37	15,6	19	8,0	87	36,9
Carne porcina, vísceras y chacinados	9	0,4	21	8,5	31	13,1	43	18,2	99	41,9
Frutas secas	9	0,4	10	4,2	7	2,3	16	8,8	93	39,4
Vodka, caña, aperitivos, ron, whisky	9	0,4	14	5,9	9	3,8	8	3,3	86	36,4
Pasas de uvas, damascos, ciruelas, duraznos	9	0,4	31	1,3	7	2,3	7	3,0	215	91
Otras carnes	0	0,0	26	11	50	21	10	4,2	89	37,7
Polenta, maicena, copos de maíz	0	0,0	67	28,4	56	23,7	26	11	79	33,5

* N°= Número de persona

Tabla 36. Nivel de ingesta promedio de aquellos alimentos más susceptibles de presentar contaminación en algunos países europeos, en Argentina y Chile

País	Nivel de ingesta promedio (g/persona/día)							
	Cerveza	Vinos	Cereales (4)	Café	Pasas de uva	Cerdo	Salchichas (5)	Salame (6)
Dinamarca (1)	203	66,7	185,7	26,4	ni	ni	ni	ni
Finlandia (1)	230	50	180	47	1	ni	ni	ni
Francia (2)	ni	181,3	204,6	15,2	5,3	0,03	ni	ni
Alemania(1)	192,3	9,76	161,01	18,03	ni	ni	46,86	ni
Grecia (1)	ni	22	269	4,1	0,03	ni	ni	ni
Italia (1)	23	46,9	17,24	7,14	ni	ni	ni	2,5
Noruega (2)	ni	ni	161	561	ni	ni	ni	ni
Portugal (1)	177,3	160,5	235,1	10,1	ni	ni	ni	ni
Suecia (1)	310	61	148	13,1	ni	ni	ni	ni
España (1)	310	95,99	153,1	8,6	ni	ni	ni	ni
Países Bajos (1)	5	30	111	18,3	ni	ni	ni	ni
Gran Bretaña (1)	-	24,6	130,9	3,3	1,3	ni	ni	ni
Mar del Plata (2) (Argentina)	65,3	88,1	245,3 (3)	6,9	4,5	4,8	12,1 (2)	11 (3)
General (2) Rodríguez (Argentina)	85,9	104,2	204,3 (3)	ni	1,4	0,4	14,5 (2)	11 (3)
Colbun (Chile) (2)	ni	ni	279,5	ni	ni	18,8	ni	ni
San Vicente de Tagua (2) (Chile)	ni	ni	171,3	ni	ni	20,9	ni	ni

(1) Población general

(2) Consumidores

(3) Cereales: Se consideraron solo los alimentos panificados

(4) Cereales: en los países europeos se considera la sumatoria de todos los alimentos a base de cereales

(5) Salchichas: se consideraron los fiambres cocidos que incluyen matambre y salchichón

(6) Salame: se consideran los fiambres crudos que incluyen salame, bondiola y panceta

Cuando se comparan los niveles de ingesta de café en la población encuestada en Mar del Plata con lo informado en el Task 3.2. (2002) se observó que el rango de ingesta de café encuestado en Mar del Plata (6,9 g/persona/día) estuvo cerca de los valores más bajos informados en Europa donde el rango de consumo varia desde 3,3 g/persona/día en Gran Bretaña hasta 561 g/persona/día en Noruega. En Argentina, también como fue observado en Europa, los cereales fueron los alimentos ingeridos en mayor cantidad en las dos zonas encuestadas.

La ingesta de pasas de uvas (frutas desecadas) en el 24,9 % de la población encuestada, en Mar del Plata fue 3 veces superior a la de General Rodríguez que correspondió a su vez al 9 % de la población encuestada. El vino en Mar del Plata fue ingerido en cantidades cercanas a la media de ingesta de los países europeos, en tanto que la ingesta en General Rodríguez estuvo cerca de los rangos más altos informados en Europa. La ingesta de cerveza en la población que la ingiere en Mar del Plata y General Rodríguez fue bastante inferior a la de los países europeos salvo en Italia y los Países Bajos.

El consumo de aves de corral en Chile en las dos zonas analizadas presentó valores medios de 45,93 y 42,51 g/día, mientras que en Argentina en las dos zonas estudiadas los valores medios estuvieron en rangos comparables de 43,6 g/día para General Rodríguez y 43,3 g/día para Mar del Plata.

En la Tabla 37 se pueden observar los resultados de la encuesta en cuanto a consumo y a frecuencia, de los alimentos registrados en la encuesta a los donantes de las dos localidades. Considerando los alimentos que presentaban mayor contaminación por OTA en estudios a nivel mundial en la figura 42, se observan los promedios de consumo de esos productos.

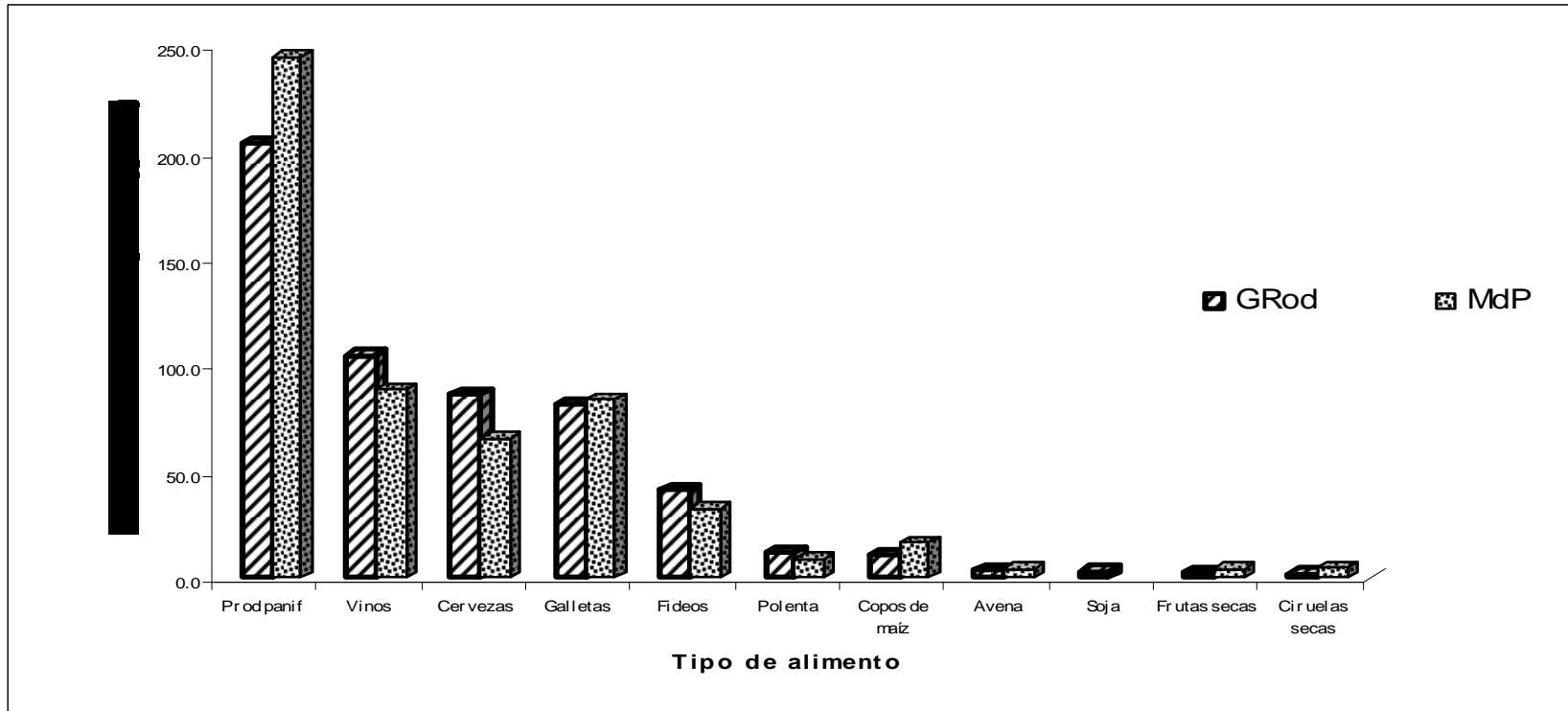


Figura 42. Cantidad de alimento ingerido diariamente (g/persona/día) en el grupo de donantes de Mar del Plata y General Rodríguez

Nota: En el gráfico de barras no se consideró al café ya que en la encuesta realizada en General Rodríguez, éste no fue encuestado separadamente sino incluido con las infusiones.

Tabla 37. Cantidades ingeridas por día expresadas en unidades de volumen o peso y frecuencia de consumo diario expresada en porcentaje en las dos zonas encuestadas

Alimento	Promedio de la cantidad ingerida (expresada en g o ml/día) Frecuencia (entre paréntesis) en General Rodríguez	Promedio de la cantidad ingerida (expresada en g o ml/día) Frecuencia (entre paréntesis) en Mar del Plata
Todo tipo de gaseosas con edulcorante	237,9 (12,7)	260,5 (94,1)
Productos panificados	204,3 (81,8)	245,3 (84,5)
Carne de vaca y productos relacionados	200,5 (71,2)	154,2 (47,6)
Infusiones	140,1 (se incluye café) (98,3)	140,8 (94,1)
Leche, manteca, crema de leche	129,3 (39,8)	101,8 (39,8)
Vinos	104,2 (15,3)	88,1 (20,6)
Jugos cítricos y de manzana	99,0 (17,4)	106,0 (33,3)
Todo tipo de gaseosas con azúcar	91,9 (30,3)	11,1 (2,4)
Cerveza	85,9 (2,5)	65,3 (9,8)
Galletitas	81,3 (53,8)	83,8 (65)
Frutas frescas	74,1 (35,6)	121,8 (62,9)
Vegetales cocidos	68,3 (21,6)	76,6 (35,4)
Vegetales crudos	59,6 (22,5)	114,2 (65,9)
Frutas cítricas	53,0 (29,2)	81,5 (52,2)
Fideos secos	41,0 (14,8)	32,3 (7,3)
Golosinas	37,8 (27,1)	25,7 (21,1)
Queso blando, rallar, fresco	34,6 (21,2)	38,5 (28,2)
Arroz y productos relacionados	31,5 (6,4)	25,5 (4,9)
Mermeladas, jaleas	29,7 (24,2)	31,2 (34,6)

Alimento	Promedio de la cantidad ingerida (expresada en g o ml/ día) Frecuencia (entre paréntesis) en General Rodríguez	Promedio de la cantidad ingerida (expresada en g o ml/ día) Frecuencia (entre paréntesis) en Mar del Plata
Huevos	20,4 (8,1)	17,2 (5,4)
Dulce de leche	20,4 (14,0)	15,0 (14,2)
Otras carnes	20,4 (0,2)	12,2 (0,5)
Carne de cerdo, viscera y productos relacionados	16,1 (0,4)	4,8 (0,3)
Productos de repostería	14,7 (5,9)	6,8 (3,9)
Fiambres cocidos	14,5 (6,8)	12,1 (9,2)
Manteca de maní	13,9 (6,8)	2,2 (0,5)
Polenta, maizena, copos de maíz	11,9 (0,1)	8,8 (0,5)
Fiambre crudo	11,0 (8,3)	11,0 (5,9)
Cereales para desayuno y mezcla de cereales	10,3 (5,9)	16,1 (11,8)
Porotos, garbanzos, lentejas	7,2 (0,8)	6,4 (2,0)
Vodka, caña, aperitivos, ron, whisky	6,7 (0,4)	2,7 (0,5)
Snacks salados	5,7 (3,0)	12,4 (7,9)
Sopas envasadas	3,3 (4,2)	1,9 (2,4)
Avena y derivados	3,1 (2,1)	1,9 (2,4)
Soja y derivados	2,9 (1,3)	13,3 (15,6)
Frutas secas	2,4 (0,4)	3,9 (3,0)
Pasas de uvas, damascos, ciruelas, duraznos	1,4 (0,4)	4,5 (3,4)
Café	Fue incluido como infusiones	6,9 (26,2)

Para observar si había diferencia entre los consumos entre las dos localidades se aplicó un test de t utilizando de las distintas personas la información de los alimentos consumidos con probabilidad de estar contaminados por OTA, no presentaron diferencias significativas entre ambas poblaciones a un nivel de $p > 0,05$.

A través de todos los datos registrados en la encuesta y considerando el grupo de alimentos susceptibles de estar contaminados con OTA, podemos concluir que los alimentos panificados, son los ingeridos por el mayor porcentaje de la población y en mayor cantidad. Si los cereales estuvieran contaminados en Argentina por OTA la mayor exposición provendría de esta ingesta.

IV.1.2. Estimación de la ingesta de ocratoxina A, considerando los niveles de contaminación por OTA de ciertos alimentos determinados en estudios previos y el nivel de ingesta de esos alimentos

Al no encontrarse diferencias significativas entre ambas poblaciones se calculó el promedio de consumo de los alimentos de las dos localidades conjuntamente, siendo los alimentos más frecuentemente ingeridos por la población encuestada y en mayor cantidad diaria los alimentos panificados (224 g/día/persona), seguidos por la carne (177,4 g/día/persona), vino (96,1 g/día/persona) y cerveza (75,6 g/día/persona). En los países europeos los cereales contribuyeron casi en un 50 % en la exposición de la población a la OTA.

La alta frecuencia de ingesta de los alimentos panificados en la población encuestada (Parte IV.1.1) hace presuponer que en la Argentina, la población podría estar expuesta a esa micotoxina, sin embargo, no son muchos los estudios realizados en Argentina respecto al nivel de contaminación por OTA en cereales y en otros alimentos. Se realizó una recopilación sobre estudios sobre la contaminación por OTA de materias primas y alimentos en Argentina que se resume a continuación y se incorporaron otros estudios indicativos de Latinoamérica.

En un informe del MAFF (2001) se encontró que de 37 muestras de maíz provenientes de Argentina, una presentaba contaminación con ocratoxina A en un nivel de 1 ug/kg, nivel por encima de los límites regulatorios de la Comunidad Europea. Magnoli y col. (2007) en un revisión realizada sobre la ocurrencia de OTA y

las micofloras ocratoxigénicas en maíz y productos a base de maíz en Sud América señalan que el *Aspergillus niger* y el *A. ochraceus*, serían la principal fuente de OTA en Argentina, Brasil y Ecuador.

En el análisis de 50 muestras de maíz, obtenidas en el Sur de la provincia de Córdoba, para consumo humano, no se detectó OTA y de las 4 especies de *A. ochraceous* aisladas, solamente una era capaz de producir OTA y que el 25 % de los *Aspergillus* negros aislados fueron productores de OTA (Magnoli y col., 2006b). Por lo tanto es más probable que la contaminación por OTA pueda provenir de *A. niger* y no de *A. ochraceous*.

En cuanto a los alimentos panificados, no hay estudios realizados en nuestro país sobre la contaminación por OTA, en evaluaciones se han realizado en Chile y Brasil. En evaluaciones o estudios realizadas en Chile, sobre 17 muestras de harina analizadas, el 88 % presentó contaminación con OTA en niveles menores a 1 ug/kg (Muñoz y col., 2005). En Brasil se analizaron por TLC, 54 lotes de harina de trigo y centeno comercializadas en Río Grande do Sul entre los años 1995 y 1996, encontrándose que el 12,96 % de las muestras fueron positivas para OTA con un nivel promedio de contaminación de 12 ng/g. (Vieira y col., 1999)

En un estudio se analizaron frutas desecadas en Argentina y el 74 % de las pasas de uvas analizadas presentó OTA, siendo la incidencia de contaminación cuando proviene de uva negra de un 67,7 % y de uva blanca de un 84,2 % con valores promedio de contaminación 6,3 y 4,4 ng/g de OTA, respectivamente. La mayor concentración se encontró en pasas de uvas proveniente de uva negra 14 ng/g. La principal especie productora de OTA aislada de las pasas de uva fue el *Aspergillus carbonarius* (82,6 %) y cuando se los hizo producir en el laboratorio los rangos de acumulación variaron entre 2 y 5202 ng/ml en medio de cultivo (Magnoli y col., 2004). Por lo tanto, las pasas de uvas podrían ser una importante fuente de exposición a ocratoxina A en personas consumidoras.

Si bien, no existen en nuestro país datos o estudios dirigidos a conocer el nivel de contaminación por OTA en café se sabe que la materia prima en la Argentina (café verde) para la elaboración de café tostado, proviene principalmente de Brasil, Colombia y Costa Rica. La incidencia de ocratoxina A en café verde en estudios

realizados en Brasil es bajo respecto a otros países, con rangos entre 0,7 a 47,8 ng/g (Leoni, 2001). Cuando se analizó café instantáneo en Brasil (n=82) se encontró que el 98,8 % de las muestras estaban contaminadas con ocratoxina A con niveles entre 0,17 y 6,29 ng/g, siendo los valores máximos de contaminación los que provenían de café de una zona de Brasil (Paraná).

de Almeida y col. (2007) calculan que, considerando una ingesta de café en adultos y niños de 10 g café instantáneo/día y el nivel medio de contaminación de 1,24 ng/g, el café podría contribuir con 1,24 % del PTWI (Ingesta Tolerable Provisional por semana) de ocratoxina A. A su vez en estudios realizados en Costa Rica, se determinó que el 95 % de las muestras de café tostado y molido analizadas por ELISA presentaron contaminación con Ocratoxina A en rangos entre 36 a 960 ng/kg (Quintana Guzmán y Chavez, 2007).

Por lo tanto, se podría estimar que los mismos niveles de contaminación por OTA, encontrados en café tostado e instantáneo en Costa Rica, Brasil y Colombia serían los que se presentan en nuestro país.

Da Rocha Rosa y col. (2002) analizaron 50 muestras de uvas de variedad Malbec y Chardonnay provenientes de Argentina y Brasil entre 1997-1998. En las muestras de uvas argentinas se aislaron 48 cepas de *Aspergillus niger*, de las cuales 8 fueron ocratoxigénicas.

Magnoli y col (2003) hicieron una evaluación del contenido de hongos de 50 muestras de uvas para vino, que incluían Malbec, Chardonnay, Merlot, Cabernet y Bonarda; la especie predominante fue la *Alternaria alternata* (80 %) y especies del género *Aspergillus* se aislaron en un 70 % de las muestras, siendo el 41 % de las especies de *Aspergillus* aisladas productoras de OTA en rangos de 2-45 ng/ml en medio de cultivo.

En cuanto al vino, en estudios realizados en Brasil sobre vino importado desde Argentina, se observó que un 28.6 % de los vinos tintos estaban contaminados en rangos entre 28,3 a 42,4 ng/l (Rosa y col. 2004). Estudios posteriores realizados, sobre 68 muestras de vinos, adquiridos en el 2003 en Argentina y 2002 en Chile no mostraron contaminación con ocratoxina A (Pacin y col. 2005).

Según el OIV en el 2005, Argentina tenía un consumo 77,5 ml/habitante/día (28,3 l/habitante/año) de vino, un poco menor al determinado en la encuesta en los dos grupos poblacionales.

Magnoli y col. (2006a) analizaron 47 muestras de maní de confitería proveniente de una planta de almacenamiento del Sur de la provincia de Córdoba, y determinaron que el 32 % estaba contaminado con OTA en niveles entre 0,5 a 170 ng/g y el 27 % de los aislamientos de *Aspergillus* sección *Nigri* fueron productores de OTA mientras que el 57 % de las cepas de *A. carbonarius* eran ocratoxigénicas, lo que indicaría que podría haber exposición a OTA a través de la ingesta de maní y los productos derivados.

Por otro lado Magnoli y col. (2005) analizaron la presencia de micoflora potencialmente ocratoxigénica y la ocurrencia de OTA en 80 muestras de alimentos para cerdos, aves de corral y conejo. Se detectó que el 15 %, 10 % y el 12 % del alimento para cerdo, aves de corral y conejo respectivamente estaban contaminado con OTA en rangos promedios entre 15 y 25 ng/g siendo el *Aspergillus* de la Sección *Nigri* el único productor encontrado de ocratoxina A.

Dalcerio y col. (2002) detectaron OTA en 38 % del alimento para aves de corral (25-30 ng/g), en 25 % de alimentos para conejo (18,5-25 ng/g) y un 13 % de alimentos para cerdo. A su vez observaron que el 46 % de las cepas de *Aspergillus* negros fueron productoras de OTA (13 - 25 ng/ml de medio de cultivo).

Se observó en general, en Argentina bajos niveles de contaminación por OTA en maní, vino, maíz y alimentos para pollos, conejos y cerdos. Considerando las escasas evaluaciones de los niveles de contaminación por OTA realizadas en el país de las materias primas y de los alimentos, se realizará una estimación aproximada de la ingesta de OTA y se asumirá niveles de contaminación de distintos alimentos en otros países para luego multiplicarlo por el consumo de esos alimentos obtenidos en la encuesta en las localidades de General Rodríguez y Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina. En la tabla 38 se encuentran las estimaciones realizadas indicando las referencias bibliográficas. En los datos provenientes de los países europeos el cálculo del promedio de la contaminación fue realizado asignando a las

muestras con niveles no detectados un valor equivalente al LD/2 y asignando los valores obtenidos cuando el valor estaba entre LD y LQ.

Tabla 38. Ingesta de OTA calculada a partir del nivel de contaminación de OTA de ciertos alimentos en Latinoamérica y el nivel de ingesta informado en la encuesta

Alimento	Nivel de contaminación (ng/g)	Consumo (g/día/persona) (Encuesta)	Ingesta OTA (ng/kg/día)
Cereales y sus productos derivados	0,294 ⁽¹⁾	224 ⁽⁴⁾	0,94
		338 ⁽⁵⁾	1,41
Vinos	0,357 ⁽²⁾	96,1	0,49
Frutas desecadas	4,4 ⁽³⁾	2,9	0,18
Café	1,03 ⁽⁴⁾ (Francia, café verde, tostado, instantaneo)	6,9 ⁽⁶⁾	0.10
Cervezas	0,276 ⁽⁵⁾ (Alemania Task)	75,6 (promedio consumo ambas poblaciones)	0,03

- (1) Task 3.2 (2002)
- (2) Magnoli y col (2003)
- (3) Magnoli y col. (2004)
- (4) Francia, Task 3.2 (2002)
- (5) Alemania, Task 3.2 (2002)
- (6) Promedio de ingesta de ambas poblaciones de alimentos panificados
- (7) Sumatoria de mezcla de cereales, galletas, alimentos panificados, polenta, barras de cereales de ambas poblaciones (sin considerar fórmula de preparación)
- (8) Consumo población Mar del Plata

Considerando el promedio de ingesta de las dos poblaciones de los alimentos más susceptibles de contaminación y los niveles de contaminación asignados se estimó una supuesta ingesta promedio de OTA del orden de 1,74 ng/kg p.c./día, si se consideran alimentos panificados solamente. Estos valores son cercanos a los informados por Italia (1,13 ng/kg p.c./día) y España (1,18 ng/kg p.c./día) con niveles de contaminación por OTA cuantificados (Task 3.2. 2002).

La exposición de OTA estimada sería, si se consideraba la ingesta de cereales proveniente de galletas, polenta, barras de cereales y panificados, en lugar de panificados solamente, de 2,21 ng/kg p.c./día. Verger y col. (2005) estimaron la exposición a distintas micotoxinas a partir de la dieta, multiplicando el consumo de alimentos de cada individuo por el promedio de contaminación por OTA de esos

alimentos. La ingesta calculada promedio de OTA en adultos (> de 15 años) en Francia fue de 2,2 ng/kg peso corporal/día similar al valor estimado considerando todos los alimentos panificados, mientras que en niños (< a 15 años) la exposición de 4,1 ng/kg peso corporal/día. El grupo de alimentos que más contribuyó a la exposición fueron los cereales y sus productos derivados (pan, cereales para desayuno, pastas, arroz, sémola) que aportaron el 70 % de la exposición. Cuando se calcula la cantidad estimada de OTA en las dos zonas de la provincia de Buenos Aires, considerando los niveles de contaminación por OTA de los cereales y los productos que contienen cereales y las cantidades ingeridas de los mismos registrados en la encuesta, se observó que este rubro contribuiría en un 63,8% a la probable ingesta de OTA.

En general, se estima que, cuando se calcula el nivel de ingesta de OTA considerando el consumo de los alimentos más susceptibles de presentar contaminación, se puede sobre estimar la ingesta, ya que una misma persona generalmente no ingiere todos los alimentos considerados en el calculo (Verger y col., 2005). Estos niveles de ingesta estimados en Argentina y los mencionados de otros países estarían por debajo del nivel de ingesta tolerable diario (TDI) de 14.3 ng/kg p.c./día estimado por el JECFA (2001). Por otra parte, aunque el promedio este por debajo de la ingesta tolerable diaria pueden existir individuos que estén expuestos, tal es el caso en el estudio en Francia (Leblanc y col., 2005 ; Tressou y col., 2004; Verger y col., 2005) dónde el 0,9 % de la población de adultos y el 25 % de los niños excedía el TDI.

Uno de los principales problemas cuando se evalúa la exposición a contaminantes es la elección del método empleado para hacerlo (Leblanc y col. 2005). Posiblemente se produzcan errores por sobreestimación u subestimación de la ingesta del contaminante. Por ejemplo, si el método asume los niveles promedio de consumo y de contaminación de alimentos a nivel mundial el error será mayor que si se estima la exposición a través del consumo de alimentos y el nivel de contaminación en la misma

IV.1.3. Metodología analítica de OTA

Se probaron distintas concentraciones del buffer PBS, observándose que el más diluido, tal como figura en materiales y métodos (II.1.2), es el que permite mejores recuperaciones. Se realizaron pruebas para estimar el volumen de metanol para la elución de la OTA de la columna inmunológica, las mejores condiciones encontradas se muestran en la Tabla 39.

La OTA fue eluída con dos pasos de aspiración y expulsión (backflushing) con jeringa de 10 ml conectada a la columna. En el primer paso se usaron 3 ml de metanol y en el segundo 1,5 ml de metanol dentro de un vial silanizado. Se descartó un tercer lavado pues es muy baja la cantidad de OTA que se recuperó en el mismo. El eluído fue evaporado a sequedad con vacío a 30 °C. El extracto evaporado fue disuelto en 200 µl de la fase móvil para su análisis por HPLC.

Tabla 39. Porcentaje de recuperación de OTA de acuerdo al número de extracciones

Número de eluciones	Volumen de elución (ml)	Porcentaje de recuperación de OTA (%)
1	3	94,5
2	1,5	4,8
3	1,5	0,6

Las recuperaciones de las muestras fortificadas con el estándar de OTA fueron de 85 % para un nivel de contaminación de 2.4 ng ml⁻¹; 95 % para 1.5 ng ml⁻¹ y 96 % para 0.8 ng ml⁻¹.

La recuperación promedio fue de 89.8 %.

En la figura 43 se observa un cromatograma de la ocratoxina A con un pico en un tiempo de retención aproximadamente de 3 minutos.

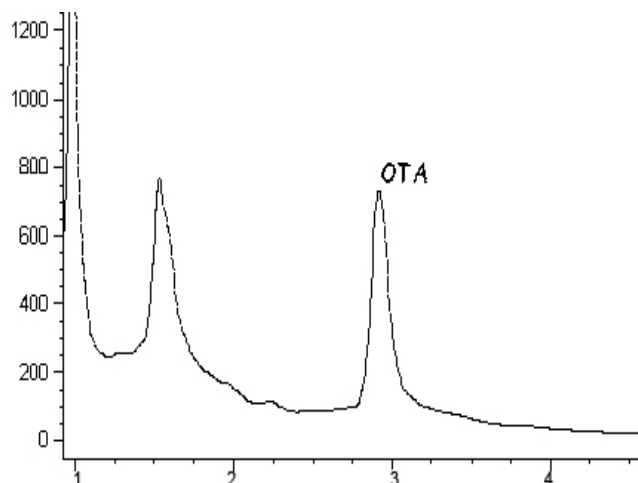


Figura 43. Cromatograma por HPLC de un estándar de OTA

La curva de calibración mostró una relación lineal con un $R^2 > 0.999$. En la Figura 44 se observa una curva de calibración. El rango de linealidad fue entre 0,012 ng/ml y 7,12 ng/ml.

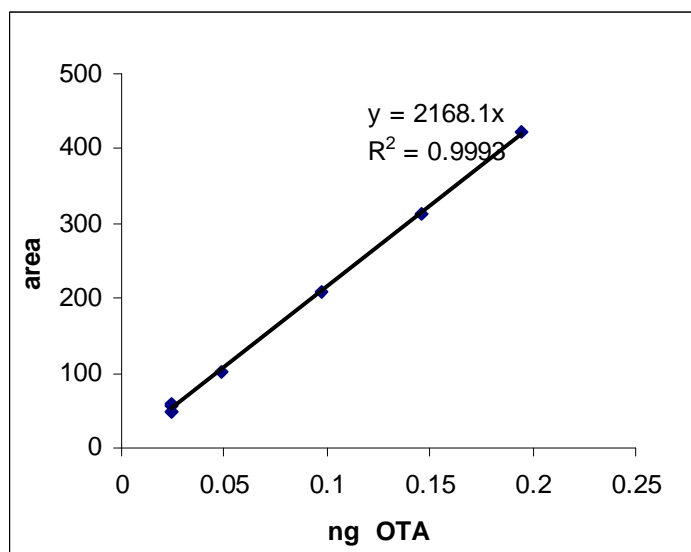


Figura 44. Curva de calibración de OTA

Para la confirmación, se puso a punto la derivatización de la OTA en su correspondiente éster. En la Figura 45, se observa un cromatograma del derivado metilado con un tiempo de retención de aproximadamente 16,5 min. El LD y LQ para estos es de 0,017 ng/ml y 0,028 ng/ml respectivamente.

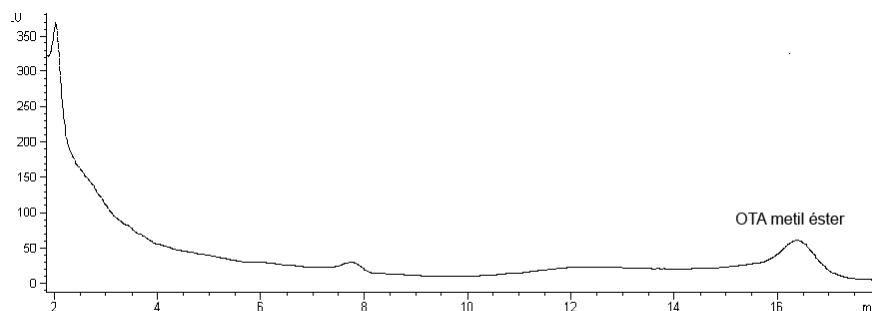


Figura 45. Cromatograma por HPLC de OTA metil éster

Es interesante observar que el derivado también presenta una relación lineal con el área tal como se observa en la Figura 46.

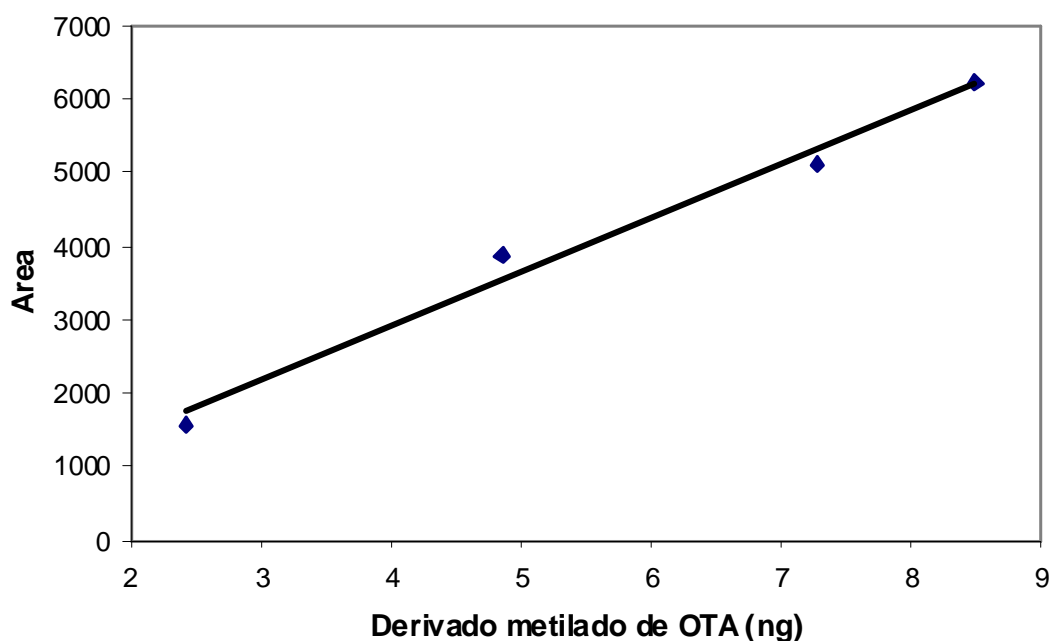


Figura 46. Área en función del derivado metilado de OTA

Los estudios de reproducibilidad fueron realizados por quintuplicado a un nivel de 2,61 ng y la desviación relativa estándar fue de 2,08 %.

El método, con las modificaciones realizadas al método original de Scott y col. (1998), mejoró sustancialmente su respuesta aumentando las recuperaciones de OTA del suero y disminuyendo los LD y LQ que fueron de 0,012 ng/ml y 0,019 ng/ml respectivamente para OTA.

IV.1.4. Niveles plasmáticos de OTA y evaluación de esas concentraciones como indicador de ingesta de OTA

Las muestras de plasma provenían de donantes de sangre del Centro Regional de Hemoterapia de Mar del Plata, ciudad marítima de la Argentina ubicada sobre la costa del océano Atlántico en el Sur de la provincia de Buenos Aires, 400 km al sur de la ciudad de Buenos Aires, siendo uno de los principales puertos pesqueros y que concentra la industria del procesamiento del pescado. Mar del Plata posee industria textil, frigoríficos para la carne vacuna y manufactura de alimentos como chacinados y productos de repostería. Con una población de 541.733 (Censo INDEC, 2001) es la séptima área urbana en la Argentina. Debido a que es una ciudad turística, la población se incrementa durante el verano, ocasionalmente se cuadruplica en número de habitantes. Otro grupo de donantes provenía del Hospital Vicente López y Planes de General Rodríguez, localidad ubicada a 55 km al oeste de la ciudad de Buenos Aires, siendo su población 67.931 (INDEC, 2001). La principal industria es la lechería y en segundo orden la población lleva a cabo tareas rurales.

Las características de los donantes de sangre se obtuvieron de las respuestas de la primera parte de las encuestas (ver Anexos). En las figuras 47, 48 y 49 se observan los histogramas de edades, peso y altura de los donantes y de la tabla 39 el promedio y las desviaciones estándares de dichas características.

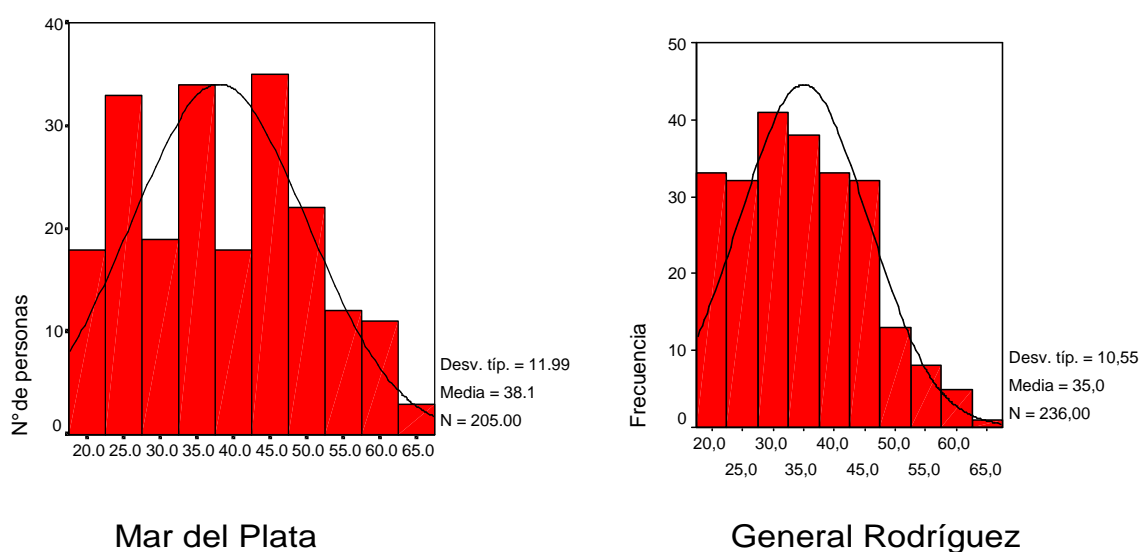
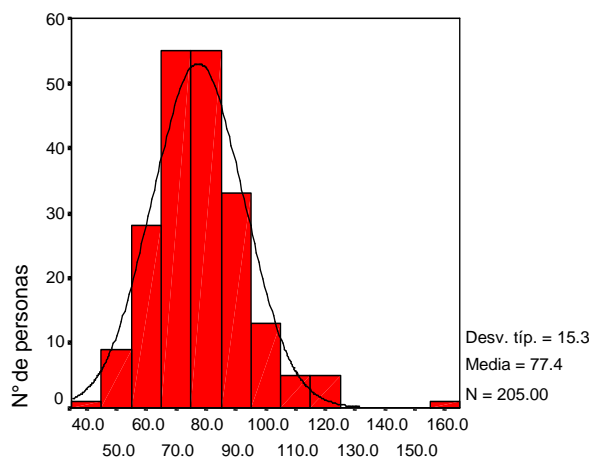
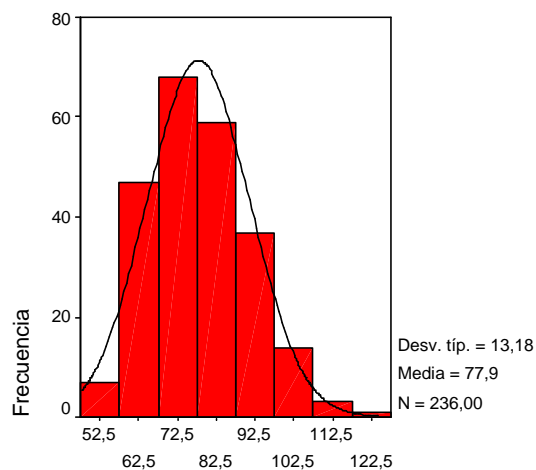


Figura 47. Distribución de las edades de los donantes de sangre en las dos localidades

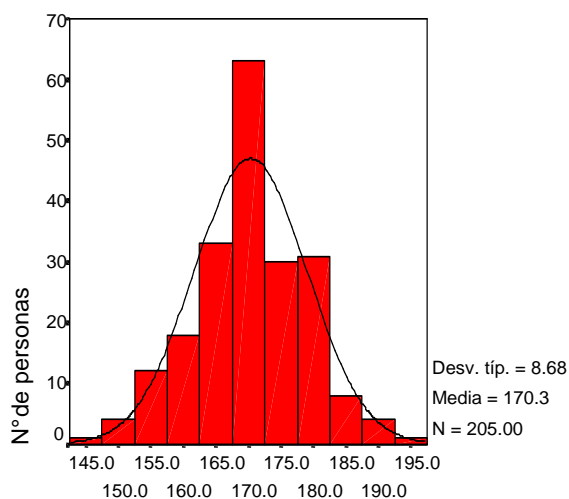


Mar del Plata

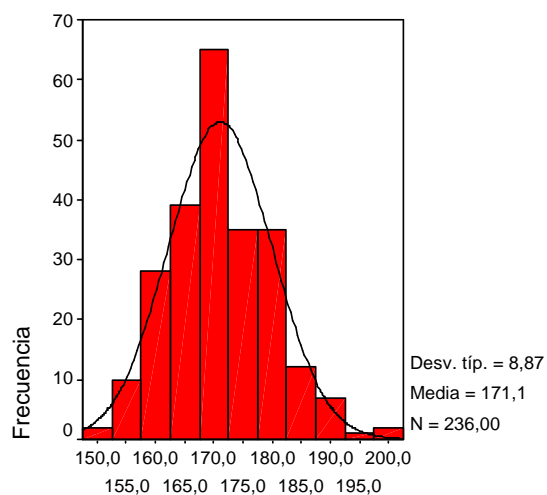


General Rodríguez

Figura 48. Distribución del peso de los donantes de sangre en las dos localidades



Mar del Plata



General Rodríguez

Figura 49. Distribución de la altura de los donantes de sangre en las dos localidades

Tabla 39. Características de los donantes de sangre en Mar del Plata y General Rodríguez

Edad (años)				Peso (kg)			
Mujer		Hombre		Mujer		Hombre	
Promedio	SD*	Promedio	SD*	Promedio	SD*	Promedio	SD*
40	13	37	12	70	13	80	15
36	9	35	11	68	11	80	12

* Desviación estandar

Como se puede observar la media de edad, altura y peso son similares en ambas zonas. A partir del análisis de OTA plasmática de donantes de sangre en dos áreas de la provincia de Buenos Aires, se observó que el 62,7 % de las muestras de plasma provenientes de Mar del Plata y el 63,8 % de las provenientes de General Rodríguez fueron positivas para ocratoxina A. En Mar del Plata, el 64,1 % de la población masculina y el 63,2 % de las mujeres tuvieron niveles positivos para OTA, en tanto, en General Rodríguez el 63,7 % de los hombres y el 58,1 % de las mujeres mostraron resultados positivos para OTA. La máxima concentración encontrada en Mar del Plata fue de 47,6 ng/ml y en General Rodríguez fue de 74,8 ng/ml (Tabla 40).

Los rangos de concentración plasmática encontrados en los donantes hombres en General Rodríguez fueron entre 0,019 ng/ml y 74,80 ng/ml, mientras que en mujeres los rangos fueron mucho más bajos (entre 0,019 y 8,69 ng/ml). A su vez, los niveles de concentración plasmática de OTA encontrados en los donantes hombres de la ciudad de Mar del Plata fueron entre 0,019 y 8,43 ng/ml, en tanto que para las mujeres entre 0,019 y 47,64 ng/ml. El 7,8 % de las concentraciones plasmáticas de OTA en Mar del Plata presentaron valores por encima de 1 ng/ml mientras que el 4,4 % tuvo valores por encima de 2 ng/ml. En General Rodríguez, el 23 % de las concentraciones plasmáticas de OTA fueron mayores a 1 ng/ml mientras que el 14 % de las concentraciones estuvieron por encima de 2 ng/ml. Es importante señalar que las frecuencias de los niveles de OTA plasmáticos encontrados en Bulgaria (Petkova-Bocharova y col., 2003), país con alta incidencia de nefropatía tubular cuya etiología fue relacionada con OTA (Nefropatía de los Balcanes) fueron similares a los encontrados en General Rodríguez. Es así que Petkova-Bocharova y col. (2003) determinaron que el 25 % de la población analizada presentaba valores de OTA en plasma superiores a 1 ng/ml y que el 12,5 % de la población tuvo concentraciones superiores a 2 ng/ml.

En Europa, los concentraciones de OTA determinadas en plasma, en distintos análisis poblacionales a nivel de percentilo 95, fueron en Dinamarca 2,03 ng/ml; Italia 3,6 ng/ml, Noruega 0,78 ng/l; España 1,23 ng/ml; Reino Unido 3,11 ng/ml; todos los países 5,58 ng/ml, mientras que en Mar del Plata, fue de 1,9 ng/ml y en General Rodríguez de 5,5 ng/ml (Task 3.2, 2002).

Tabla 40. Frecuencia de la concentración plasmática de ocratoxina A en muestras plasmáticas de donantes de sangre en las dos áreas de la provincia de Buenos Aires.

OTA ng/ml	General Rodríguez (n)		Mar del Plata (n)	
	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
ND	71	18	51	21
=LOD a < LQ	0	0	1	0
=LQ a 0,2	16	9	39	17
> 0,2 a 0,4	25	3	19	7
>0,4 a 0,6	17	5	11	3
> 0,6 a 0,8	14	2	5	3
>0,8 a 1,0	5	0	4	0
>1,0 a 1,2	2	0	2	1
> 1,2 a 1,4	8	2	2	2
> 1,4 a 1,6	5	1	0	0
> 1,6 a 1,8	1	0	0	0
> 1,8 a 2,0	1	0	1	0
>2,0 a 2,2	2	0	0	0
> 2,2 a 2,4	0	0	1	0
>2,4 a 2,6	0	0	1	0
> 2,6 a 2,8	3	1	1	0
> 2,8 a 3,0	0	0	1	1
> 3,0 a 3,4	3	0	2	0
> 3,4 a 3,8	3	0	0	0
> 3,8 a 4,2	0	0	0	0
> 4,2 a 4,6	3	1	0	0
> 4,6 a 5,0	0	0	0	0
> 5,0 a 6,0	3	0	0	0
> 6,0 a 7,0	2	0	0	0
> 7,0 a 8,0	0	0	0	1
> 8,0 a 9,0	2	1	1	0
> 9,0 a 10,0	3	0	0	0
> 10,0 a 20,0	1	0	0	0
> 20,0 a 30,0	1	0	0	0
> 30,0 a 40,0	1	0	0	0
> 40,0 a 50,0	0	0	0	1
> 50,0 a 60,0	0	0	0	0
> 60,0 a 70,0	0	0	0	0
> 70,0 a 80,0	1	0	0	0
Total	193	43	142	57

ND= no detectable, LD= límite de detección= 0,012 ng/ml, LQ= 0,019 ng/ml

Cuando se analizan poblaciones con rangos de valores muy amplios, como en este caso, es conveniente utilizar las medidas winsorizadas. La media winsorizada es un estimador robusto de la media de la población que es relativamente insensible a los valores que están muy alejados de la mayor cantidad de datos. Para calcular la media α winsorizada se realiza un porcentaje de sustitución igual a 20; esta medida sustituye un porcentaje de valores extremos por el último no reemplazado.

Para estudiar en detalle las diferencias entre las concentraciones plasmáticas de OTA entre las dos ciudades, se establecieron cuatro grupos de edades y se aplicó el test de t para comparar poblaciones. En todos los grupos de edad analizados fueron encontradas diferencias significativas entre las dos ciudades (Tabla 41).

Tabla 41. Concentraciones plasmáticas de OTA (ng/ml) de la población analizada, para los diferentes grupos de edad y comparación de dos áreas de la provincia de Buenos Aires.

Población	Mar del Plata			General Rodríguez			Diferencias promedio	P
	Promedio*	SD**	n	Promedio*	SD**	n		
Todos	0,1537	0,1700	199	0,4319	0,4919	236	- 0,2783	p<0,01
21 a 30 años	0,0940	0,1130	47	0,4640	0,5251	70	- 0,3701	p<0,01
31 a 40 años	0,2506	0,2735	53	0,4231	0,4846	71	-0,1725	p<0,05
41 a 50 años	0,1627	0,1700	58	0,2675	0,3054	56	-0,1048	p<0,05
51 a 60 años	0,1201	0,1311	24	1,7420	2,6191	19	-1,6219	p<0,05

* Promedio Winsorizado, ** Desviación estándar Winsorizada

Aunque esas diferencias no podrían atribuirse a diferencias en las características de la población (peso corporal, edad o raza) ya que estas fueron similares en ambas poblaciones; sí podría considerarse hipotéticamente atribuibles a variaciones regionales o a diferencias estacionales, considerando que en Mar del Plata las muestras fueron obtenidas en verano y en General Rodríguez en otoño y comienzos del invierno, o a consumo de alimentos diferentes. Se han encontrado en otros países variaciones estacionales en los niveles plasmáticos, aunque al contrario de lo observado por nosotros las concentraciones más altas fueron obtenidas en verano (Palli y col., 1999; Peraica y col., 2001). En estudios realizados en Dinamarca se

informaron amplias variaciones según el mes de recolección y lo significativo es que el mes en que se encontró la mayor concentración plasmática de OTA fue diferente en los tres años estudiados (Hald, 1991). Estos datos indicarían que las variaciones estacionales no influirían sobre las concentraciones plasmáticas, como tampoco los cambios que pudiera tener la contaminación.

No obstante esas diferencias podrían atribuirse a variaciones regionales. En Alemania, se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos entre las dos regiones, en Munich las concentraciones plasmáticas promedio encontradas en la población analizada fue de 0,17 ng/ml mientras que en Jena fue de 0,34 ng/ml. Lo mismo se observó en otros países como Canadá, Suiza, Francia, Suecia (Creppy, 1999; Gareis y col., 2000; Scott y col., 1998; Rosner y col., 2000; Thuvander y col., 2001; Zimmerli y Dick, 1995).

Otra posibilidad es que a pesar de no haber diferencias en las cantidades o frecuencias de consumo de la mayoría de los alimentos (IV.1.1), la calidad de los mismos pueda ser inferior, ya que los donantes de General Rodríguez son de menores recursos que los de Mar del Plata. Es importante establecer en estudios posteriores la causa de estas diferencias.

Al comparar los niveles de OTA entre mujeres y varones en estas dos áreas de la provincia de Buenos Aires, se pudo observar que solamente en General Rodríguez las diferencias fueron significativas (Tabla 42), siendo el promedio encontrado mayor en hombres (0,4752 ng/ml respecto a 0,2059 ng/ml en mujeres) aunque en ambas poblaciones el porcentaje de los hombres y de las mujeres con valores cuantificables (> LQ) de OTA fueron similares.

En Canadá, Túnez y Alemania (Gareis y col. 2000; Grosso y col. 2003; Scott y col. 1998) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. En tanto en España, se encontraron diferencias significativas (medias/hombres 1,75 ng/ml vs 1,12 ng/ml) entre hombres y mujeres con concentraciones plasmáticas promedio más altas en mujeres respecto a hombres cuando se realizó el análisis en los meses de verano (1,75 ng/ml (Burdaspal y Legarda, 1998).

Tabla 42. Promedio Winsorizado de las concentraciones plasmáticas de OTA (ng/ml) comparación entre varones y mujeres en dos áreas de la provincia de Buenos Aires

Población	Mujeres			Varones			Diferencias promedio	P
	Promedio*	SD**	n	Promedio*	SD**	n		
General Rodríguez	0,2059	0,2260	43	0,4752	0,5217	193	0,2693	p<0,001
Mar del Plata	0,1524	0,1595	57	0,1644	0,1707	142	-0,1198	p=0,64

* Promedio winsorizado: A los valores nd, se les asignó un valor LD/2 y a los valores entre el LQ y el LD fueron asignados los valores informados.

** Desviación estándar winsorizada

Las concentraciones plasmáticas de OTA son el resultado de lo que es absorbido por el organismo (biodisponibilidad de la toxina) menos lo que es eliminado por heces u orina (clearance plasmático). Con estas concentraciones plasmáticas es posible estimar la ingesta de OTA. Es decir que es esperable que una concentración alta provenga de una ingesta elevada y viceversa. Además es importante tener en cuenta en este caso que la OTA en plasma presenta un tiempo de vida media prolongado que hace posible su detección en sangre.

La ecuación de Klassen se aplica para calcular y estimar cuanta OTA ha sido ingerida cuando se conoce la concentración plasmática de la misma (Breitholtz y col., 1991 a, b; Dietrich y col., 2005; Klassen, 1986; Miraglia y col., 1996).

Con el promedio alfa winsorizado de la concentración plasmática (Tabla 40) y la ecuación de Klassen se calculó la ingesta dietaria de OTA, que fue de 0,30 y 0,21 ng/kg peso corporal/día en Mar del Plata; y de 0,84 y 0,47 ng/kg peso corporal/día en General Rodríguez, con un factor de 1,97 o 1,34 respectivamente.

Para comparar la ingesta dietaria de OTA con otros países, se incluyeron los calculos de las medianas de las concentraciones plasmáticas de OTA de las dos poblaciones. Las medianas de las concentraciones plasmáticas de OTA fueron de 0,11 ng/ml para Mar del Plata y de 0,24 ng/ml para General Rodríguez (Huber, 1964; Tsokos, 1987). Los resultados fueron 0,21 (0,15) y 0,47 (0,32) ng/kg peso corporal/día en Mar del Plata y General Rodríguez, respectivamente (Tabla 43) con un factor de 1,97 o 1,34.

Tabla 43. Exposición a Ocratoxina A (Klassen 1,97)

País	Concentración plasmática (ng/ml)	Ingesta estimada ⁽⁵⁾ (ng/kg peso corporal / día)
Alemania	0,23 ⁽¹⁾	0,45
Italia	0,59 ⁽¹⁾	1,16
Noruega	0,18 ⁽¹⁾	0,35
España	1,19 ⁽¹⁾	2,34
Suecia	0,21 ⁽¹⁾	0,41
Gran Bretaña	1,098 ⁽¹⁾	2,16
Todos los países europeos	0,34 ⁽¹⁾	0,67
Mar del Plata	0,10 ⁽²⁾ / 0,15 ⁽³⁾	0,21 / 0,30
General Rodríguez	0,24 ⁽²⁾ / 0,43 ⁽³⁾	0,47 / 0,84
Colbún	0,42 ⁽⁴⁾	0,83
San Vicente de Tagua-Tagua	0,76 ⁽⁴⁾	1,49

- (1) Task 3.2 (2002). Promedio obtenido incluyendo los valores informados como < LD se considera como el LD/2 y en el caso que aquellos valores menores al LQ, se considera como LQ/2.
- (2) Mediana
- (3) Media winzoriada
- (4) Media
- (5) Estimada a partir de la concentración de OTA plasmática

Mar del Plata presentó menores niveles de concentración plasmática de OTA respecto a todos los países europeos (Task 3.2., 2002) y en consecuencia valores más bajos de ingesta diaria de OTA, en tanto que la población encuestada en General Rodríguez tuvo niveles de ingesta similares a los informados para la población general en Alemania.

La estimación de la ingesta de OTA por semana en estas dos ciudades, calculada en el percentilo 95 de la concentración plasmática de OTA, utilizando la ecuación de Klassen (factor: 1,97 o 1,34) fue 32,0 (22,0) y 84,2 (57,3) ng/kg peso corporal en Mar del Plata y en General Rodríguez respectivamente; esto es por debajo del valor establecido de la Ingesta Provisional Tolerable por Semana (PTWI) establecido en el 2001 por el JEFCA, que o sea 100 ng/kg de peso/semana. Estos niveles de ingesta por semana se corresponden con valores de concentraciones plasmáticas de 2,3 y 6,1 ng/ml respectivamente.

El cálculo de ingesta por día máximo podría considerarse como 100 ng/kg p.c. dividido por 7 (números de días en una semana). Si el valor que se obtiene (14,3 ng/kg p.c./día) se le aplica la ecuación de Klassen con la constante 1,97, el máximo valor aceptable de OTA en plasma correspondería a 7,25 ng/ml.

De acuerdo a los resultados obtenidos, fueron 10 (4,2%) de un total de 236, los donantes con concentraciones plasmáticas por encima de 7,25 ng/ml en General Rodríguez, y en Mar del Plata se encontraron 3 de un total de 199 donantes (1,5%).

Para determinar si las diferencias en las concentraciones plasmáticas de OTA entre el percentilo 10 y 90 pueden atribuirse a la ingesta se evaluó cómo eran esas diferencias. Las diferencias encontradas en los niveles plasmáticos de OTA entre los individuos con los más altos valores (percentilo 90) y los más bajos (percentilo 10) fueron de 3,0 en General Rodríguez siendo la diferencia de ingesta de 1,32 calculada a partir de la encuesta, mientras que en Mar del Plata la diferencia en los niveles plasmáticos fue de 0,9 y en la ingesta no hubo diferencias (Tabla 44).

Tabla 44. Niveles plasmáticos de OTA en el percentilo 10 y 90 y sus correspondientes niveles de ingesta de OTA calculada a partir de la concentración plasmática y calculada a través del nivel de contaminación y el consumo de alimentos en ambas poblaciones

	General Rodríguez		Mar del Plata	
	Percentilo 10 th	Percentilo 90 th	Percentilo 10 th	Percentilo 90 th
Concentración plasmática (ng/ml)	0,006	3,043	0,006	0,8857
Ingesta (1,95) (ng/kg/día) ⁽¹⁾	0,012	5,934	0,012	1,727
Ingesta (ng/kg/día) ⁽²⁾	0,609	1,93	1,065	1,08

(1) Ingesta calculada a partir de los niveles plasmáticos

(2) Ingesta calculada a partir del consumo de alimentos

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar si había asociación entre los valores plasmáticos y los niveles de ingesta de OTA. Los coeficientes entre los niveles plasmáticos de OTA y los consumos individuales de

cada alimento fueron calculados considerando aquellos alimentos que pueden contribuir en mayor proporción a la ingesta de OTA (Tabla 45).

Tabla 45. Correlación entre el nivel de ingesta de ciertos alimentos y la concentración plasmática de OTA

	General Rodríguez	Mar del Plata
	r	r
Vino	0,163	0,014
Frutas desecadas	0,175	0,040
Panificados	0,029	0,050
Polenta	0,136	0,030
Carne de cerdo	0,057	0,055
Avena	0,200	0,030
Aves	0,060	0,043
Frutas secas	0,120	0,034
Cerveza	0,020	0,042
Mantecol	0,017	0,017
Infusiones	0,050	0,025
Golosinas (chocolate)	0,076	0,030

Ninguno de los alimentos estudiados que pueden aportar a la exposición por OTA presentó correlación con los niveles plasmáticos determinados.

Al haberse encontrado diferencias en las concentraciones plasmáticas de OTA entre las dos poblaciones en todos los rangos de edad (Tabla 40); se trató de analizar si había diferencias significativas entre la ingesta de los distintos alimentos que podrían contribuir a la exposición por OTA. No se encontraron diferencias significativas entre la ingesta de los alimentos que más pueden contribuir a la ingesta de OTA comparando las dos poblaciones ($p > 0,05$).

IV.2. Fumonisin

IV.2.1. Determinación de fumonisin libres en copos de maíz adquiridos en la ciudad de Mar del Plata

La mayoría de los métodos desarrollados para el análisis de fumonisin en distintas matrices están basados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia de la fumonisin derivatizada con OPA en presencia de 2-mercaptoetanol en buffer borato (Scudamore y Patel, 2000; Shepard y col., 1990).

Los resultados del análisis de la contaminación por fumonisin de 22 muestras de copos de maíz adquiridos en la ciudad de Mar del Plata en donde se utilizó la columna SAX para limpieza, se presentan en la Tabla 46.

Tabla 46. Concentración de fumonisin B₁, B₂, B₃ (µg/kg) en copos de maíz; limpieza realizada a través de columnas de intercambio aniónico (SAX)

Muestra	FB1	FB2	FB3
1	2	nd	nd
2	< LOQ	nd	nd
3	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd
5	6,6	nd	nd
6	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd
8	46,5	nd	nd
9	nd	nd	nd
10	19,9	nd	nd
11	54,9	nd	nd
12	74,5	nd	nd
13	nd	nd	nd
14	34,7	nd	nd
15	nd	nd	nd
16	26,9	nd	nd
17	nd	nd	nd
18	nd	nd	nd
19	5,5	nd	nd
20	nd	nd	nd
21	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd

nd: no detectado

LQ: FB1 5 µg/ kg, FB2 10 µg/ kg; FB3 7 µg/ kg

Cuando la extracción se realizó con metanol: agua y la limpieza por columnas SAX, en 18 de las 22 muestras no se detectaron fumonisinas. El rango de contaminación por fumonisina B₁ fue de 18,3 a 155,2 µg/kg, para FB₂ se encontraron dos muestras con 17,8 µg/kg y 26,0 µg/kg y en una muestra se detectó (por debajo del LQ) con un valor estimado de 1,7 µg/kg de FB₃.

Las contaminaciones encontradas fueron en niveles muy bajos por ello para confirmar estos valores se procedió a utilizar otro método descrito en el punto IV.2.4, que incluye una extracción por acetonitrilo: metanol: agua y la limpieza con una columna inmunológica. En la Tabla 47 se encuentran los resultados obtenidos con este método. En 12 muestras no se detectaron fumonisinas (54,5% negativas), en tanto que las muestras positivas por FB₁ presentaron un rango entre menor que el LQ y 74,5 µg/kg. En este método no se encontraron FB₂ y FB₃.

Cuando la limpieza de los extractos fue realizada con columna de inmunoafinidad se observó solamente contaminación por fumonisina B₁, a diferencia de los resultados obtenidos luego de la limpieza por columna SAX que presentaban también contaminación por FB₂ y FB₃.

Estudios anteriores mostraron que la columna Fumonitest tiene la misma afinidad hacia fumonisina B₁ y B₂ (Ware y col., 1994). Sin embargo en este trabajo no se detectó FB₂ con la columna IAC.

Las diferencias encontradas en los niveles de contaminación de los copos de maíz analizados con el método de la AOAC respecto al método que utiliza la columna de inmunoafinidad para la limpieza, ya fueron descritas en anteriores trabajos, en donde se observó que en copos de maíz (naturalmente contaminados a un nivel de 1,5 µg/g de FB₁ + FB₂), la recuperación obtenida luego de la extracción con ACN: metanol: H₂O (25:25:50) y limpieza por columna de inmunoafinidad fue del 90 %. La utilización del método oficial de AOAC para maíz (SAX) arrojó recuperaciones más bajas (De Girolamo y col., 2001b; Scott y Lawrence, 1994). Ellos suponen que las diferencias de recuperación encontradas en ambos métodos pueden deberse a complejos de quelación con el Fe presente en los copos de maíz comerciales que producen una falta de retención de la columna SAX hacia los grupos TCA de la molécula de fumonisinas. Estas bajas recuperaciones pudieron ser mejoradas cuando se utiliza para la extracción buffer borato (pH 9,2) (Scott y Lawrence, 1994). En

algunos trabajos, que analizaron cereales para desayuno con maíz que contienen avena, arroz, azúcar, chocolate, con columnas de inmunoafinidad se ha informado recuperaciones menores al 60 %; posiblemente porque algunos componentes de la matriz presentan reacciones cruzadas con anticuerpos y bloquean de esa manera los sitios de unión y disminuye la capacidad para retener las fumonisinas (Castegnaro y col., 2006).

Tabla 47. Concentración de fumonisinas B₁, B₂, B₃ (µg/kg) en copos de maíz; limpieza realizada con columnas de inmunoafinidad (IAC).

Muestra	FB1	FB2	FB3
1	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd
5	nd	nd	nd
6	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd
8	nd	nd	nd
9	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd
11	nd	nd	nd
12	155,3	26,0	1,7
13	nd	nd	nd
14	70,6	17,8	nd
15	nd	nd	nd
16	21,0	nd	nd
17	nd	nd	nd
18	nd	nd	nd
19	nd	nd	nd
20	nd	nd	nd
21	18,3	nd	nd
22	nd	nd	nd

nd: no detectado.

LQ : FB1 0,5 µg/ kg, FB2 2 µg/ kg; FB3 0,5 µg/ kg.

A pesar del alto nivel de contaminación por fumonisinas que se han encontrado en el maíz cosechado en Argentina, los niveles de concentración de estas micotoxinas en los copos de maíz fueron bajos con ambos métodos. Los niveles de toxinas encontrados en copos de maíz, están de acuerdo con los valores de contaminación

analizados en otros países (Tabla 16) y serían los valores esperados en alimentos con maíz procesado por extrusión y horneado, ya que en éstos, los niveles encontrados son mucho más bajos que los determinados en el grano de maíz sin procesar.

Con respecto a la exposición y teniendo en cuenta los datos de encuestas llevadas a cabo en nuestro país, la ingesta máxima admisible diaria (2 µg por kilogramo de peso corporal por día) sugerida por el JECFA (2001) y la máxima contaminación de fumonisinas totales detectada en este trabajo (183 µg/kg), el aporte a la ingesta de copos de maíz contaminados, oscilaría entre 0% a 39.2% según el grupo etéreo considerado. (Tabla 48).

Tabla 48. Estimación de la exposición a fumonisinas a través de la ingesta de copos de maíz (F= femenino, M= masculino)

Grupo (peso en kg)	Ingesta de copos de maíz (g)	Exposición a fumonisinas	
		µg/kg p.c. día	Porcentaje
Encuesta promedio Pacin y col. (1998)			
F1 (58,9)	21,6	0,06709	3,35
F2 (62,5)	2,2	0,00644	0,32
M1 (62,5)	2,8	0,00729	0,36
M2 (70,3)	2,8	0,00693	0,35
Encuesta (consumidores) Gallo y col. (1992)			
F1 (14)	0	0,00000	0,00
F2 (24)	40	0,29270	14,64
F3 (40)	20	0,09147	4,57
F4 (56)	60	0,19601	9,80
F5 (58)	20	0,06308	3,15
F6 (60)	0	0,00000	0,00
M1 (14)	60	0,78403	39,20
M2 (25)	0	0,00000	0,00
M3 (40)	80	0,36588	18,29
M4 (61)	50	0,14995	7,50
M5 (78)	10	0,02345	1,17
M6 (80)	90	0,20581	10,29

Los niveles hallados de fumonisinas en copos de maíz comercializados en Mar del Plata parecen no constituir un riesgo para el consumidor si se considera este alimento como el único que aporta fumonisinas.

La importante reducción en el nivel de contaminación del maíz por fumonisinas durante la producción de copos de maíz evidencia la necesidad de conocer a donde fueron las fumonisinas presentes en el maíz o sea como hipótesis se plantea la posibilidad que durante el procesamiento estas toxinas se destruyan o se unan a la matriz. Por ello se propuso ampliar el análisis de las mismas a otros compuestos que puedan presentarse en los copos de maíz pues su procesamiento incluye tratamiento por calor y en la mayoría de las plantas de elaboración, una etapa de extrusión (altas temperaturas y presiones). Para cumplir con este propósito se viajó a Ottawa, Canadá para trabajar en el “Bureau of Chemical Safety, Health Canada”.

IV.2.2. Determinación de fumonisinas libres y unidas en cereales para desayuno adquiridos en Ottawa

Shier y col. (1997) señalan que no se conoce aún la amenaza a la seguridad alimentaria por las fumonisinas que contaminan los alimentos, en parte debido a que algo de las FBs que contaminan la materia prima pueden ser convertidas durante el procesamiento de los alimentos a otras formas químicas no identificables por los métodos convencionales. En los experimentos por ellos realizados observaron casi un 50 % de la ^{14}C FB₁ que se agregaba como contaminante no era extraído con los solventes convencionales (solución acuosa de acetonitrilo) y solo pudo ser extraídas con SDS la fracción que se denominó fumonisinas unidas a proteínas.

La determinación de fumonisinas unidas es un método indirecto (Kim y col., 2003; Meister, 2001; Park y col., 2004; Shier y col., 1997) ya que el análisis consiste en una hidrólisis de las cadenas laterales de TCA y la formación de HFB₁ detectable. En el análisis de proteínas unidas, en este trabajo, se usó SDS como solvente de extracción de las fumonisinas unidas a proteínas. Se aplicó la modificación de Park y col. (2004) que agrega posteriormente a la extracción azul de metileno (Hayashi, 1975) para formar un complejo con el SDS remanente, ya que éste causa interferencias en los análisis cromatográficos.

Para la determinación de TB FB₁ se utilizó la técnica original de Park y col. (2004). En aquellas muestras que con la hidrólisis con KOH se formaba un gel que dificultaba la extracción y bajaba la recuperación, se implementaron unas modificaciones que se describen en IV.2.2.1 y IV.2.2.2.

En las muestras se cuantificó FB₁ libre por HPLC con una fase móvil compuesta por metanol-fosfato dihidrógeno de sodio 0,05 M (70:30, v/v) acidificado hasta un pH aparente de 3,3 con ácido ortofosfórico y corrido isocráticamente a una velocidad de flujo de 0,8 ml min⁻¹. En condiciones isocráticas, el tr. de FB₁ estaba muy próximo al de HFB₁.

Para la detección de HFB₁, la limpieza de los extractos se realizó a través de la columna Varian HF C18 (3cc) (Park y col., 2004), tal como se describe en punto IV.2.4.1. en materiales y métodos. En dicha sección se puede encontrar también la metodología para el análisis de PH FB₁ con IAC.

Para la cuantificación y análisis de PHFB₁ en el extracto de los copos de maíz fue necesario preparar estándares de los dos isómeros de PHFB₁.

Se probaron distintas fases móviles para elegir aquella que permitiera la mejor separación entre FB₁ y sus productos de hidrólisis. En los primeros análisis de los isómeros de PHFB₁ se trabajó con una fase móvil de ACN: H₂O: ácido acético (50: 49: 1, v/v/v) con una velocidad de flujo de 0,5 ml/minutos. En esas condiciones se obtenían dos picos correspondientes al tr. de FB₁ y HFB₁ que presentaba un hombro en el cromatograma (Figura 50).

Thakur y Smith (1996) enfatizaron la necesidad de ajustar las condiciones de la corrida cromatográfica para que los analitos en estudio eluyan a tiempos de retención más largos y evitar que coeluyan con los sustancias interferentes. Pagliuca y col. (2005) sustentan esta postura de prolongar los tr. de FB₁ y H FB₁, cuando realizan la extracción de esas micotoxinas de hígado de cerdo y lo analizan por HPLC. Ellos observaron la presencia de picos desconocidos a tiempos de retención cortos. Se decidió trabajar con una fase móvil de metanol: Na H₂ PO₄ 0,1 M (68:32, v/v) pH 6,0 (Shepard y col., 1994b), pero a una velocidad de flujo de 0,8 ml/minutos; en esas condiciones se logró una buena separación entre FB₁ y sus productos de hidrólisis (tiempos de retención para FB₁ =11,431 min., PHFB_{1a} =13,997

min., PHFB₁b =16,640 min. y HFB₁ =24,287 min.). Además se observó un pequeño pico no identificado a un tr. =19,339 min. (Figura 51). Por lo tanto estas fueron las condiciones elegidas para una mejor separación de FB₁ de sus productos de hidrólisis, donde la fase móvil utilizada fue ajustada a pH 6 en condiciones de gradiente para obtener tiempos de retención más prolongados para la separación de los productos de hidrólisis, PHFB₁ y HFB₁. Posteriormente se optimizó la fase móvil tal lo indicado en materiales y métodos, con el fin de obtener buenas separaciones y tiempos de corrida no tan prolongados (Shephard y col., 1994b; Sydenham y col., 1995).

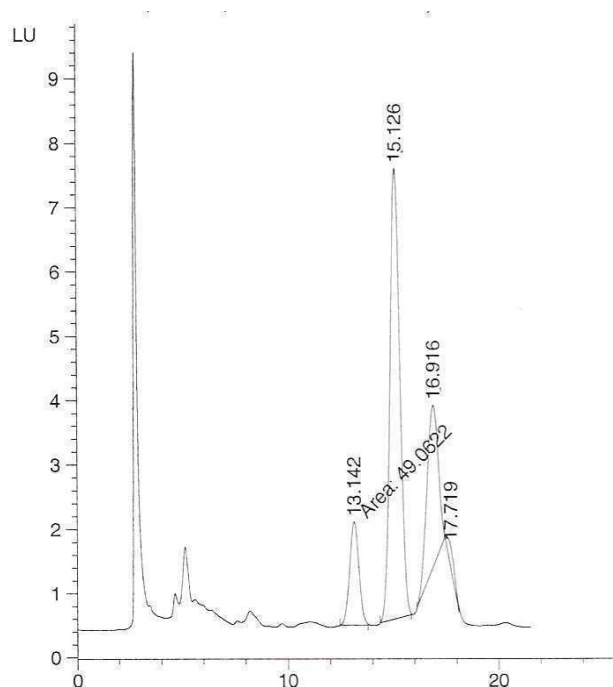


Figura 50. Separación por HPLC de Fumonisin B₁ y sus productos de hidrólisis obtenidos, con KOH 2M; fase móvil ACN: H₂O: ACH (50: 49: 1, v/v/v). Flujo 0,5 ml/min, pH 3,3

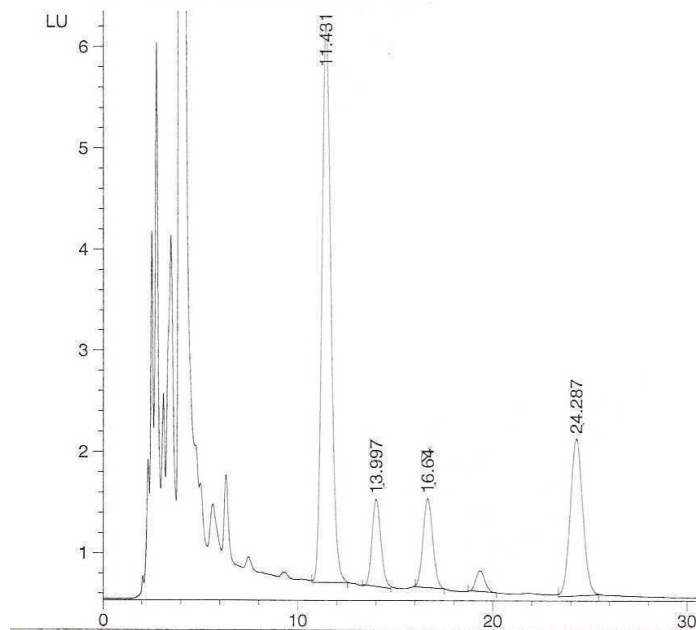


Figura 51. Cromatograma por HPLC de Fumonisina B₁ de sus productos de hidrólisis, fase móvil metanol: Na H₂ PO₄ (68:32, pH 6,0 v/v) Flujo 0,8 ml/min. pH 6,0

Los productos de hidrólisis de FB₁ fueron confirmados por HPLC-MS (Figura 52).

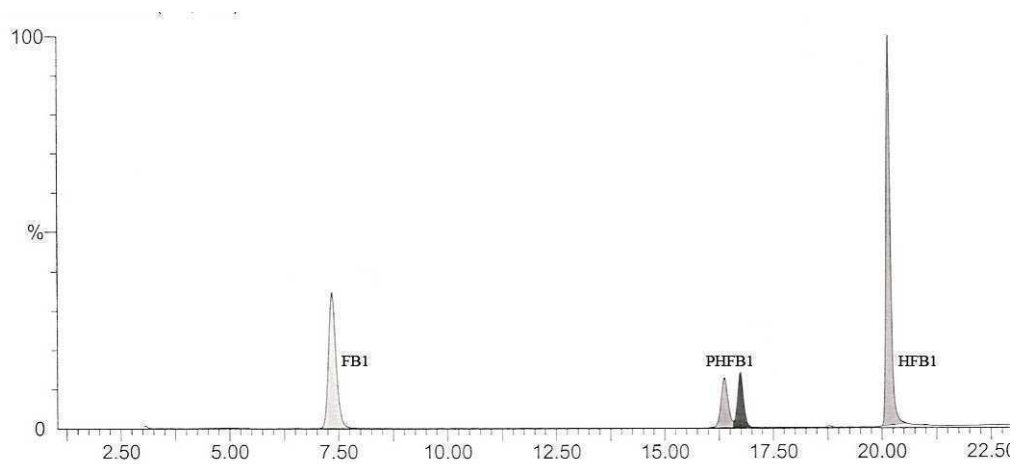


Figura 52. Cromatograma por HPLC-MS del hidrolizado obtenido por tratamiento de FB₁ con KOH 2M durante 1 hora a temperatura ambiente

Si bien no existen estudios previos que evalúen la limpieza de PHFB₁ a partir de copos de maíz con columna inmunológica; cuando el extracto de copos de maíz fue fortificado con los productos de FB₁ parcialmente hidrolizados, éstos pudieron ser

recuperados luego de pasarlos a través de la columna IAC (Vicam). De acuerdo a lo descrito por Azcona-Olivera y col. (1992), los anticuerpos preparados contra FB₁, muestran una reactividad cruzada hacia los anticuerpos séricos usados contra FB₂ y FB₃, pero no tienen reacción cruzada contra el esqueleto de HFB₁ y el ácido tricarbálico; lo que sugiere que el inmunodominio del inmunógeno existe cerca de la unión de los ácidos tricarbálicos desde el C-11 y hasta el C-20 del esqueleto de la fumonisina. Es así que, teniendo en cuenta el inmunodominio (Figura 53) hacia donde se dirige el anticuerpo presente en la columna inmunológica, es esperable que los isómeros de la fumonisina parcialmente hidrolizada (PHFB₁) puedan ser retenidos por la columna inmunológica (Azcona-Olivera y col, 1992). El anticuerpo anida en su estructura al antígeno (Roit y col., 1986).

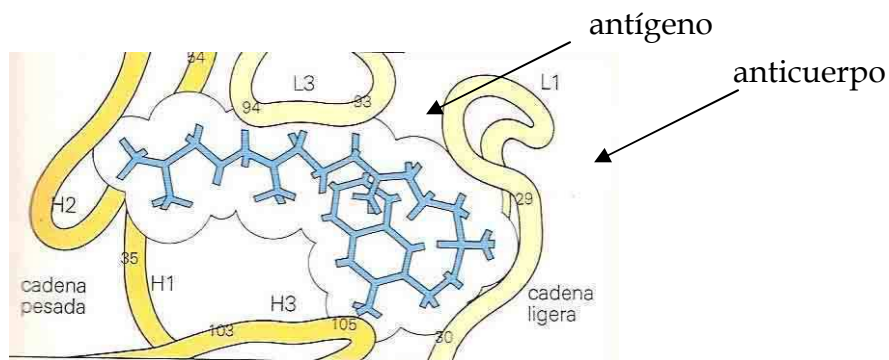


Figura 53. Sitio de combinación antígeno-anticuerpo

Distintos cereales para desayuno, con maíz como cereal mayoritario, fueron adquiridos en comercios en Ottawa, para el análisis del nivel de contaminación por fumonisinas libres y unidas. La ocurrencia natural de fumonisinas libres y unidas se observa en la Tabla 49.

Tabla 49. Niveles de contaminación de **FB₁**, **PBFB₁** y **TBFB₁** en cereales para desayuno

Muestra	FB₁ (ng/g)	PBFB₁⁽¹⁾ (ng/g)	TBFB₁⁽¹⁾ (ng/g)
PK1	10,0 ± 2,0 n = 2	10,0 ± 1,6 n = 2	15 ± 0,8 n = 2
BQ2	79,5 ± 24,0 n=2	14,3 ± 8,1 n = 3	15 n = 1
FK3	26,0 ± 1,4 n =2	11,8 ± 2,5 n = 2	17,8 ± 0,7 n = 2
FM4	15,0 ± 2,0 n= 3	10,0 n = 1	74,3 ± 41,6 n =4
FN5	28,8 ± 10,1 n = 3	38,3 n=1	40,8 ± 15,3 n =2
FP6	44,5 ± 4,9 n = 2	15,3 n = 1	25,7 ± 9,9 n = 4
DP7	26 n =1	9,0 n = 1	23,9 ± 19,3 n = 2
CK8	20 n =1	19,0 n =1	20,5 n = 1
FK9	35,0 n =1	27,9 n = 1	33,2 ± 18,7 n =2
BQ10	10,0 n=1	12,0 n = 1	17,3 ± 10,4 n =2
FP11	29,0 ± 3,0 n =2	13,0 n =1	23,0 ± 0,8* n =3
FN12	125,0 ± 33,0 n= 3	25 n =1	92 ± 33,0* n =3
FMC13	126,0 n= 1	22,4 n =1	54,4* n =1

(1) Niveles informados como FB₁ equivalente

* Valores obtenidos luego de la optimización de la metodología descrita en IV 2.2.2.

Los valores de fumonisina B₁ determinados en estas muestras varían entre 10 y 126 ng/g (equivalente a µg/kg). En la figura 54 se puede observar los “box plots” que muestran gráficamente las tendencias y variabilidad de los niveles de contaminación de los tres compuestos. El rango de PB FB₁ en las muestras analizadas varió entre los valores promedio de 9 a 27,9 ng/g y el de TB FB₁ de 15 a 92 ng/g.

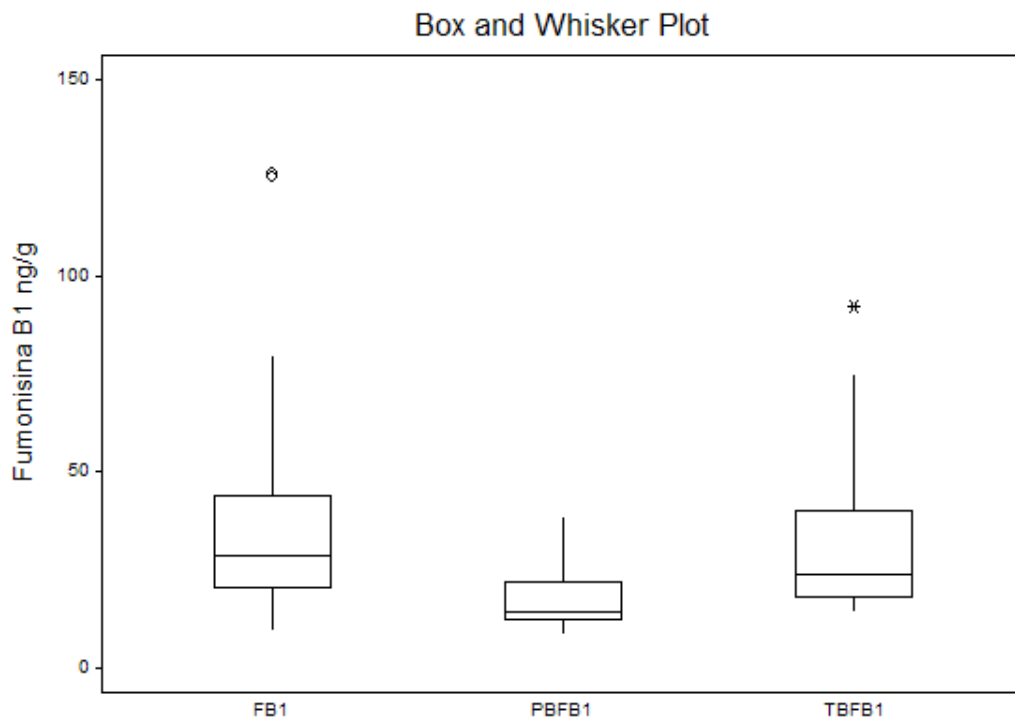


Figura 54. Box plots de FB₁ , PB FB₁ y TB FB₁ expresados como FB₁ equivalente en las muestras de cereales para desayuno

En la Figura 55 se encuentran el estudio de las tendencias y variabilidad de las relaciones entre FB₁ y PBFB₁ (REL FBPB), entre FB₁ y TBFB₁ (RELFBTB) y entre TBFB₁ y PBFB₁ (RELTBPB). En la tabla 50 los valores descriptivos de esa relación.

Como se puede observar la cantidad de FB₁ tiene una tendencia a ser mayor que PB FB₁ y TB FB₁ y consistentemente TBFB₁ es mayor que PB FB₁.

Las muestras de copos de maíz entre los cereales para desayuno presentaron un comportamiento similar. El nivel promedio y desviación estándar de FB₁ libre en los distintos copos de maíz analizados fue de $53,7 \pm 43,4$ ng/g, valores muy similares a las muestras de copos de maíz analizados en Argentina (IV.2.1). En los copos de maíz el promedio de PBFB₁ fue de $20,5 \pm 9,7$ ng/g y de TB FB₁ fue $45,1 \pm 26,2$ ng/g.

Park y col. (2004) analizaron 15 muestras de copos de maíz que presentaron un promedio de contaminación de FB₁ 59 ng/g, PBFB₁ de 49 ng/g y TBFB₁ 95 ng/g.

En copos de maíz la relación entre TBFB₁ y PB FB₁, entre FB₁ y TBFB₁ y entre FB₁ y PBFB₁ fue similar a la tendencia observada en este trabajo.

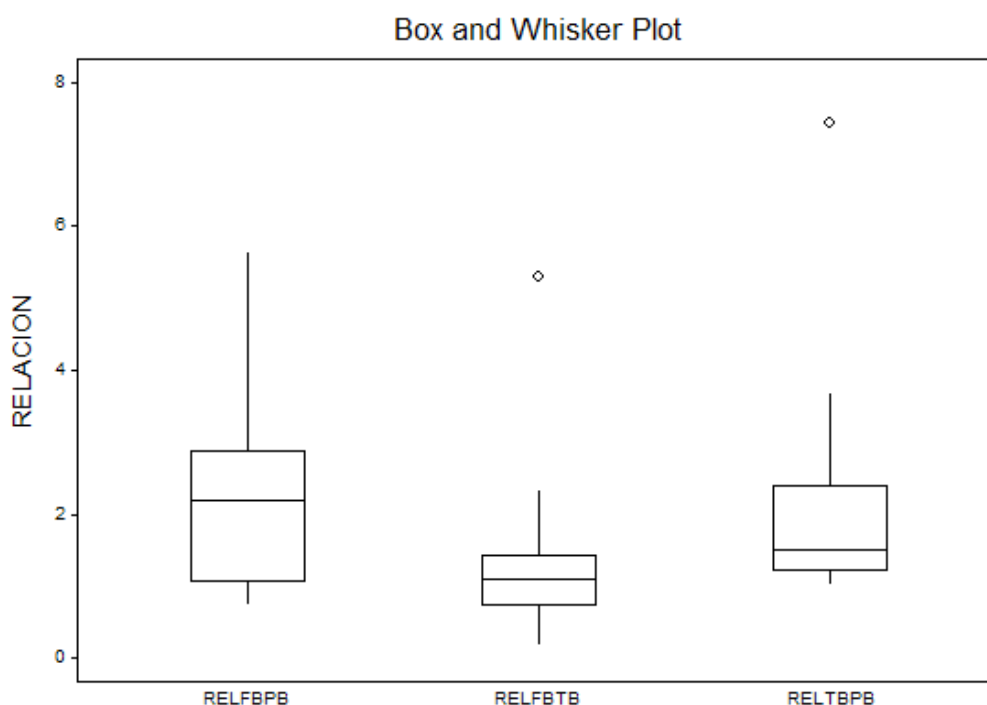


Figura 55. Box plots de las relaciones entre FB_1 , PFB_1 y TFB_1 expresados como FB_1 equivalente en las muestras de cereales para desayuno

Tabla 50. Valores descriptivos de la relación entre FB_1 , PB_1 y TB_1 expresados como FB_1 equivalente en las muestras de cereales para desayuno

	RELFBPB	RELFBTB	RELTBPB
Media	2,52	1,44	2,19
SD	1,79	1,28	1,75
Mínimo	0,75	0,20	1,05
Mediana	2,20	1,09	1,51
Máximo	5,62	5,30	7,43

Las fumonisinas unidas totales fueron tanto en otros cereales para desayuno, como en la mayoría de los copos de maíz (por ejemplo FN12 y FMC13), mayores que el nivel de fumonisinas unidas a proteínas. Esto indica que posiblemente además de la forma unida a proteína también se encuentre la forma unida a almidón. Seefelder y

col. (2003) propusieron la unión de fumonisinas con polisacáridos vía la cadena lateral de ácido tricarbálico (o tricarbóxico).

En los copos de maíz denominados, FP11, FN12 y FMC13, además del análisis de FB₁ libre; se evaluó la presencia de sus productos de hidrólisis, PHFB₁ y HFB₁. Para ello en el caso de fumonisina B₁ parcialmente hidrolizada, los eluidos fueron analizados luego por cromatografía en gradiente y fase móvil ajustada a pH 6,0. En los tres muestras de copos analizadas se encontraron niveles no detectables de PHFB₁ y HFB₁. O sea que en el proceso de elaboración de los copos ninguno de estos dos derivados se forman o si lo hacen no son estables.

La evaluación de la presencia de las toxinas unidas, tal como fuera planteado en el punto anterior, reviste importancia para conocer el verdadero riesgo total que pueda tener la ingesta de un alimento susceptible de estar contaminado con fumonisinas libres y sus compuestos derivados unidos a la matriz.

IV.2.2.1. Mejoras del método de limpieza de fumonisinas libres para la determinación de TBFB₁

Se realizaron algunas modificaciones a la técnica original de Park y col. (2004) para la determinación de TBFB₁ con el fin de mejorar la recuperación y disminuir los problemas en la extracción relacionados con la formación de un gel después de la hidrólisis con KOH 2 M. También se buscó reducir el tiempo de análisis.

En principio, Park y col. (2004) propusieron, con el fin de eliminar las fumonisinas libres de los copos de maíz, antes del análisis de PBFB₁ y TBFB₁, 4 extracciones con acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50, v/v/v) y dos lavados con agua de 30 minutos cada uno. Por lo tanto se testeó la eficiencia de los lavados para poder eliminar alguno de los pasos y así reducir el tiempo de realización de la técnica. Se fortificaron 10 g de copos de maíz con 245 ng/g de FB₁ y se sometieron los distintos líquidos de lavado a una limpieza por columna de IAC para chequear qué porcentaje de FB₁ libre respecto del nivel inicial de contaminación se recuperaba en los distintos lavados (Tabla 51).

Tabla 51. Concentración y recuperación de FB₁ (ng/g) en los líquidos de lavado

Número de lavados	Recuperación porcentual de FB ₁	Concentración de FB ₁ ⁽²⁾ (ng/g)
Tercera extracción ⁽¹⁾	7,8	12,3
Cuarta extracción ⁽¹⁾	2,3	< LQ ⁽³⁾
Agua	0,04	< LQ ⁽³⁾

(1) Extracción con acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50, v/v/v)

(2) Concentración calculada considerando la mayor concentración de FB₁ determinada en los copos de maíz analizados (158 ng/g)

(3) Menor al límite de cuantificación (10 ng/g)

En la cuarta extracción con acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50, v/v/v) y en el lavado con agua se determinaron bajos porcentajes de FB₁. Se eligió realizar solamente tres extracciones con acetonitrilo: metanol: agua y una con agua en todos los análisis de PBFB₁ y TBFB₁ en copos de maíz, en lugar de cuatro extracciones con acetonitrilo: metanol: agua y dos lavados con agua.

IV. 2.2.2. Determinación de las condiciones de hidrólisis adecuadas para el análisis de las fumonisinas unidas totales (TBFB₁) en copos de maíz para estudios *in vitro*

El agregado de KOH 2 M a los cereales para desayuno producía la aparición de un gel que generaba dificultades en las extracciones y en la limpieza de los extractos, generando como consecuencia bajas recuperaciones, 32,5 ± 13,4 % de recuperación a un nivel de fortificación de 400 ng/g HFB₁. Los copos de maíz contienen entre 89 y 90 % de maíz y aproximadamente un 77 % de almidón; es de esperar que la gelatinización de la muestra se produzca como consecuencia del agregado de KOH y la incubación a 60 °C en la etapa de hidrólisis. Cuando se trataron con KOH, los “dunks” (alimento a base de maíz que contiene avena y un alto contenido de azúcar), se observó la aparición de un gel mucho más difícil de extraer que en el caso de los copos de maíz; por el contrario cuando se efectuó el mismo tratamiento sobre “corn pops” que tienen un menor contenido de maíz (74 %), en consecuencia menos almidón, se observó una menor gelificación y una mejor recuperación respecto a los

copos de maíz. Es necesario tener en cuenta que al tratar el almidón con agua caliente aparecen dos fracciones, el componente más soluble, la amilosa que se disuelve y la amilopectina que permanece insoluble. En los cereales, la amilosa representa del 10 al 20% y la amilopectina del 80 al 90% del almidón total. Además se sabe que una solución de KOH 0,2 M puede usarse como pregelificador del almidón o para dispersar las fracciones cristalinas del mismo cuando se usa en concentraciones cercanas a 2M (Hoseney, 1994).

Diversos autores han manifestado que los procedimientos de extracción que han sido desarrollados para el análisis de maíz pueden no ser adecuados para los alimentos procesados a base de maíz (De Girolamo y col., 2001b; Kim y col., 2002, Scott y Kim., 2001; Scott y Lawrence, 1994). Meister (2001) describió problemas de limpieza de los extractos provenientes de muestras de copos de maíz hidrolizadas con KOH 1 M y calentadas a reflujo y advirtió sobre dificultades en la evaluación de los cromatogramas debido a la presencia de picos interferentes al tr. de HFB₁, atribuibles al almidón gelatinizado y a las proteínas de la matriz.

Con el objeto de mejorar la recuperación de las fumonisinas debido a las dificultades que se presentaban durante el desarrollo de la técnica por la gelatinización del almidón se incubaron los copos de maíz lavados con amilasa o pancreatina previo a la hidrólisis. En estas condiciones tampoco se obtuvo una mejoría en la recuperación. En otro intento por disminuir la gelatinización de la muestra, luego del agregado del álcali, se redujo la concentración de KOH a 1,2 M y se probó la hidrólisis con distintos volúmenes del álcali. Los copos de maíz se fortificaron con HFB₁ 400 ng/g luego del lavado y antes de la hidrólisis (Figura 56, Posición A). Cuando la hidrólisis se realizó con 15 ml de KOH 1,2 M se producía una menor gelatinización de la muestra y en consecuencia resultaba más fácil el pasaje por la columna OASIS del extracto obtenido (Tabla 52). A pesar de estos cambios las recuperaciones no superaron el 45 %.

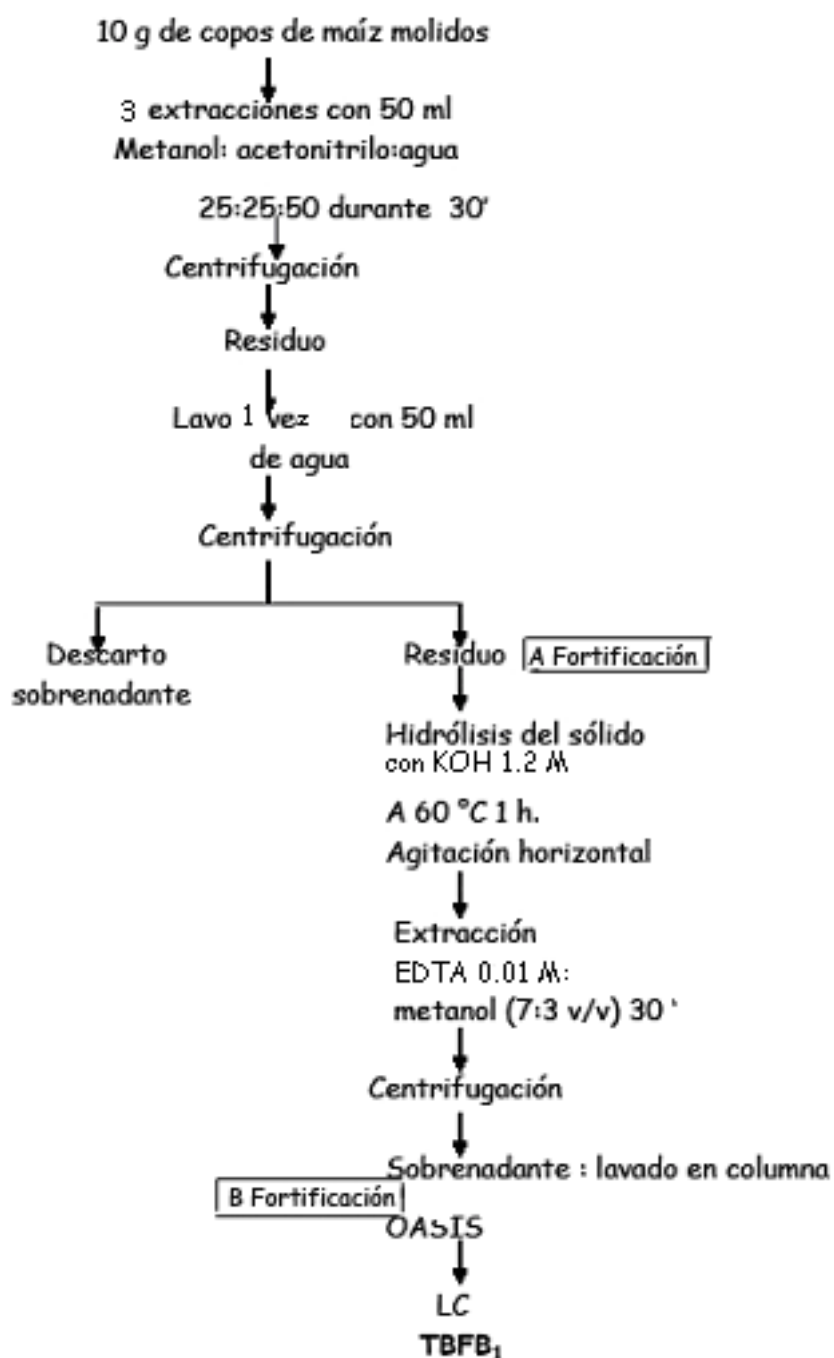


Figura 56. Puntos de fortificación con HFB₁ (A y B) en la técnica de TBFB₁

En cambio la recuperación, fue del 96 %, cuando se fortificó el extracto de los copos a un nivel de 47 ng/ml de HFB₁ (Figura 56, posición B) justo antes de la columna OASIS. Las diferentes recuperaciones observadas, según donde se realiza la fortificación de la muestra, permite presuponer que existe un efecto matriz sobre la extracción, lo que puso en evidencia la necesidad de mejorar aún más las condiciones de extracción o sea las etapas comprendidas entre la Posición A y B de la Figura 56.

Tabla 52. Recuperaciones obtenidas luego de hidrolizar con distintos volúmenes de KOH 1,2 M una muestra de copos de maíz previamente lavados y fortificados con HFB₁ 400 ng/g

Volumen KOH 1,2 M ml	Recuperación % (número repeticiones)
10	32 (n = 1)
15	41 ± 13 (n = 5)
25	45* (n = 1)

* presentaba dificultades en la centrifugación y pasaje por columna

Para evaluar si el problema era por la matriz se realizó la siguiente prueba:

Se comenzó todo el proceso sin la utilización de copos de maíz y se compararon los resultados cuando se fortificaba con niveles similares a los encontrados en los copos de maíz. Estas experiencias se hicieron con FB₁ y HFB₁ independientemente.

Se seleccionó el volumen de 15 ml KOH 1,2 M para realizar la hidrólisis y la extracción se efectuó con 50 ml de metanol: EDTA 0,01 M (3:7, v/v). Al fortificar con HFB₁ (187 mg/ml) o con FB₁ al nivel 186 ng/ml las recuperaciones fueron mayores al 72 % con HFB₁ y del orden del 41 % para FB₁ sin copos.

Mientras que con copos tanto los fortificados con FB₁ como HFB₁ presentaron recuperaciones del 41 %, valor similar encontrado cuando se fortificó con 400 ng/g en el experimento anterior con HFB₁ (tabla 52).

El resultado de estos experimentos, diferencias del 30% en la recuperación, evidenciaron que parte del problema se encontraba en la etapa de la hidrólisis de FB₁ a HFB₁.

Para analizar la etapa de extracción se intentaron utilizar otros sistemas de solventes. Cuando la extracción se realizó con otros solventes como acetonitrilo: metanol: agua (25:25:50, v/v/v) o metanol: agua (3:1, v/v) luego de la hidrólisis en las condiciones anteriormente descriptas, las recuperaciones no mejoraron (35 %).

El uso de EDTA: metanol (3:7, v/v) como solvente de extracción no pudo ser reemplazado por otros solventes ya que no se logró mejorar las recuperaciones;

posiblemente la utilización de EDTA como parte de la mezcla de extracción permite reducir la presencia de ciertos iones que interfieren en la extracción y producen un efecto matriz favoreciendo la unión de la toxina a la matriz extraída (Sydenham y col., 1992), especialmente el hierro como se mencionó anteriormente en esta tesis. Dombrink-Kurtzman y Dvorak (1999) también tuvieron problemas cuando evaluaron la recuperación de FB₁ y HFB₁ en tortillas de maíz elaboradas por nixtamalización e indican que el alto pH del proceso induciría la ionización de los grupos oxhidrilos del almidón y por otro lado señalaron que posiblemente, la unión de HFB₁ a la matriz (efecto matriz) fuera la causante.

Luego, con el fin de mejorar la recuperación de HFB₁ (Figura 57) se propuso aumentar el número de extracciones tal como fuera descrito para heces de mono por Shephard y col. (1994b) y Sydenham y col. (1995). Se aumentó el número de extracciones de una a tres veces con 50 ml de metanol: EDTA 0,01 M (3:7, v/v), para ello se fortificaron con 200 ng/g de HFB₁, 10 g de copos de maíz previamente lavados y luego se hidrolizó con KOH 1,2 M.

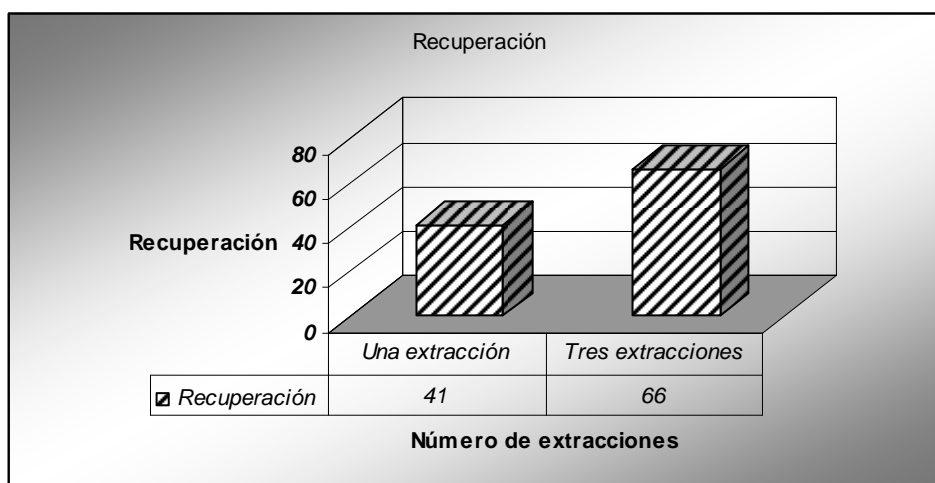


Figura 57. Recuperación de HFB₁ con 1 ó 3 extracciones con metanol: EDTA 0,01 M (3:7, v/v) luego de la hidrólisis con KOH de copos de maíz lavados

Los valores obtenidos mostraron una mejora en la recuperación cuando se realizaron tres extracciones (66 ± 2,6 %; n=3 vs. 41 ± 13 %; n=5).

Una vez mejorada la recuperación, al incrementar el número de extracciones, se buscó mejorar las condiciones de hidrólisis (Figura 58). Luego de los lavados para eliminar las fumonisinas libres de los copos de maíz se fortificaron con las dos micotoxinas (FB₁ 120 ng/g y HFB₁ 200 ng/g) en paralelo y se realizó la hidrólisis con KOH 1,2 M. Se compararon los resultados cuando la incubación fue de una hora a 60 °C y de 24 hs a 25 °C y posterior extracción, tres veces con metanol: EDTA 0,01 M (3:7, v/v). El agregado de HFB₁ en una muestra permite contar con un control de la extracción y al comparar con los resultados de FB₁ luego de hidrolizada, tener una evaluación del proceso de hidrólisis.

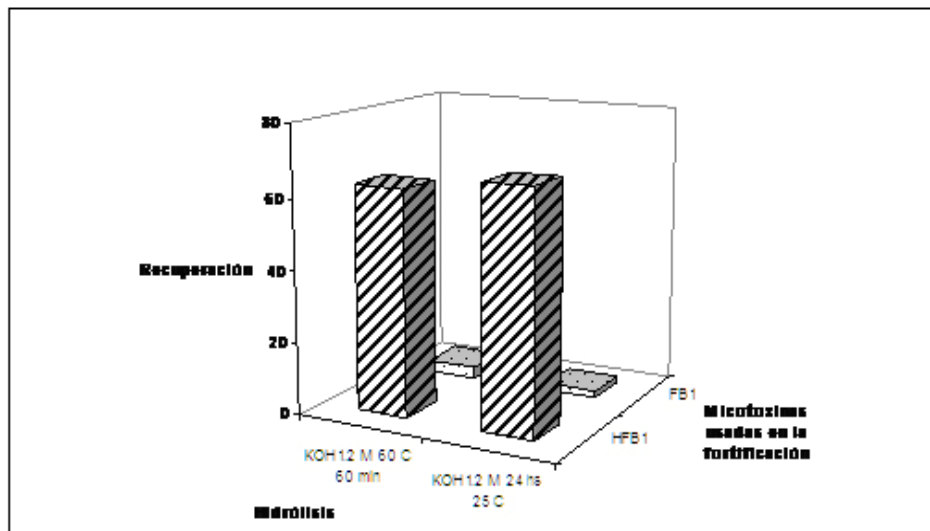


Figura 58. Recuperación de HFB₁ de copos de maíz fortificados con FB₁ o HFB₁ luego de la hidrólisis con KOH en dos condiciones distintas y luego de tres extracciones con metanol: EDTA 0,01 M 3:7 y posterior limpieza con columna OASIS

Se observó que en las dos condiciones de incubación, cuando se fortificaron los copos de maíz con HFB₁, las recuperaciones fueron entre 63 y 67 %; en cambio cuando la fortificación de los copos se realizó con FB₁, la recuperación de HFB₁, medido como FB₁ equivalente, no superó el 3 %. O sea no se producía la hidrólisis de FB₁ en esas condiciones. Para mejorar esta etapa se probaron distintas soluciones para la hidrólisis (Figura 59).

Se fortificó con FB₁ y se usaron distintas concentraciones de KOH, un buffer de KCl - NaOH y Ca (OH)₂. La mayor hidrólisis se obtuvo con KOH 4 M.

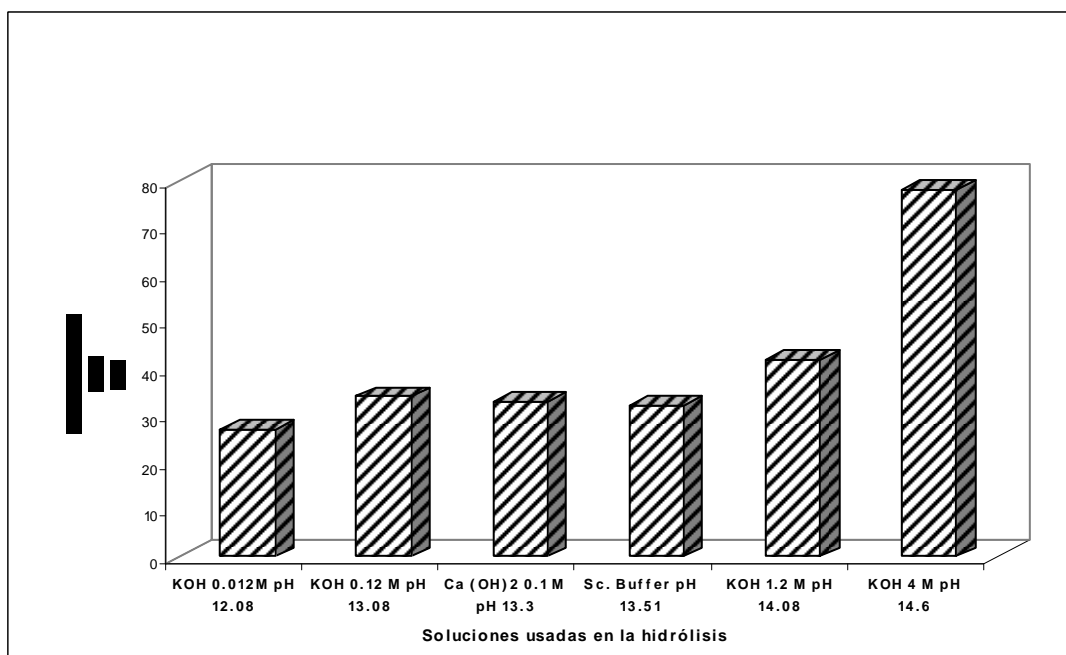


Figura 59. Recuperación de FB₁ equivalente de copos de maíz fortificados con FB₁ luego de la hidrólisis con KOH en distintas condiciones y con otras soluciones, luego de tres extracciones con metanol: EDTA 0,01 M 3:7 y posterior limpieza con columna OASIS.

Para confirmar estos resultados se seleccionaron para su análisis la concentración 4M de KOH, una menor 1,2 M y la solución de Ca(OH)₂ que era recomendada en numerosos trabajos. En este caso se hicieron controles con HFB₁. Se incubaron en paralelo los copos fortificados con 200 ng/g de HFB₁ y 120 ng/g de FB₁ en KOH 1,2 M, KOH 4 M ambos 60 minutos 60 °C y Ca (OH)₂ 0,1 M durante 2 horas (Sydenham y col., 1985) a temperatura ambiente (Figura 60).

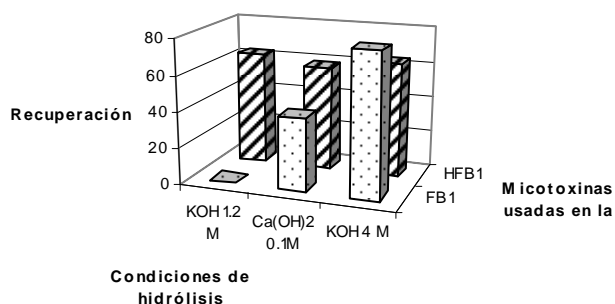


Figura 60. Recuperación de FB₁ equivalente de copos de maíz fortificados con FB₁ y HFB₁ luego de la hidrólisis con KOH en dos concentraciones y con Ca (OH)₂, luego de tres extracciones con metanol: EDTA 0,01 M 3:7 y posterior limpieza con columna OASIS

Se obtuvieron recuperaciones del 78 % de HFB₁ luego de la hidrólisis con KOH 4 M de copos de maíz fortificados con FB₁, que fue del mismo orden de magnitud que el obtenido cuando se fortificaba con HFB₁; por lo que esas fueron las condiciones elegidas para la hidrólisis para la determinación de TBFB₁; es decir tres extracciones con metanol: EDTA 0,01 M (3:7, v/v) e hidrólisis con KOH 4 M. Se ajustó el volumen de esta nueva concentración de KOH, de la misma manera que se obtuvo la Tabla 52 y se eligió 20ml de KOH 4 M como volumen de esta solución para la hidrólisis de TBFB₁

IV.2.3. Evaluación de los efectos de la digestión *in vitro* de las fumonisinas contaminantes de copos de maíz

Shephard y col. (1994c) realizaron estudios toxicocinéticos con ¹⁴C FB₁ en monos y observaron que el 61 % de la radioactividad aparecía en heces y determinaron por HPLC la presencia de FB₁, PHFB₁ y el aminopentol (HFB₁). La presencia de fumonisinas unidas en los copos de maíz analizados y los resultados mencionados de Shepard y col. (1994c) y también los de Schier (2000) que se comentaran posteriormente, llevó a estudiar de la bioaccesibilidad de las fumonisinas presentes a través de un modelo de digestión "*in vitro*".

El esquema de los posibles efectos de la digestión sobre las fumonisinas contaminantes en los copos de maíz se describe en la Figura 61. Esto permitió identificar las técnicas y realizar la puesta a punto de las mismas para el análisis en el quimo de FB₁, PHFB₁, HFB₁, TBFB₁ y así poder determinar la bioaccesibilidad de las micotoxinas presentes en los copos de maíz luego de la digestión.

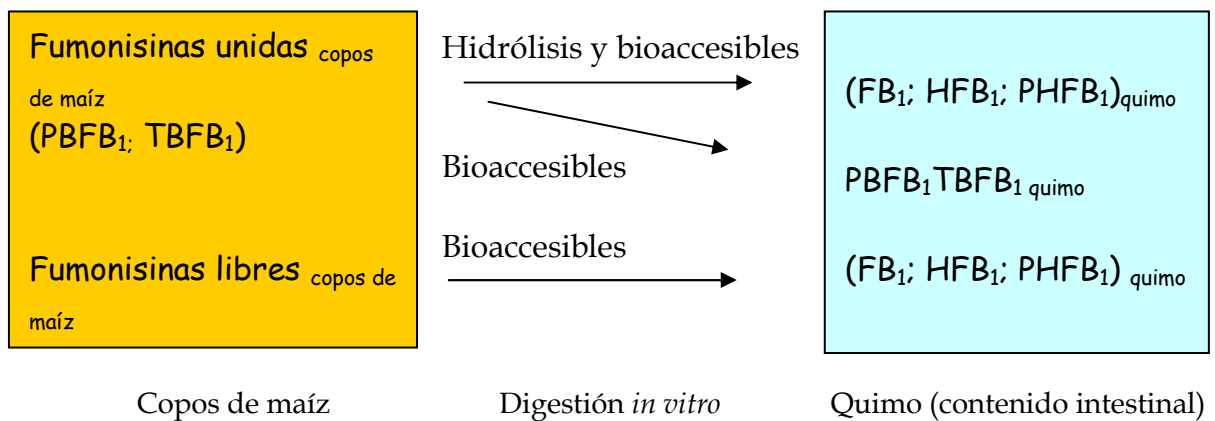
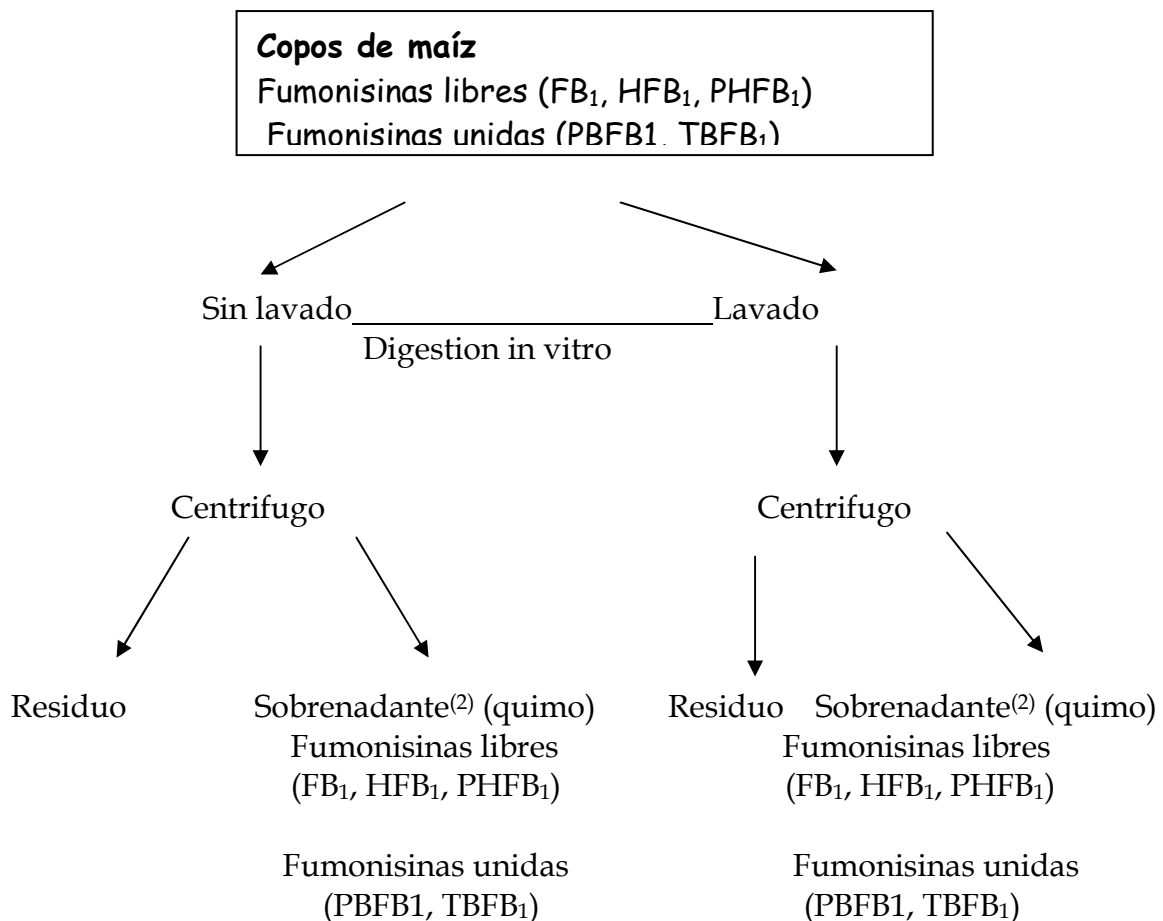


Figura 61. Esquema hipotético que muestra el posible efecto de la digestión “*in vitro*” sobre las fumonisinas libres y unidas en copos de maíz

IV.2.3.1. Puesta a punto de las técnicas de análisis en el quimo

La digestión “*in vitro*” podría tener hipotéticamente distintos efectos sobre las fumonisinas contaminantes en los copos de maíz (Figura 62). Por un lado, las fumonisinas libres luego de la digestión podrían quedar bioaccesibles (presentes en el quimo) y a su vez las fumonisinas unidas podrían ser sustrato de las enzimas intervinientes en la digestión o por acción de los microorganismos (no incluidos en este modelo de digestión “*in vitro*”) ser hidrolizadas para generar fumonisinas libres. Los primeros experimentos se realizaron con una muestra de copos de maíz con una concentración de fumonisinas unidas totales (TBFB₁) bajas, con el fin de reducir al mínimo la posibilidad que la contribución al estudio de recuperación proviniera de las fumonisinas unidas y así poner a punto las técnicas para el análisis de los productos de hidrólisis en el quimo. Para poder conocer el origen de las fumonisinas libres y sus productos de hidrólisis luego de la digestión, se trabajó con copos de maíz lavados con solventes y sin lavar.



- (1) La presencia de fumonisinas libres en el sobrenadante luego de la digestión (quimo) indica la cantidad que puede quedar bioaccesible ya sea proveniente de las fumonisinas libres y/o de las fumonisinas unidas
- (2) La presencia de fumonisinas libres en el sobrenadante luego de la digestión (quimo) indica la cantidad de que queda bioaccesible proveniente de las fumonisinas unidas unicamente

Figura 62. Esquema experimental general para determinar el origen de las fumonisinas que quedan bioaccesibles (quimo)

Los mismos métodos de análisis en copos de maíz para la determinación de FB₁ se utilizaron en el quimo. 10 ml de quimo previamente diluído con PBS, se pasaron por una columna VICAM. En el caso de HFB₁, se utilizó para la limpieza una columna SPE, Varian HF C₁₈ (3 cc).

Los primeros experimentos (Figuras 63 a y b) de digestión “*in vitro*” mostraban que si se fortificaban los copos de maíz molidos con 147 ng/g de FB₁, con niveles de FB₁ previo a la digestión de 15 ng/g (FM4), se obtenía una recuperación de FB₁ en el

quimo mayor al 100 %. En el análisis de muestras sin fortificación previa de los copos de maíz sometidos a la digestión “*in vitro*”, aparecía un pico al tiempo de retención de FB₁ o cercano al tr. de FB₁ que arrojaba una concentración de supuestamente FB₁ mayor a la determinada en los copos previo a la digestión.

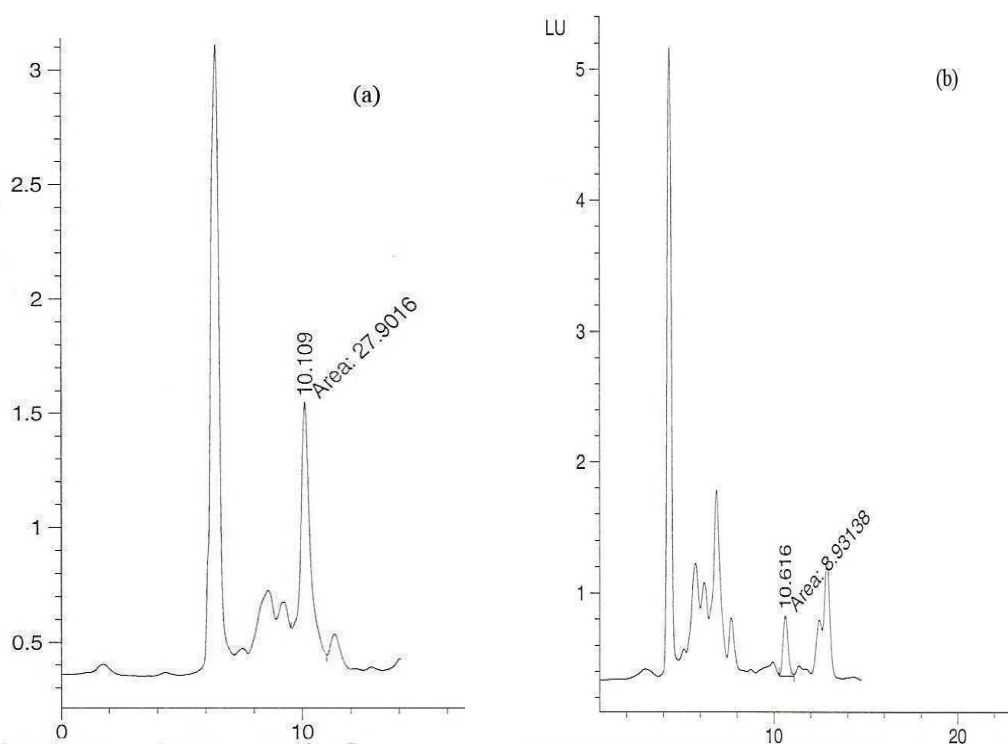


Figura 63. HPLC después de la limpieza en columnas de inmunoafinidad de copos de maíz digeridos

- a) fortificados con 147 ng FB₁/g
- b) no fortificados

Esto podría indicar por un lado la presencia de fumonisinas unidas a la matriz y que luego de la digestión fueron liberadas como fumonisinas libres en el quimo o por el otro, la probabilidad de la presencia de sustancias interferentes que corrían al tiempo de retención de FB₁ (tr. =10,609min.) ó HFB₁ (12,444 min.). Un factor que puede determinar las sustancias interferentes es que durante el tratamiento enzimático de una muestra contaminada podrían generarse productos de hidrólisis fluorescentes que interfieren en el análisis por HPLC o también que las mismas enzimas, debido a

la presencia de grupos amino en la molécula, podrían reaccionar con OPA e interferir en el análisis por HPLC. Estudios anteriores de Chawnua, (2000) describen la presencia de sustancias interferentes al tr. de HFB₁, cuando realizó un tratamiento con α amilasa previo a la extracción de copos de maíz. Por lo tanto, para descartar la posible presencia de sustancias interferentes (Paepens y col., 2005), se realizaron experimentos tendientes a determinar si alguno de los componentes de los líquidos digestivos podría causar esas interferencias en el análisis por HPLC.

Entre las enzimas usadas en la digestión se encuentran la α amilasa, componente de la saliva; la pancreatina y lipasa componentes del jugo duodenal y la pepsina, componente del jugo gástrico. La pancreatina es una mezcla de enzimas que proviene del páncreas de cerdo que incluye α amilasa, tripsina, proteasa, ribonucleasa y lipasa. Por lo tanto, el agregado de estas enzimas que tienen naturaleza proteica a los copos de maíz en los experimentos de digestión, podría ser la causa de las interferencias encontradas, que resultan en recuperaciones mayores al 100%.

Se diluyeron 10 ml de cada líquido digestivo (saliva, jugo gástrico, jugo duodenal y bilis) con 40 ml de PBS (buffer fosfato salino) y se sometieron a limpieza con columna Vicam para determinar por HPLC y fluorescencia (FD) si presentaban interferencias al tr de FB₁ o HFB₁. En el análisis por HPLC-FD se observó en algunos líquidos (saliva, jugo gástrico y bilis), la presencia de pequeños picos (cercanos al tr. de FB₁ y HFB₁) que fueron considerados como interferentes (Figura 64).

El líquido duodenal presentó la mayor interferencia que se observa en el cromatograma con dos picos con tiempos de retención correspondientes a los de FB₁ y HFB₁ (Figura 64c). En Figura 64e se encuentra el cromatograma del líquido duodenal sin pancreatina, en el que no se observa esa interferencia. Con el objeto de determinar qué componente enzimático del líquido duodenal interfería en el análisis por HPLC-FD, se analizaron por separado los componentes del mismo. Es decir, el líquido duodenal, el líquido duodenal sin lipasa y el líquido duodenal sin pancreatina. La limpieza del líquido duodenal se realizó por columna Vicam por el método ya descrito para los copos de maíz y luego fueron analizados por HPLC-MS.

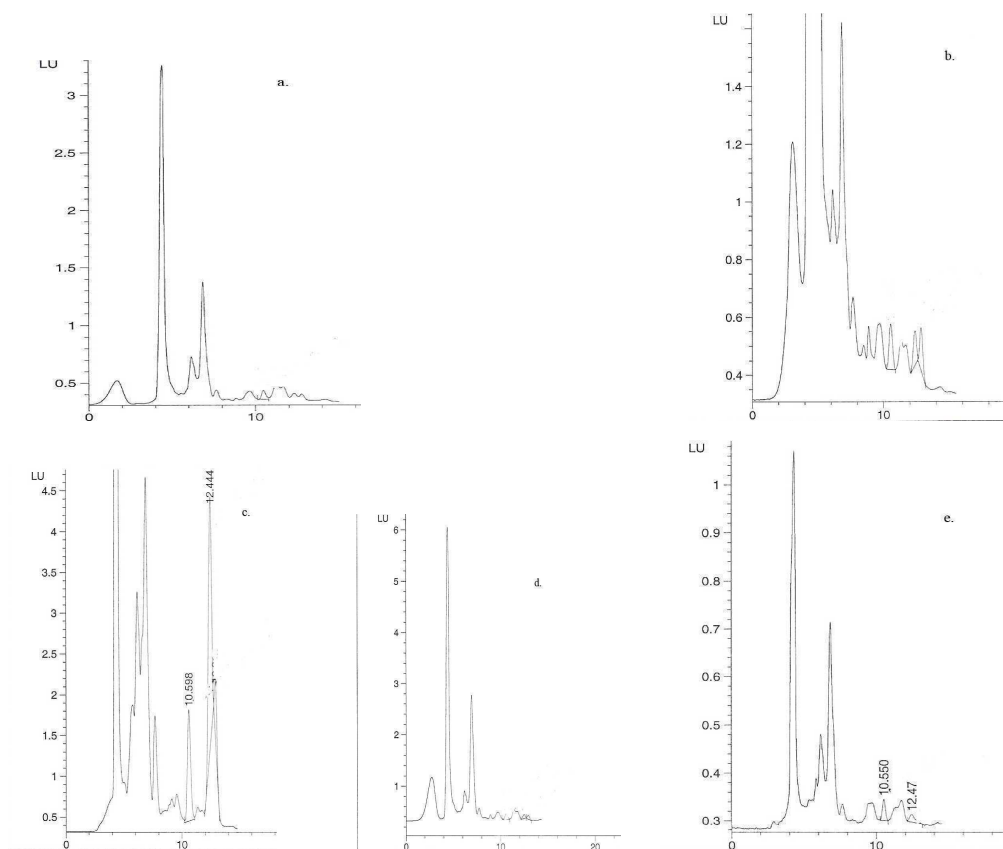


Figura 64: HPLC, fase móvil metanol-fosfato dihidrógeno de sodio 0,05 M (70:30, v/v) acidificada hasta un pH aparente de 3,3 con ácido ortofosfórico, después de la limpieza con columnas de inmunoafinidad de los distintos líquidos digestivos diluidos previamente en PBS preparados para la digestión *in vitro* : (a) saliva ; (b) jugo gástrico; (c) jugo duodenal; (d) bilis; (e) líquido duodenal sin pancreatina

En el análisis por masa se detectó en todos los casos la presencia de una interferencia con un retraso en el tiempo de corrida de 0,3 minutos respecto de FB₁ (Tabla 53, Figura 65) y no hubo interferencia para HFB₁.

Tabla 53. Resultados obtenidos de análisis por HPLC-MS del líquido duodenal, líquido duodenal sin pancreatina y líquido duodenal sin lipasa

Muestra	HPLC-Masa		
	HFB ₁	FB ₁	Interferencia (pg) (0,3 min posterior a FB ₁)
Jugo duodenal	n.d.	n.d.	10,4
Jugo duodenal sin pancreatina	n.d.	n.d.	12
Jugo duodenal sin lipasa	n.d.	n.d.	8

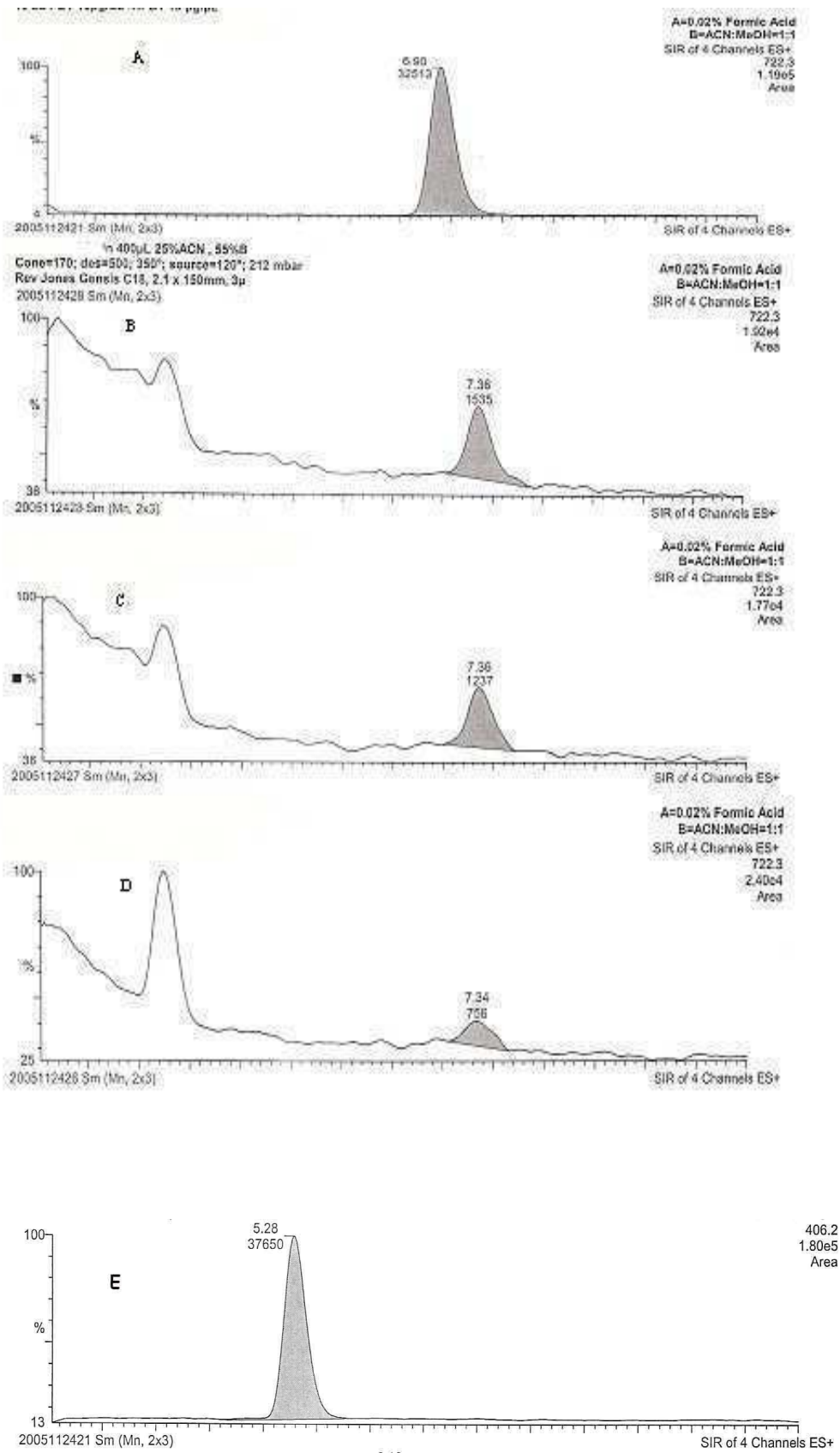


Figura 65. Cromatogramas por HPLC- Masa A) 10 pg/ul FB₁ (m/z = 722,3) B) Jugo duodenal (m/z = 722,3) ; C) Jugo duodenal sin pancreatina (m/z = 722,3); D) jugo duodenal sin lipasa (m/z = 722,3); E) 10 pg/ul HFB₁ (m/z = 406,4)

Estos resultados se obtuvieron trabajando con una pancreatina de Sigma Aldrich catálogo P 7545 (8 x especificaciones USP), por lo que debido a las interferencias encontradas en el cromatograma se probó una pancreatina de Sigma Aldrich catálogo P 8096 que reúne las especificaciones de la farmacopea de los Estados Unidos. Esta pancreatina y la incorporación de un paso previo de limpieza del quimo, que consistió en una extracción con 10 ml. de metanol, contribuyó a la disminución de interferencias.

IV. 2.3.2. Estudios realizados para analizar los efectos del modelo de digestión “*in vitro*” sobre la contaminación en copos de maíz

El esquema de métodos para el análisis de las fumonisinas luego de la digestión se describe sintéticamente en las tablas 54 y 55. En la primera de ellas se observan las toxinas esperables en los copos de maíz elegidos para las experiencias donde no se detectó HFB₁, ni PHFB₁, y el método de limpieza que se puede utilizar.

Tabla 54. Efecto de la digestión sobre los copos de maíz sin lavar y posibles contaminantes a obtener por elución en distintas columnas

Copos sin lavar (posible contaminación presente)	Luego de digestión (bioaccesible) (posible contaminación presente)	Columna inmunoafinidad	Columna OASIS	Hidrólisis quimo previo columna OASIS
FB₁-matriz (TB FB₁)	FB ₁ -matriz (unido a proteínas o almidón u otros componentes de la matriz) FB ₁ / PHFB ₁ / HFB ₁	nd FB ₁ y/ o PHFB ₁	nd HFB ₁	HFB ₁ HFB ₁
FB₁ libre	FB ₁ / PHFB ₁ / HFB ₁	FB ₁ y/ o PHFB ₁	HFB ₁	HFB ₁
HFB₁	HFB ₁	-	HFB ₁	HFB ₁

Si los copos de maíz se lavaran con tres extracciones de metanol: acetonitrilo: agua (25:25:50, v/v/v) y una con agua, se eliminarían las fumonisinas libres (FB₁ / PHFB₁ / HFB₁). Los posibles contaminantes y las metodologías de limpieza para los copos de maíz lavados están descritos en la Tabla 55.

Tabla 55. Efecto de la digestión sobre los copos de maíz lavados y posibles contaminantes a obtener por elución en distintas columnas

Copos lavados (posible contaminación presente)	Luego de digestión (bioaccesible) (posible contaminación presente)	Columna inmunoafinidad	Columna OASIS	Hidrólisis quimo previo columna OASIS
FB ₁ -matriz	FB ₁ -matriz (unido a proteínas o almidón u otros componentes de la matriz)	nd	nd	HFB ₁
	FB ₁ / PHFB ₁ / HFB ₁	FB ₁ y/ o PHFB ₁	HFB ₁	HFB ₁

En la Tabla 56 se resumen las contaminaciones presentes en las muestras elegidas para el estudio. La muestra FN12 presentaba una alta concentración de FB₁ libre (promedio 125 ng/g) y TB FB₁ (promedio 92 ng/g) y la FN11 que presentaba cuatro veces menos FB₁ (promedio 29 ng/g) y no se detectó TBFB₁. Las concentraciones de PBFB₁ en ambos copos no superaron los 25 ng/g.

Tabla 56. FB₁ libre, PHFB₁, HFB₁, FB₁ unida a proteína (PB FB₁) y FB₁ unida total (TB FB₁) en copos de maíz, corregido por recuperación

Muestra	FB ₁ libre (ng/g)		HFB ₁	PHFB ₁	PB FB ₁ ⁽¹⁾	TB FB ₁ ⁽¹⁾ (ng/g)	
	Promedio	Rango				Promedio	Rango
FN11	29 (n=2)	26 - 32	nd ⁽²⁾	nd	13 (n=1)	23 (n=3)	nd ⁽³⁾ - 24
FN12	125 (n=3)	91 - 158	nd	nd ⁽⁴⁾	25 (n=1)	92 (n=3)	57 - 124

(1) Niveles corregidos multiplicando por 1,78 (Relación de peso molecular 721/405) para obtener el equivalente en FB₁

(2) No detectable (por debajo del límite de detección de 5 ng/g)

(3) No detectable (por debajo del límite de detección de 15 ng/g)

(4) No detectable (por debajo del límite de detección de 40 ng/g)

Las condiciones elegidas para los ensayos utilizan 4,5 g muestra. Ambos copos de maíz se sometieron separadamente a la digestión *in vitro* y por centrifugación se separó el líquido sobrenadante o quimo. Después de la limpieza del extracto metanólico del quimo proveniente de FN12 en la columna IAC se analizó por HPLC usando una fase

móvil de pH 6,0. Se detectó un pico al tiempo de retención de FB₁ (Figura 66); en el caso del quimo proveniente de FN11 no se recuperó FB₁ del quimo no fortificado (Figura 67). En ambos cromatogramas, se observó la presencia de un pico que corresponde a un compuesto no identificado a un tr. =22,118 min., probablemente proveniente de la matriz digerida.

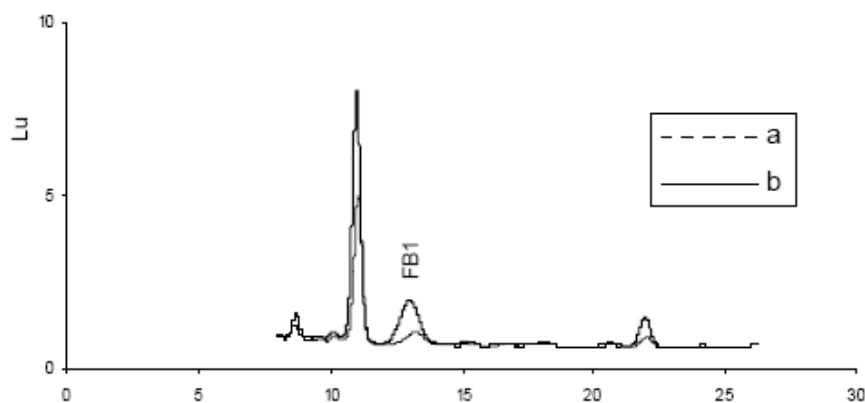


Figura 66. Cromatograma por HPLC después de la limpieza con columna IAC (a) FB₁ del quimo no fortificado obtenido de copos de maíz FN12; (b) FB₁ recuperado del mismo quimo fortificado con 290 ng/g de FB₁

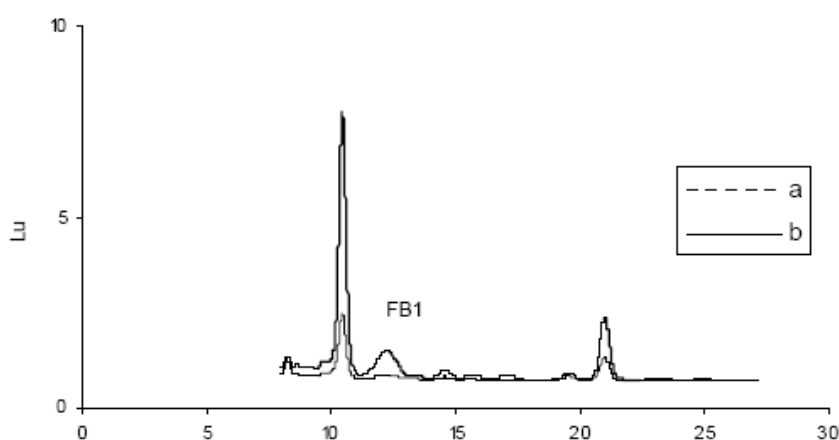


Figura 67. Cromatograma por HPLC después de la limpieza con columna IAC (a) extracto de quimo no fortificado de FN11; (b) FB₁ en quimo recuperado de FN11 fortificado con 138 ng/g de FB₁ antes de la digestión.

Cuando se realizó la limpieza del quimo (FN12) fortificado con HFB₁ en columna OASIS y acidificado a pH 3,6 se observó un pico correspondiente a los tiempos de retención de HFB₁ (tr. =25,826 min.), con una recuperación del $86,0 \pm 10,6 \%$ (n=3) (Figura 68).

Los extractos metanólicos del quimo de FN11, fortificados con el hidrolizado de FB₁, que contenían HFB₁ y los isómeros de PHFB₁ (tr. =16,630 min. y tr. 19,311 min.) sometidos a limpieza con columna Vicam, mostraron recuperaciones bajas entre el 12-20% para PHFB₁,

señalando nuevamente las dificultades técnicas que se pueden presentar por el llamado efecto matriz. Se observó, además cuando se superpone el cromatograma con el obtenido del quimo de FN11 sin fortificación, la presencia de una interferencia cercana al tr de FB₁ (tr. =10,830 min.) (Figura 69).

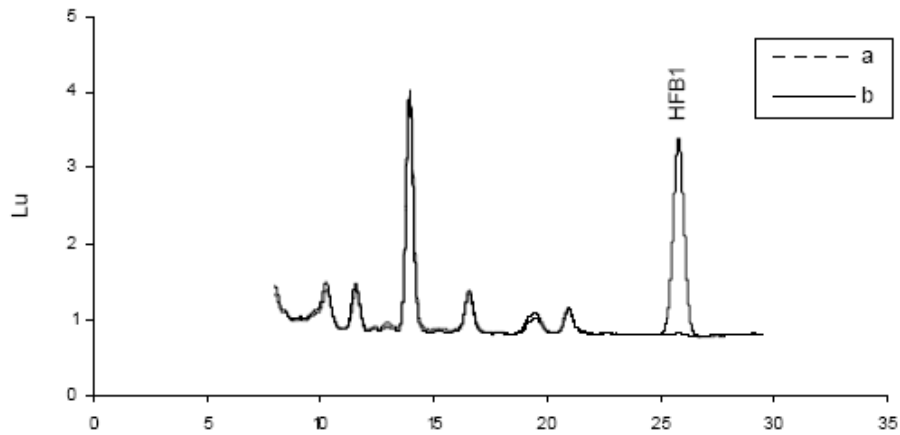


Figura 68. Cromatograma por HPLC después de la limpieza con columna OASIS de (a) extracto de quimo no fortificado de FN12; (b) HFB1 recuperado del mismo quimo fortificado con 444 ng/g de HFB1

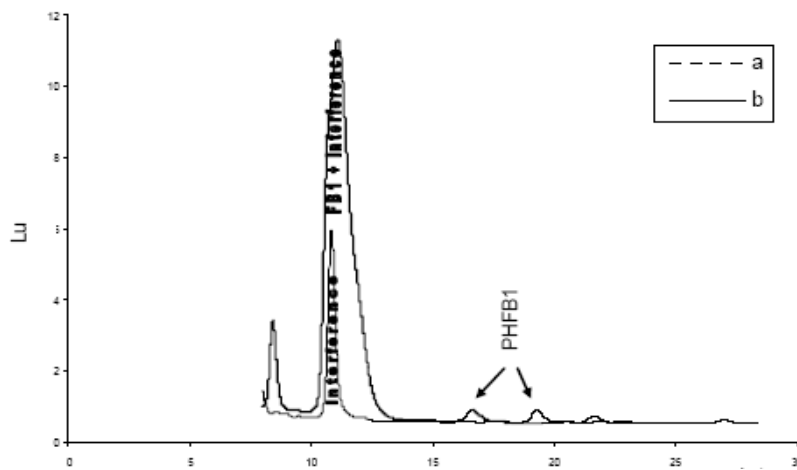


Figura 69. Cromatograma por HPLC después de la limpieza con columna IAC de (a) extracto de quimo no fortificado obtenido por digestión de copos de maíz FN11; (b) PHFB1 recuperado del mismo quimo fortificado con PHFB1

Las interferencias fueron atribuidas a sustancias con grupo amino primario, generalmente aminoácidos y péptidos que deben ser de cadena corta disponibles para reaccionar con OPA para ser detectados por la columna de HPLC que se utilizó para este trabajo.

Luego de los experimentos de digestión *in vitro*, se analizó el quimo para conocer si algo de FB₁ inicial o sus productos de hidrólisis habían quedado bioaccesibles. Todos los experimentos se realizaron en paralelo con controles de recuperación de FB₁ y sus productos de hidrólisis.

En el caso de FB₁ se determinó que la concentración de FB₁ liberada en el quimo fue menos del 50 % de la presente inicialmente en los copos de maíz (contaminación inicial o inicial más fortificada). Lo que significa por un lado que no toda la FB₁ contaminante (Tabla 57) queda bioaccesible y por el otro lado que probablemente no se hidrolizan las fumonisinas unidas en las condiciones del modelo de digestión "*in vitro*"; más aún considerando que HFB₁ y PHFB₁ no fueron detectadas en el quimo de la digestión de los copos de maíz FN11 y FN12.

Para poder determinar el origen de la FB₁ que quedó bioaccesible en el quimo (o sea si parte provenía de la hidrólisis de TBFB₁) se realizaron dos lavados de los copos con acetoneitrilo: metanol: agua (25:25:50,v/v/v) y un lavado con agua previo a la digestión (n=6). En esas condiciones se muestra en la Figura 70, la contaminación promedio de FB₁ en los copos de maíz de la muestra FN11, la contaminación de FB₁ presente en el quimo luego de la digestión de los copos de maíz y la concentración de FB₁ en el quimo luego de la digestión de los copos lavados. Como se puede ver no fue detectada FB₁ en el quimo en este último caso. Esto indica que la FB₁ que quedó bioaccesible en el quimo en los experimentos realizados sin el lavado o extracción previa con solventes, no provenía de las fumonisinas unidas totales.

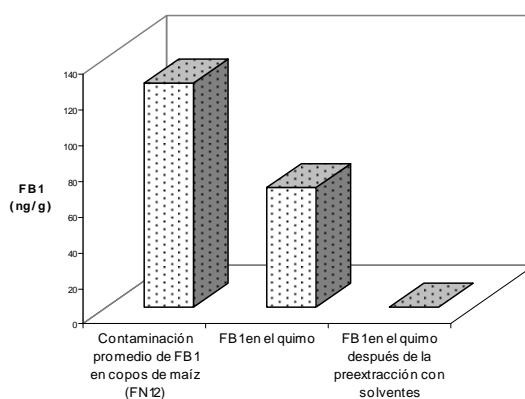


Figura 70. Concentración de FB₁ proveniente de los copos FN12, en el quimo antes y después de lavar previamente con solventes

Tabla 57. Concentración de FB₁ presente en los copos de maíz y agregada luego de la fortificación; FB₁ liberada en el quimo, después de la digestión in vitro, expresada como la cantidad liberada en el quimo y bioaccesibilidad (%)

Muestra	FB ₁ (ng/g)				FB ₁ liberado en el quimo (ng/g)		Bioaccesibilidad (%)	
	Promedio			Rango	Promedio	Rango	Promedio	Rango
	Inicial	Fortificada	Total					
FN11	29	196	225	167-363	102 n=5	32-239	41 n=5	9-66
FN12	125	0	125	92-158	67±20 n=7	47-98	53±16 n=7	38-78
FN12	125	199	334	221-420	103 n=7	18-226	31 n=7	8-54

Total= concentración inicial mas fortificación.

n= número de repeticiones.

La bioaccesibilidad fue calculada como la fracción o porcentaje de FB₁ que queda en el quimo respecto de la cantidad de FB₁ presente inicialmente en los copos más la fortificación realizada.

La baja bioaccesibilidad de FB₁ determinada mediante los experimentos de digestión en este trabajo y la observación que TBFB₁ no se hidroliza a FB₁ por efecto de la digestión “*in vitro*”, coinciden con los estudios realizados “*in vivo*” publicados en la literatura los cuáles muestran baja biodisponibilidad de FB₁ en monos y ratas cuando se administra FB₁ por vía oral o intramuscular (Sydenham y col., 1992; Shepard y col., 1994c y 1995). Es interesante destacar, al presentar resultados similares a los observados *in vivo*, que el modelo de digestión *in vitro* utilizado aporta un método sencillo para el abordaje de nuevas investigaciones.

IV.2.3.3. Estudios para determinar la bioaccesibilidad de TBFB₁

A pesar que FB₁ tiene baja biodisponibilidad, de 0 a 6 %, de acuerdo a lo observado en estudios toxicológicos “*in vivo*”, la presencia de esta micotoxina se relaciona con severas enfermedades en animales lo que lleva a considerar que existen otras formas de entrada de la micotoxina al organismo (paradoja de la fumonisina) (Galtier, 1998; Hopmans y col., 1997; Humpf y Voss, 2004). Si bien existen algunas evidencias experimentales con una línea de células intestinales Caco-2 que mostraron que FB₁ puede hidrolizarse a nivel intestinal por acción de las bacterias intestinales y que se absorbe mejor HFB₁; aún no ha sido posible determinar cómo FB₁ puede producir toxicidad, cuando la mayor parte de lo que es ingerido es eliminado en las heces.

Shier (2000) para explicar la paradoja de la fumonisina, planteó la posibilidad que algunos productos de reacción de las fumonisinas con los componentes de la matriz (fumonisinas unidas) obtenidas durante el procesamiento (cocción, extrusión, otros) podrían quedar biodisponibles después de la digestión. O sea la pregunta a plantearse es si los procesos tecnológicos influyen sobre el riesgo toxicológico. En el caso de los copos de maíz, durante el proceso de elaboración, se produce una disminución de la contaminación por fumonisinas libres en un 60 a 70 %. En los puntos anteriores se ha demostrado la presencia FB₁, PB FB₁ y de valores de TB FB₁ que superaban los valores de PB FB₁. Los resultados descriptos en el punto IV.2.3.2. muestran que en las condiciones del modelo de digestión *in vitro* el 50 % de la FB₁ presente como contaminante natural en los copos de maíz puede ser liberado de la

matriz hacia la luz del intestino delgado para ser absorbido y que la TBFB₁ presente no era hidrolizado (digerido) para dar FB₁.

Es así que, se hicieron otros experimentos con el objeto de determinar si TBFB₁ quedaba bioaccesible bajo las condiciones del modelo de digestión “*in vitro*”.

En otro ajuste de la metodología de hidrólisis se pudo reducir la concentración de KOH 4 M a 3M y el volumen de hidrólisis de 15 a 10 ml.

Se hidrolizaron 10 ml del extracto metanólico del quimo (proveniente de la digestión de copos de maíz lavados) con 10 ml de KOH 3 M durante 60 minutos a 60 °C y a 190 rpm y luego se realizó la limpieza en columna OASIS del extracto. De esta manera fue posible evaluar si las fumonisinas unidas (TBFB₁) quedaban bioaccesibles luego de la digestión “*in vitro*” o sea si era posible encontrar HFB₁.

Los estudios de recuperación para la determinación de TBFB₁ en el quimo, se realizaron mediante fortificación ya sea con FB₁ o HFB₁ en el quimo antes de la hidrólisis. (Tabla 58)

Tabla 58. Recuperación de FB₁ o HFB₁ a partir del quimo

Muestra	Micotoxina utilizada en la fortificación	Nivel de fortificación (ng/g)	Recuperación (%)
FN11	FB ₁	272	121
FN12	HFB ₁	127	149
FN12	HFB ₁	437	92

En las figuras 71 y 72 se pueden ver ejemplos de los cromatogramas que se obtuvieron en los análisis luego de la limpieza de la columna OASIS con sus de controles. En todos los casos fue posible cuantificar adecuadamente los compuestos ya que la metodología optimizada no presentó interferencias.

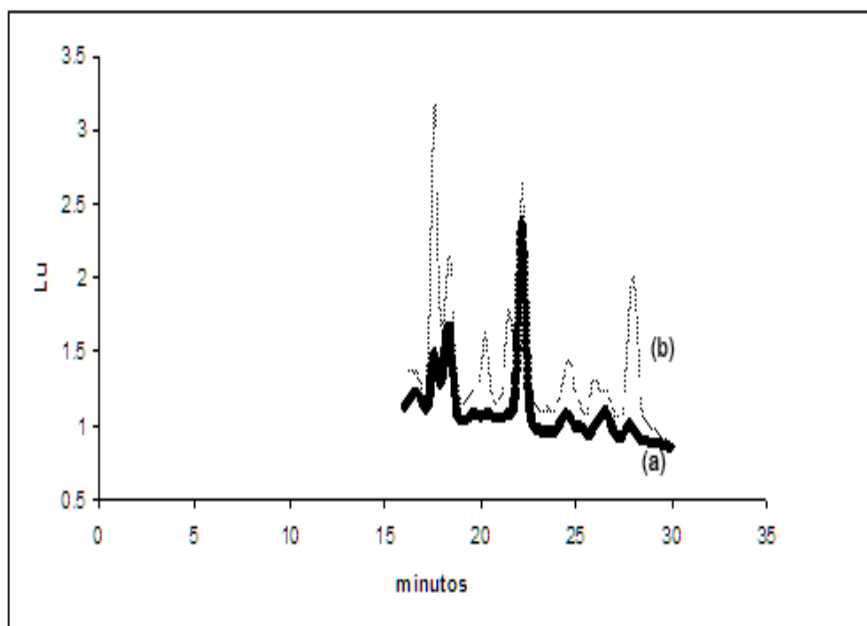


Figura 71. Cromatograma por HPLC después de la limpieza en columna OASIS del a) extracto del quimo hidrolizado con KOH 3 M, obtenido por digestión de copos de maíz (FN12) lavados, b) HFB₁ recuperado del mismo quimo fortificado con HFB₁ 437 ng/g

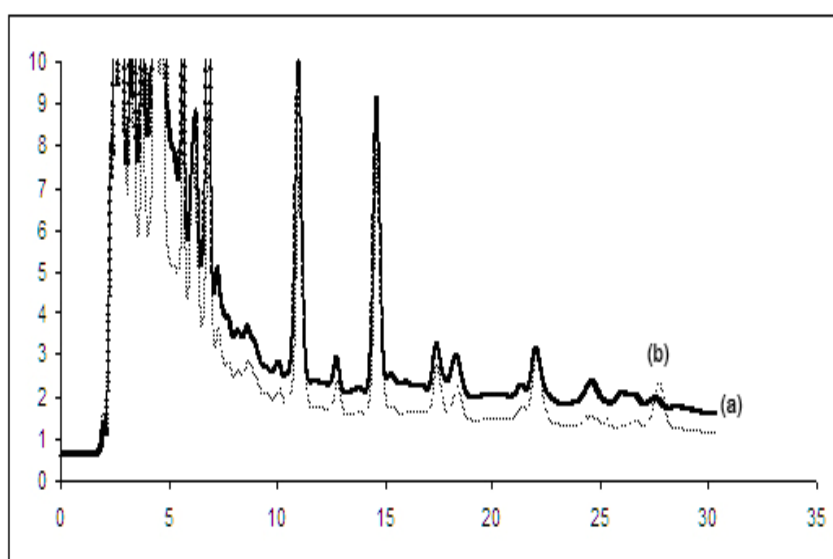


Figura 72. Cromatograma por HPLC después de la limpieza en columna OASIS del a) extracto del quimo hidrolizado con KOH 3 M, obtenido por digestión de copos de maíz (FN12) lavados, b) HFB₁ recuperado del mismo quimo fortificado con HFB₁ 127 ng/g

Cuando los copos de maíz (FN12) fueron extraídos con solventes para remover FB₁ libre antes de la digestión “*in vitro*” (n=6), FB₁, HFB₁ y PHFB₁ no fueron detectables en el quimo, indicando que las fumonisinas unidas totales no eran hidrolizadas a FB₁ en la digestión de los copos de maíz sin lavar (Tabla 59). Sin embargo, cuando el quimo analizado anteriormente fue sometido a hidrólisis con KOH 3 M, se detectó un promedio de FB₁ de 47,3 ± 8,1 ng/g en la muestra FN12. Se observó que la hidrólisis del quimo de una muestra de copos de maíz lavados (FN11) con bajos niveles de TBFB₁, no presentó niveles detectables de FB₁ libre o de FB₁ equivalente.

Tabla 59. FB₁ libre y TBFB₁ (expresado como FB₁ equivalente) liberadas en el quimo obtenido de copos de maíz lavados y digeridos en las condiciones del modelo de digestión “*in vitro*”

Muestra	FB ₁ libre (ng/g)	TBFB ₁ (ng/g) (*)
FN11	nd	nd
FN12	nd	59
FN12	nd	44,8
FN12	nd	46
FN12	nd	49
FN12	nd	50,5
FN12	nd	34,3

(*) niveles corregidos al multiplicar por 1,78 (relación de peso molecular 721 / 405) para obtener FB₁ equivalente

Los resultados de la muestra FN12 indicarían que algo de TBFB₁ quedaría bioaccesible para su absorción.

En la tabla 60 se presenta un resumen de los resultados y se determina que en el caso de FN12 la bioaccesibilidad de TBFB₁ fue del 51 %.

Tabla 60. FB₁ unida total (TB FB₁) de copos de maíz y del quimo luego de la digestión de copos de maíz lavados, corregido por recuperación

Copos de maíz	TB FB ₁ en copos de maíz ⁽¹⁾ (ng/g)		TB FB ₁ en quimo proveniente de copos de maíz ⁽¹⁾ lavados (ng/g)		Bioaccesibilidad (%)	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango	Promedio	Rango
FN11	23 n=3	nd-24 ⁽³⁾	nd ⁽⁴⁾		nc ⁽²⁾	
FN12	92 n=3	57-124	47 n=6	34-59	51 n=6	37-64

(1) Concentraciones (niveles) calculados como FB₁ equivalente

(2) no calculado

(3) no detectable (por debajo del límite de detección de 15 ng/g)

(4) no detectable (por debajo del límite de detección de 30 ng/g)

Es posible pensar que estas TBFB₁ que quedan bioaccesibles, de acuerdo a lo observado en los experimentos anteriores pueden contribuir al riesgo de ingesta de las fumonisinas o de sus productos derivados.

Además las TBFB₁ podrían ser sustrato de las bacterias anaerobias del intestino y ser hidrolizadas para dar FB₁, PHFB₁ o HFB₁ y contribuir así a incrementar la ingesta de la toxina o ser una fuente alternativa de exposición a la toxina (Shepard y col 1994b).

Dall 'Asta y col., 2008 desarrollaron un método indirecto para la determinación de fumonisinas unidas, mediante la cuantificación de HFB₁ por HPLC-masa, por hidrólisis con NaOH de distintas matrices alimenticias. Ellos informaron la presencia de fumonisinas unidas en productos que presentan un procesamiento moderado, tal como pan a base de maíz, pasta y tortas.

Los futuros estudios podrían estar orientados a determinar la contribución de TBFB₁ a la exposición de FB₁ en animales y humanos. Para ello será necesario conocer los niveles de TBFB₁ en distintos alimentos y poner a punto técnicas o métodos para cuantificar la presencia de fumonisinas unidas en otros alimentos.

V. CONCLUSIONES

- ❖ La presencia de OTA en las muestras plasmáticas indican que hay o hubo exposición a OTA en las dos zonas analizadas, y podrían considerarse representativas de la provincia de Buenos Aires.
- ❖ La puesta a punto de un método con una buena reproducibilidad y repetitividad para el análisis de OTA en plasma permitió evaluar el grado de exposición a la micotoxina.
- ❖ Hubo diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de OTA entre las dos poblaciones en todos los grupos etáreos. Solamente en General Rodríguez se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de OTA entre hombres y mujeres.
- ❖ La mayoría de los donantes de sangre en ambas poblaciones tuvieron concentraciones plasmáticas de OTA por debajo del valor estimado por JEFCA como tolerable, sin embargo 4,2 % de los donantes en General Rodríguez 1,5 % de los donantes en Mar del Plata presentaron concentraciones por encima de 7,25 ng/ml de OTA en plasma.
- ❖ Los alimentos ingeridos en mayor porcentaje o mayor cantidad que podrían contribuir a la ingesta de OTA fueron los cereales, aunque vino, cerveza, café e infusiones, deberían ser estudiadas con el objeto de identificar los alimentos contaminados con OTA causantes de esa exposición, y así controlar la contaminación y reducir el riesgo.
- ❖ Se analizaron las fumonisinas libres en los copos de maíz y en las mismas muestras no se encontraron fumonisinas hidrolizadas.
- ❖ Se determinaron todas las fumonisinas unidas y las ligadas a proteínas en todos los cereales para desayuno La concentración de TBFB₁ es mayor que

PBFB₁. Esto confirma el hecho que además de unirse las fumonisinas a las proteínas lo hace con los polisacáridos.

- ❖ Cuando se realizó la digestión *in vitro* de los copos de maíz se observó en el quimo FB₁ y no se detectó HFB₁ ni PHFB₁. TBFB₁ es liberada al quimo desde los copos de maíz luego de la digestión en un 51 %.
- ❖ La aparición de FB₁ libre en el quimo puede provenir de FB₁ o de TBFB₁ presentes en la muestra. Luego de la digestión de copos de maíz a los cuales se les extrajo previamente la FB₁ libre, no se detectó esta toxina en el quimo, comprobándose por primera vez que las fumonisinas unidas no se hidrolizan por las enzimas de los líquidos digestivos a fumonisinas libres.
- ❖ Se observó que la digestión *in vitro* de los copos de maíz liberaba en el quimo una cantidad de FB₁ equivalente al 54 % de la FB₁ libre presente inicialmente en los copos.
- ❖ La presencia de FB₁ y TBFB₁ proveniente de alimentos procesados en el quimo indica que pueden quedar disponibles para su absorción en el intestino. Esta confirmación de la presencia en el quimo es el primer paso para conocer la biodisponibilidad de la toxina y sus productos de unión a la matriz desde el alimento para su absorción en el organismo.
- ❖ Las dificultades técnicas para el estudio o análisis de toxinas en matrices biológicas se ven incrementadas por el hecho que las fumonisinas se pueden ligar fuertemente a la matriz. Se implementó metodología analítica para el análisis de FB₁, sus productos de hidrólisis y de las fumonisinas unidas en una matriz biológica (quimo) y se ajustaron las técnicas para el análisis de las fumonisinas unidas y parcialmente hidrolizadas en cereales para desayuno.

- ❖ Los niveles de contaminación por fumonisinas B₁, B₂ y B₃ de copos de maíz evaluados en Mar del Plata y la FB₁ en los cereales de desayuno analizados en Otawa fueron bajos.
- ❖ La exposición oscilaría entre 0% a 39.2% según el grupo etéreo considerado, teniendo en cuenta los datos de encuestas llevadas a cabo en Argentina, y la máxima contaminación de fumonisinas detectada en este trabajo.
- ❖ En este trabajo planteamos otras vías de estimar la exposición; por una parte la determinación de OTA en plasma, que nos lleva a la búsqueda de los alimentos contaminados por esta toxina. Y, por otra parte, y teniendo en cuenta la frecuencia de la contaminación por fumonisinas en alimentos, orientamos la búsqueda hacia la real biodisponibilidad de esta toxina en el hombre.

VI. REFERENCIAS

- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabanes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *J. Food Prot.* **66**, 504-506.
- Akhmeteli, M. A. (1972). Epidemiology of endemic nephropathy. In *Endemic Nephropathy*. En *Proceedings of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy*. Ed. Sofia PA, Sofia, Bulgaria, Publishing House of the Bulgarian Academy of Science.
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. (2007). Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon aluminosilicate based product in an in vitro gastrointestinal model. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4810-4819.
- Azcona-Olivera, J. I., Abouzied, M. M., Plattner, R. D., Pestka, J. J. (1992). Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B1, B2 and B3. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 531-534.
- Badria, F. A., Shier, W. T., Wattenberg, E. V. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 622-627.
- Bankole, S. A., Mabekoje, O. O. (2004). Occurrence of aflatoxins and fumonisins in preharvest maize from south-western Nigeria. *Food Add. Contam.* **21**, 251-255.
- Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T., Virgili, R., Kozakiewicz, Z. (2007). *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *J. Food Prot.* **70**, 975-980.
- Bennett, G. A., Richard, J. L., Eckhoff, S. R. (1996a). Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. *Adv. Exp. Med. Biol.* **392**, 317-322.
- Bennett, G. A., Richard, J. L., Eckhoff, S. R. (1996b). Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. En *Fumonisin in Food*. Eds. L. Jackson, J. De Vries, and L. Bullerman. Plenum Press, New York, USA, pp. 317-322.
- Bezuidenhout S. C., Gelderblom, W. C. A., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F. O., Spiteller, G., Vleggaar, R. (1988). Structure Elucidation of the Fumonisin, Mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 743 - 745.
- Bittencourt, A. B. F., Oliveira, C. A. F., Dilkin, P., Corrêa, B. (2005). Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control* **16**, 117-120.
- Bosserhoff, A., Wallach, J., Frank, R. W. (1989). Micropreparative separation of peptides derived from sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *J. Chromatogr.* **473**, 71-77.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., Oswald, I. P. (2004). The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxic. Sci.* **77**, 165-171.
- Bravo Díaz, L. (2003). *Farmacognosia*. Ed. Elsevier, Madrid, España, pp. 1-360.

- Breitholtz Emanuelsson, A., Fuchs, R., Hult, K., Appelgren, L. E. (1991). Distribution of 14C-ochratoxin A and 14C-ochratoxin B in rats: a comparison based on whole-body autoradiography. *IARC Scientific Publications*, 201-203.
- Breitholtz, A., Olsen, M., Dahlback, A., Hult, K. (1991). Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Add. Contam.* **8**, 183-192.
- Brera, C., Debegnach, F. G., S., Miraglia, M. (2004). Effect of industrial processing on the distribution of Fumonisin B1 in dry milling corn fractions. *J. Food Prot.* **67**, 1261-1266.
- Britos, S., Scacchia, S. (1998). Disponibilidad y consumo de alimentos en la Argentina. En *Perfiles nutricionales por países*, FAO Roma.
<http://www.rlc.fao.org/es/nutricion/perfiles.htm>
- Broggi, L. E., Pacin, A. M., Gasparovic, A., Sacchi, C., Rothermel, A., Gallay, A., Resnik, S. L. (2007). Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Ríos Province, Argentina. *Mycotoxin Res.* **23**, N 2, 59-64.
- Broggi, L. E., Resnik, S. L., Pacin, A. M., Gonzalez, H. H. L., Cano, G., Taglieri, D. (2002). Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Add. Contam.* **19**, 465-469.
- Burdaspal, P. A., Legarda, T. M. (1998). Datos sobre la presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria* **292**, 103 - 109.
- Caloni, F., De Angelis, I., Frigge, G., Raimondi, F., Stamatii, A., Zucco, F. (2005). Absorption of fumonisin B1 and aminopentol on an in vitro model of intestinal epithelium: the role of P-glycoprotein. *Toxicon* **45**, 285-291.
- Caloni, F., Spotti, M., Auerbach, H., den Camp, H. O., Gremmels, J. F., Pompa, G. (2000). *In vitro* metabolism of Fumonisin B1 by ruminal microflora. *Vet. Res. Comm.* **24**, 379-387.
- Caloni, F., Spotti, M., Pompa, G., Zucco, F., Stamatii, A., De Angelis, I. (2002). Evaluation of Fumonisin B1 and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2. *Toxicon* **40**, 1181-1188.
- Cantafora, A., Grossi, M., Miraglia, M., Benelli, L. (1983). Determination of ochratoxin A in coffee beans using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment.* **12**, 103-108.
- Castegnaro, M., Garen, L., Gaucher, I., Wild, C. (1996). Development of a new method for the analysis of sphinganine and sphingosine in urine and tissues. *J. Nat. Toxins* **4**, 284-290.
- Castegnaro, M., Toziovanu, M., Wild, C., Molinie, A., Syila, A., Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 6,480-487.
- Castellá, G., Bragulat, M. R., Cabañes, F. J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4707-4710.
- Castells, M., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2005). Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking. A review. *Food Add. Contam.* **22**, 150-157.
- Castelo, M. M., Jackson, L. S., Reynolds, B. H., Bullerman, L. B. (2001). Loss of Fumonisin B1 in extruded and baked corn based foods with sugars. *J. Food Sci.* **66**, 416-421.

- Castelo, M. M., Katta, S. K., Sumner, S. S., Hanna, M. A., Bullerman, L. (1998). Extrusion cooking reduces recoverability of fumonisin B1 from extruded corn grits. *J. Food Sci.* **63**, 996-998.
- Castro, M. F. P. M., Shephard, G. S., Sewram, V., Vicente, E., Mendonça, T. A., Jordan, A. C., (2004). Fumonisin in Brazilian corn-based foods for human consumption. *Food Add. Contam.* **21**, 693-699.
- Cawood, M. E., Gelderblom, W. C., Alberts, J. F., Snyman, S. D. (1994). Interaction of 14 C-labelled fumonisin B mycotoxins with primary rat hepatocyte cultures. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 627-632.
- Chawnua, A. (2000). Development of rapid analytical methods determining corn quality. In Faculty of the Graduate College, pp. 191. Nebraska, Lincoln, UK.
- Chulze, S. N., Ramirez, M. L., Farnochi, M. C., Pascale, M., Visconti, A., March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2797-2801.
- Cirillo, T., Ritieni, A., Galvano, F., Cocchieri, R. A. (2003). Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 and B2 in Italian marketed foodstuffs. *Food Add. Contam.* **20**, 566-571.
- Cortez-Rocha, M. O., Ramírez-Astudillo, W. R., Sánchez-Mariñez, R. I., Rosas-Burgos, E. C., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., Castellón-Campaña, L. G., Tequida-Meneses, M. (2003). Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**, 668-673.
- Creppy, E., Lugnier, A., Fasiolo, F., Heller, K., Roschenthaler, R., Dirheimer, G. (1979). *In vitro* inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. *Chem. Biol. Interact.* **24**, 257-261.
- Creppy, E. E., Kern, D., Steyn, P. S., Vleggaar, R., Röschenthaler, R., Dirheimer, G., (1983). Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicol. Lett.* **19**, 217-224.
- Creppy, E. E., Lorkowski, G., Beck, G., Röschenthaler, R., Dirheimer, G. (1980a). Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells. *Toxicol. Lett.* **5**, 375-380.
- Creppy, E. E., Röschenthaler, R., Dirheimer, G. (1984). Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *BIBRA* **22**, 883-886.
- Creppy, E. E., Schlegel, M., Röschenthaler, R., Dirheimer, G. (1980b). Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin in mice. *Toxicol. Lett.* **6**, 77-80.
- Creppy, E. E. (1999). Human ochratoxicosis. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **18**, 277-293.
- Dall'Asta, C., Galavena, G., Aurelli, G., Dossena, A., Marchelli, R. (2008). A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisin in maize-based products. *World Mycotoxin Journal* **1**, 237-246.
- Da Rocha Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C. E., Dalcerro, A. M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Add. Contam.* **19**, 408-414.

- Dalcero, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., Rosa, C. A. R. (2002). Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Add. Contam.* **19**, 1065-1072.
- De Almeida, A. P., Alaburda, J., Shundo, L., Ruvieri, V., Navas, S. A., Lamardo, L. C. A., Sabino, M. (2007). Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. *Braz. J. Microbiol.* **38**, 300-303.
- De Girolamo, A., Solfrizzo, M., Visconti, A. (2001a). Effect of processing on fumonisin concentration in corn flakes. *J. Food Prot.* **64**, 701-705.
- De Girolamo, A., Visconti, A., Solfrizzo, M. (2001b). Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **84**, 1828-1837.
- De Nijs, M., Sizoo, E., Vermint, A., SHW, N., van Egmond, H. (1998). The occurrence of fumonisin B1 in maize-containing foods in The Netherlands. *Food Add. Contam.* **15**, 385-388.
- Dietrich, D. R., Heussner, A. H., O'Brien, E. (2005). Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Add. Contam.* **22**, 45-52.
- Doko, M. B., Rapior, S., Visconti, A., Schjøth, J. E. (1995). Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J. Agric. Chem.* **43**, 429-434.
- Doko, M. B., Visconti, A. (1994). Occurrence of fumonisins B1 y B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Add. Contam.* **11**, 433-439.
- Dombrink Kurtzman, M. A., Dvorak, T. J. (1999). Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico *J. Agric. Food Chem.* **47**, 622-627.
- Duvick, J., Rood, T., Maddox, J., Gilliam, J. (1998). Detoxification of mycotoxins in Planta as a strategy for improving grain quality and disease resistance: identification of Fumonisin-degrading microbes form maize. Molecular genetics of host specific toxins in plant disease. En *Proceedings of The 3rd International Symposium on Host-Specific Toxins*, held in August 1997 in Tottori, Japan , 369-381.
- Escher, F. E., Koehler, I. P. E., Ayres, J. C. (1973) Production of Ochratoxins A and B on Country Cured Ham. *Appl. Microbiol.* **26**, 1, 27-30.
- Esteban, A., Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Cabañes, F. J. (2006). Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiol.* **23**, 634-640.
- Faberi, A., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Lagana, A. (2005). Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 275-282.
- Fodor, J., Meyer, K., Gottschalk, C., Mamet, R., Kametler, L., Bauer, J., Horn, P., Kovacs, F., Kovacs, M. (2007). In vitro microbial metabolism of fumonisin B1. *Food Add. Contam.* **24**, 416-420.
- Fortza, N., Negoescu, M. (1961). Nefrita cronica azotemica endo-epidemica. *Stud. Cercet Medicine* **1**, 217-221.

- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Samson, R. A. (2004a). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud. Mycol.* **50**, 23 - 43.
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., Samson, R. A. (2004b). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Micol.*, 201-241.
- Gallo, A., Bordignon, F., Pacin, A., Barbieri T., Resnik, S. (1992). Evaluation of food intake by means of 24 hour dietary recall in a town of the Province of Buenos Aires, Argentina, outline of data base on food consumption. *Ecol. Food Nutr.* **28**, 299-317.
- Galtier, P., Charpentreau, J. L., Alvinerie, M., Labouche, C. (1979). The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metab. Dispos.* **7**, 429-434.
- Galtier, P. (1998). Biological fate of mycotoxins in animals. *Rev. Méd. Vét.* **149**, 549-554.
- García Perez, A. (2002). Métodos avanzados de estadística avanzada. (UNED, Ed.), pp. 32-36, 68-70. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid.
- Gareis, M., Rosner, H., Ehrhardt, S. (2000). Blood serum levels of ochratoxin A and nutrition habits. *Arch. fur Lebensmittelhygiene* **51**, 108 - 110.
- Gelderblom, W.C., Kriek, N.P., Marasas, W.F., Thiel, P.G. (1991). Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis* **12**, 1247-1251.
- Grosso, F., Said, S., Mabrouk, I., Fremy, J. M., Castegnaro, M., Jemmali, M., Dragacci, S. (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1133-1140.
- Gumus, T., Arici, M., Demirci, M. (2004). A survey of barley, malt and beer contamination with ochratoxin A in Turkey. *J. Ins. Brew.* **110**, 146-149.
- Gutema, T., Munimbazi, C., Bullerman, L. B. (2000). Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn based food products of U.S. origin. *J. Food Prot.* **63**, 1732-1737.
- Hagelberg, S., Hult, K., Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Applied Toxicol.* **9**, 91-96.
- Hald, B. (1991). Ochratoxin A in human blood in European countries. Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours. *IARC Scientific Publications* **115**, 159 - 164.
- Hampel, F. (1968). Contribution to the theory of robust estimation [disertation]. Department of Statistics University of California.
- Harper, J. (1989). Food extruders and their applications. Chapter 1 *En Extrusion cooking*. Eds. C. Mercier, P. Linko and J. Harper. AACC, pp. 2-33.
- Harrison, L., Colvin, B., Greene, J., Newman, L., Cole, J. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**, 217-221.
- Hayashi, K. (1975). A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue. *Anal. Biochem.* **67**, 503-506.

- Heenan, C. N., Shaw, K. J., Pitt, J. I., (1998). Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* **1**, 63-72.
- Hopmans, E. C., Hauck, C. C., Hendrich, S., Murphy, P. A. (1997). Excretion of fumonisin B1 hydrolyzed fumonisin B1 and the fumonisin B1-fructose adduct in rats. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2618-2625.
- Horie, Y. (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section Nigri. *Nippon Kingakkai* **36**, 73 - 76.
- Hoseney, C. (1994). *Cereal Chemistry*. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
- Howard, P. C., Churchwell, M. I., Couch, L. H., Marques, M. M., Doerge, D. R. (1998). Formation of N-(carboxy methyl) fumonisin B1, following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3546-3557.
- Humpf, H. U., Voss, K. A. (2004). Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 255-269.
- Huber P. J. (1964). Robust estimation of a location parameter. *Anales de Estadística. Matemática* **35**: 73-101.
- Hurst, W. J., Martin Jr., R. A. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up. *J. Chromatogr. A.* **810**, 89-94.
- Iamanaka, B. T., Taniwaki, M. H., Menezes, H. C., Fungaro, M. H. P. (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruit sold in Brazil. *Food Addit. Contam.* **22**, 1258-1263.
- Jackson, L. S., Katta, S. K., Fingerhut, D. D., De Vries, J. W., Bullerman, L. B. (1997). Effects of baking and frying on the fumonisin B1 content of corn-based foods. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4800-4805.
- Janick, J. (2002). History of horticulture Purdue University, USA
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/history/lecture17/lec17.html>.
- JEFCFA (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *WHO Food Additives Series \ Fifty-six meeting of the FAO / WHO Expert Committee. FAO Food and Nutrition Paper* **47**.
- JEFCFA (2008). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series \ Sixty-eight meeting of the FAO / WHO Expert Committee Food Additives* **59**.
- Katta, S. K., Cagampang, A. E., Jackson, L. S., Bullerman, L. (1997). Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions. *Cereal Chem.* **74**, 858-863.
- Katta, S. K., Jackson, L. S., Sumner, S. S. H., M.A., Bullerman, L. B. (1999). Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B1 in extrusion-cooked corn grits. *Cereal Chem.* **1**, 16-20.
- Kedera, C. J., Plattner, R. D., Desjardin, A. E. (1999). Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B1 in maize in Western Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 41-44.

- Kellerman, T., Marasas, W., Thiel, P., Gelderblom, W., Cawood, M., Coetzer, J. (1990). Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B sub(1). *Onderstepoort J. Vet. Res.* **57**, 269-275.
- Kim, E. K., Scott, P. M., Lau, B. P. Y. (2003). Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Add. Contam.* **20**, 161-169.
- Kim, E. K., Shon, D. H., Chung, S. H., Kim, Y. B. (2002). Survey for fumonisin B1 in Korean corn-based food products. *Food Add. Contam.* **19**, 459-464.
- Klaassen, C. D. (1986). Distribution, Excretion, and Absorption of Toxicants. En *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 3rd ed.* Eds C. D. Klaassen, M. O. Amdur, and J. Doull. McMillan Publishing Co., New York. USA.
- Krogh, P. A., F., Elling, N., Gyrd-Hansen, B., Hald, H., Hyldgaard-Jensen, A.E., Larsen, A., Madsen, H. P., Mortensen, T., Moller, O. K., Petersen, U., Ravnskov, U., Rostgaard, M., Aalund, O. (1974). Experimental porcine nephropathy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A.* **245**, 466-475.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* **2**, 179-248.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M., Mc Ewen, N., Lombaert, G. (1996). Approaches to the risk assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada. En *Fumonisin in Food.* Eds. L. Jackson, J. De Vries, and L. Bullerman. Plenum Press, New York, USA, pp. 369-393.
- Landeros, P., Reyes, W., Torres, A. M., Rojo, F., Chulze, S. N. (2005). Relación esfingánina/esfingosina (SA/SO) y consumo de tortillas contaminadas con fumonisinas en una población mexicana. *Acta Toxicol. Argent.* **13**, 8-11.
- Larsen, T. O., Svendsen, A., Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3630 - 3635.
- Lawrence, J. F., Niedzwiadek, B., Scott, P. M. (2000). Effect of temperature and solvent composition on extraction of fumonisins B1 and B2 from corn products. *J. AOAC Int.* **83**, 604-611.
- Leblanc, J. C., Tard, A., Volatier, J. L., Verger, P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Add. Contam.* **22**, 652-672.
- Leong, S. I. L., Hocking, A. D., Scott, E. S. (2006a). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *Int. J. Food Microbiol.* **110**, 209-216.
- Leong, S. I. L., Hocking, A. D., Scott, E. S. (2006b). Survival and growth of *Aspergillus carbonarius* on wine grapes before harvest. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, S83-S87.
- Leong, S. L. L., Hocking, A. D., Scott, E. S. (2006c). The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on ochratoxin A in wine. *Aus. J. Grape and Wine Research* **12**, 245-252.
- Leoni, L. A. B., Soares, L. M. V., Oliveira, P. L. C. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Add. Contam.* **17**, 867-870.
- Leoni, L. A. B., Furlani, R. P. Z., Valente Soares, L. M., Oliveira, P. L. C. (2001). Ochratoxin A in Brazilian green coffee. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* **21**, 105-107.

- Levi, C., Trenk, H. L., Mohr, H. K. (1974). Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* **57**, 860-870.
- Li-Chan, E., Lo, W., Farnworth, E. R. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of soy protein digests in a dynamic model system simulating the upper gastrointestinal tract. *Sensory and nutritive qualities* **71**, 231-237.
- Lino, C. M., Silva, L. J. G., Pena, A. S. (2004) Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *RPCV* **99**, 181-192.
- Llorens, E., Calvo, E., Longo, E., Liendro, O., Britos, S., Morasso, M. (2001). Perfiles Nutricionales por Países - ARGENTINA.
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/nutrition/ncp/arg.pdf>
- Lombaert, G. A., Pellaers, P., Neumann, G., Kitchen, D., Huzel, V., Trelka, R., Kotello, S., Scott, P. M. (2004). Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market *Food Add. Contam.* **21**, 578-585.
- Lombaert, G. A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R., Scott, P. M. (2003). Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Add. Contam.* **20**, 494-504.
- Lund, F., Frisvad, J. C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1117 - 1123.
- MacKenzie, S. E., M. E. Savard, B. A. Blackwell, J. D. Miller, ApSimon, J. W. (1998). Isolation of a new fumonisin from *Fusarium moniliforme* grown in liquid culture. *J. Nat. Prod.* **61**, 367-369.
- MAFF (2001) UK - Survey for aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins and zearalenone in raw maize. Boletim Técnico No. 34 - www.micotoxinas.com.br.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Combina, M., Palacio, G., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M. (2004). Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 326-331.
- Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Fernandez-Juri, M. G., Chiacchiera, S., Dalcerro, A. (2006a). Ochratoxin A and the occurrence of ochratoxin A-producing black aspergilli in stored peanut seeds from Cordoba, Argentina. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 2369-2373.
- Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., Dalcerro, A. (2005). Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin A in feedstuffs from Cordoba Province, Argentina. *Vet. Res. Comm.* **29**, 431-445.
- Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S., Dalcerro, A. M. (2006b). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia* **161**, 53-58.
- Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G., Dalcerro, A. (2003). Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section Nigri in wine grapes in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 179-184.
- Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Chiacchiera, S. M., Dalcerro, A. M. (2007). Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia* **163**, 249-260.
- Mainville, I., Arcand, Y., Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 287-296.

- Malloy, C. D., Marr, J. S. (1997). Mycotoxins and Public Health, a review. *J. Public Health Management Practice* **3**, 61-69.
- Marasas, W., Miller, J., Riley, R., Visconti, A. (1988). Fumonisin B1. *United Nations Environment Programme International Labour Organization World Health Organization International Programme on Chemical Safety*.
- Marasas, W. F. O. (2001). Discovery and occurrence of the fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**, 239-243.
- Marr J. S., Malloy, C. D. (1996). An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus* **12**, 7 - 24.
- Marr , J. S., Malloy, C. D. (1997). Effects of mycotoxins in health and disease. *JAMA* **278**, 1062-1063.
- Martins, M. L., Martins, H. M., Bernardo, F. (2001). Fumonisin B1 and B2 in black tea and medicinal plants. *J. Food Prot.* **64**, 1268-1270.
- Marvasi, L., Marin, D., Viadere, J. L., Laffitte, J., Oswald, I. P., Galtier, P., Loiseau, N. (2006). En *Mycotoxins and phycotoxins, advances in determination, toxicology and exposure management*, H. Njapau, S. Wageningen, Holanda.
- Meister, U. (2001). Investigations on change of fumonisin content of maize during hydrothermal treatment of maize. *Eur. Food Res. Technol.* **213**, 187-193.
- Miller, J. D., Marasas, W. F. O. (2002). Ecology of Mycotoxins in Maize and Groundnuts. In *Supplement to LEISA (Low External Input and Sustainable Agriculture)* pp. 23-24.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., In't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and the small intestine. *Alternatives Lab. Anim.* **23**, 197-209.
- Miraglia, M., Brera, C., Colastosti, M. (1996). Application of biomarkers to assessment of risk to human health from exposure to mycotoxins. *Microchem. J.* **54**, 472 - 477.
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz, A. (2005). Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chem.* **92**, 391-400.
- Molly, K., Van de Woestyne, M., Verstraete, W. (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 254-258.
- Muñoz, K. S., Vega, M., Ríos, G., Madariaga, R. (2005). Ochratoxin A in cereals. Study of two procedures of analysis. *Mykotoxin-Workshop Ifado* 13-15 junio, Dortmund, Germany.
- OIV (2005). Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) in 2005 http://news.reseau-concept.net/images/oiv_uk/client/Commentaire_Statistiques_2005_EN.pdf
- Njapau, H., Trujillo, S., van Egmond, H., Park D. L. (2007). Eds. En *Mycotoxins and Phycotoxins*. Wageningen Academic Publishers, Holanda, pp. 145-157.
- Norred, W. P., Plattner, R. D., Chamberlain, W. J. (1993). Distribution and excretion of (14C) fumonisin B1 in male Sprague-dawley rats. *J. Nat. Toxins* **1**, 341-346.

- Omurtag, G. Z., Yazicioglu, D. (2004). Determination of Fumonisin B1 and B2 in herbal tea and medicinal plants in Turkey by high-performance liquid chromatography. *J. Food Prot.* **67**, 1782-1786.
- Oomen, A., Sips, A. (2003). Mobilization of PCBs and lindane from soil during in vitro digestion and their distribution among the bile salt micelles and proteins of human digestive fluid and soil. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 297-303.
- Otteneder, H., Majerus, P. (2001). Ochratoxin A (OTA) in coffee: Nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Add. Contam.* **18**, 431-435.
- Pacin, A., Martinez, E., Portela, M.L., Neira, M.S. (1998) Consumo de alimentos en la población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. *La Alimentación Latinoamericana* **221**, 28-36.
- Pacin, A., Martínez, E., Portela, M. L., Neira, M. S. (1999). Consumo de alimentos e ingesta de algunos nutrientes en la población de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. *ALAN* **49**, 31-39.
- Pacin, A., Resnik, S., Vega, M., Saelzer, R., Ciancio Bovier, E., Rios G., Martínez N. (2005). Occurrence of ochratoxin A in wines in the Chilean and Argentinean markets. *Arhivoc* **XII**, 214-223.
- Pacin, A. M., Broggi, L. E., Resnik, S. L., Gonzalez, H. H. L. (2001). Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Rios province, Argentina. *Mycotoxin Res.* **17**, 31-37.
- Paepens, C., De Saeger, S., Sibanda, L., Barna-Vetro, I., Anselme, M., Larondelle, Y., Van Peteghem, C. (2005). Evaluation of fumonisin contamination in cornflakes on the Belgian market by "flow-through" assay screening and LC-MS/MS analyses. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7337-7343.
- Pagliuca, G., Zironi, E., Ceccolini, A., Matera, R., Serrazanetti, G. P., Piva, A. (2005). Simple method for the simultaneous isolation and determination of Fumonisin B1 and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **819**, 97-103.
- Palli, D., Miraglia, M., Saieva, C., Masala, G., Cava, E., Colatosti, M., Corsi, A. M., Russo, A., Brera, C. (1999). Serum levels of Ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: Correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **8**, 265-269.
- Pardo, E., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *Int. J. Food Microbiol.* **95**, 79-88.
- Park, J. W., Scott, P. M., Lau, B. P. Y., Lewis, D. A. (2004). Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Add. Contam.* **21**, 1168-1178.
- Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G., Gleadle, A. E. (1997). Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals. *Food Add. Contam.* **21**, 1168-1178.
- Peraica, M., Domijan, A. M., Matas, M., Lucic, A., Radic, B., Delas, F., Horvat, M., Bosanac, I., Baliija, M., Grgicevic, D. (2001). Variations of ochratoxin A concentration in the blood of healthy populations in some Croatian cities. *Arch. Toxicol.* **75**, 410-414.

- Pérez de Obanos, A., López de Cerain, A., Jiménez, A.M, González-Peñas, E., Bello, J. (2001). Ochratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. *Rev. Toxicol.* **18**, 19-23.
- Perez Navarrete, C., Betancur-Ancona, D., Casotto, M., Carmona, A., Tovar, J. (2007). Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteínas y almidón en mezclas de harina de maíz y frijol lima. *ALAN* **57**, 278-286.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M. (1991). Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Sci. Publ.* **115**, 135-137.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Michelon, J., Maru, V. (1991). Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Sci. Publ.* **115**, 83-87.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Garren, L., Grosso, F., Nikolov, I., Dragacci, S., Chernozemsky, I. N. (2003). Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a one month follow up study. *Facta Universitatis* **10**, 62 - 68.
- Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M. (1988). Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit.Contam.* **5**, 299-301.
- Piñeiro, M. S., Miller, J., Silva, G., Musser, S. (1999). Effect of commercial processing on fumonisin concentrations of maize-based foods. *Mycotoxin Res.* **15**, 2-12.
- Piñeiro, M. S., Silva, G. E., Scott, P. M., Lawrence, G. A., Stack, M. E. (1997). Fumonisin levels in Uruguayan corn products. *J. AOAC Int.* **80**, 825-828.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1997). En *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. F., Wheeler, K. A., and Tanboon-Ek, P. (1993). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. Nuts and oilseeds. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 211-216.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B. E., Wheeler, K. A., Tanboon-Ek, P. (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 35-53.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., Miscamble, B. F., Dharmaputra, O. S., Kuswanto, K. R., Rahayu, E. S. (1998). The mycoflora of food commodities from Indonesia. *J. Food Mycol.* **1**, 41-60.
- Pittet, A., Parisod, V., Schellenberg, M. (1992). Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based products from the Swiss market. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1352-1354.
- Pohland, A. (Ed.) (1996). Occurrence of fumonisins in U. S. fod supply. En *Fumonisin in Food*. Eds. L. Jackson, J. De Vries, and L. Bullerman. Plenum Press, New York, USA, pp. 19-26.
- Poling, S. M., Plattner, R. D., Weisleder, D. (2002). N-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisin B1 the initial reaction product of fumonisin B1 and D-glucose. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1318-1324.
- Prelusky, D. B., Locksley Trenholm, H., Savard, M. E. (1994). Pharmacokinetic fate of ¹⁴C labeled fumonisin B1 in swine. *J. Nat. Toxins* **2**, 73-80.

- Prelusky, D. B., Miller, J. D., Trenholm, H. L. (1996). Disposition of 14 C derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1. *Food Add. Contam.* **13**, 155-162.
- Prelusky, D. B., Trenholm, H. L., Savard, M. E. (1995). Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. *J. Nat. Toxins* **3**, 389-394.
- Quintana Guzmán, E. M., Antillón Guerrero, F., Azofeifa Chaves, J. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *ALAN* **57**, 168-172.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., Vismer, H. F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *ASM*. **68**, 2101 - 2105.
- Rice, L. G., Ross, P. F. (1994). Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J. Food Prot.* **57**, 536-540.
- Riley, R., Showker, A., Yoo, J., Norred, W. P., Chamberlain, W. J., Wag, W. J., Merrill, A. H., Motelin, G., Beasley, V. R., Haschek, W. M. (1993). Alteration of tissue and serum shinganine to shingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **118**, 105-112.
- Riley, R. T., Marasas, W. F. O., Miller, J. D., Visconti, A. (2000). Environmental Health Criteria 219
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm#SectionNumber:2.2>.
- Riley, R. T., Merrill, J. A. H., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, J. A. (2001). Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**, 283-289.
- Robutti, J. L. (2004). Calidad y usos del maíz. IDIA XXI 4, 104-110.
<http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/cereales/maiz03.pdf>
- Roit, M. I., Brostoff, J., Male, D. K. (1986). *Inmunología*. Division de Gower medical publishing (Medsi), Barcelona.
- Rokey, G. (1995). Tecnología de la extrusión e implicancias nutricionales. En *XI Curso de especialización FEDNA*, Barcelona.
- Romero, S. M., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Vaamonde, G. (2007). Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 140-143.
- Rosa, C. A., Magnoli, C. E., Fraga, M. E., Dalcerro, A. M., Santana, D. M. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Addit. Contam.* **21**, 358-364.
- Rosner, H., Rohrmann, B., Peiker, G. (2000). Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol. Lett.* **91**, 105-109.
- Ross, P. F., Rice, L. G., Reagor, J. C., Osweiler, G. D., Wilson, T. M., Nelson, H. A., Owens, D. L., Plattner, R. D., Harlin, K. A., Richard, J. L., Colvin, B. M., Banton, M. I. (1991). Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**, 238-241.
- Rotem, J., Aust, H. J. (1991). The effect of ultraviolet and solar radiation and temperature on survival of fungal propagules. *J. Phytopathol.* **133**, 76-84.

- Samson, R. A., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Micol.* **26**, 27-30.
- Sanchis, V., Abadias, M., Oncins, L., Sala, N., Viñas, I., Canela, R. (1994). Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn-based products from the Spanish market. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2147-2148.
- Sangare-Tigori, B., Dem, A. A., Kouadio, H. J., Betbeder, A. M., Dano, D. S., Moukha, S., Creppy, E. E. (2006a). Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Cote d'Ivoire from 1998 to 2002. *Hum. Exp. Toxicol.* **25**, 211-216.
- Sangare-Tigori, B. S., Moukha, H. J., Kouadio, A. M., Betbeder, D. S., Dano, E., and Creppy, E. (2006b). Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Cote d'Ivoire. *Food Add. Contam.* **23**, 1000-1007.
- SAS (1999). SAS OnlineDoc®, Version 8 t/chap38/sect17.htm. (N. Cary, Ed.). SAS Institute Inc. <http://www.sas.com/technologies/analytics/statistics/stat/>
- Saunders, D. S., Meredith, F. I., Voss, K. A. (2001). Control of fumonisin: Effects of processing. *Environ. Health Perspect.* **109**, 333-336.
- Scacchi, P. (1988). *Fisiología Digestiva*. Facultad de Medicina. UBA.
- Scaff, R., Scussel, V. M. (2004). Fumonisins B1 and B2 in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina-southern Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **47**, 2548-2552.
- Schlatter, C., Studer-Rohr, J., Rasonyi, T. (1996). Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Add. Contam.* **13**, 43-44.
- Scott, J. S., Thakur, R. A. (1996). Occurrence and fate of fumonisins in beef. En *Fumonisins in food*. Eds. L. Jackson, J. De Vries, and L. Bullerman. Plenum Press, New York, USA, pp. 39-55.
- Scott, P., Lawrence, G. A. (1994). Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *J. AOAC Int.* **77**, 541-545.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lau, B. P. Y., Lewis, D. A., Hayward, S., Ryan, J. J., Kuiper-Goodman, T. (1998). Survey of Canadian human blood plasma for ochratoxin A. *Food Add. Contam.* **15**, 555-562.
- Scott, P. M., Lawrence, G. (1996). Determination of hydrolysed fumonisin B1 in alkali-processed corn foods. *Food Add. Contam.* **13**, 823-832.
- Scott, P. M., Kim, E. K. (2001). The effect of matrix on analytical methodology for Fusarium toxins. En *Proceedings of the Second Canadian Workshop on Fusarium Head Blight*, pp. 76-78.
- Scudamore, K. A., Patel, S. (2000). Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Add. Contam.* **17**, 407-416.
- Seefelder, W., Hartl, M., Humpf, H. U. (2001). Determination of N-(carboxymethyl) fumonisin B1 in corn products by liquid chromatography/ electrospray ionization-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2146-2151.

- Seefelder, W., Knecht, A., Humpf, H. U. (2003). Bound fumonisin B1: Analysis of fumonisin-B1 glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5567-5573.
- Šegvić, M. P., Pepeljnjak, S. (2001). Fumonisins and their effects on animal health- a brief review. *Veterinarski Arhiv.* **71**, 299 - 323.
- Shepard, G., Thiel, G., Sydenham, E., Alberts, J. F., Cawood, M. E. (1994c). Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin FB1 in a non human primate. *Toxicon* **32**, 735-741.
- Shepard, G. S., Snyjman, P. W. (1999). Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 111-116.
- Shepard, G. S., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Alberts, J. F. (1994b). Biliary excretion of mycotoxin fumonisin B1 in rats. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 489-491.
- Shepard, G. S., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Vleggaar, R., Alberts, J. F. (1994). Determination of the mycotoxin fumonisin B1 and identification of its partially hydrolysed metabolites in faeces of non-human primates. *Food Chem. Toxic.* **32**, 23-29.
- Shephard, G. S., Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Gederblom, C. A. (1990). Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom.* **10**, 2077-2087.
- Shepard, G. S., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Savard, M. E. (1995). Fate of a single dose of ¹⁴C labeled fumonisin B1 in vervet monkeys. *J. Nat. Toxins* **3**, 145-150.
- Shephard, G. S., Marasas, W. F. O., Leggott, N. L., Yasdanpanah, H., Rahimian, H., Safavi, N. (2000). Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1860-1864.
- Shier, W. (2000). The fumonisin paradox: a review of research on oral bioavailability of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **19**, 161-187.
- Shier, W. T., Abbas, H. K., Abou-Karam, M., Badria, F. A., Resch, P. A. (2003). Fumonisins: abiogenic conversions of an environmental tumor promoter and common food contaminant. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **22**, 591-616.
- Shier, W. T., Abbas, H. K., Badria, F. A. (1997). Structure activity relationships of corn fungal toxin fumonisin B1: implications for food safety. *J. Nat. Toxins* **6**, 225-242.
- Shier, W. T., Tiefel, P. A., Badria, F. A. (1999). Current research on mycotoxins: fumonisins. In *Natural and Selected Synthetic Toxins: Biological Implications, American Chemical Society Symposium Series*, Eds Tu, A. T., Gaffield, W. Oxford University Press Oxford U.K., pp. 54-66.
- Singh, R. P., Kong, F. (2008). A model stomach system to investigate disintegration kinetics of solid foods during gastric digestion. *J. Food Sci.* **73**, 202-210.
- Snowdon, A. L. (1990). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. En *General introduction and fruits. United Kingdom, Wolfe Scientific.* **1**.
- Snowdon, A. L. (1991). A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables. En *Vegetables. London, United Kingdom, Wolfe Scientific.* **2**.

- Soares, L., Machinski, M. (2000). Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. *Food Add. Contam.* **17**, 875-879.
- Solfrizzo, M., Chulze, S., Mallmann, C., Visconti, A., De Girolamo, A., Rojo, F., Torres, A., (2004). Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. *Food Add. Contam.* **11**, 1090-1095.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Visconti, A. (2001a). Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **84**, 1828-1837.
- Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Visconti, A. (2001b). Determination of fumonisins B1 and B2 in corn flakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up. *Food Add. Contam.* **18**, 227-235.
- Solovey, M. M. S., Somoza, C., Cano, G., Pacin, A., Resnik, S. (1999). A survey of fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. *Food Add. Contam.* **16**, 325-329.
- Stojimorovic, B., Danilovic, V., Djuricic, M., Bogdanovic, M., Mladenovic-Stojimirovic, Z., and Medjedovic, V. (1959). Chronic nephritis in the rural population of the valley of Morava. *Srp. Arh. Celok Lek.* **87**, 1027-1031.
- Studer-Rohr, I. (1995). *Ochratoxin A in humans: exposure, kinetics and risk assessment*. En Ph.D-Thesis. Diss ETH No. 11071. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D. R., Schlatter, J., Schlatter, C. (1994). The ochratoxin A and coffee. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 341-355.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., Dietrich, D. R. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch. Toxicol.* **74**, 499-510.
- Sydenham, E., Shepard, G., Thiel, G., Marasas, W., Stockenstrom, S. (1991a). Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **25**, 767-771.
- Sydenham, E., Shepard, G. S., Thiel, G. (1992). Liquid Chromatographic determination of fumonisins B1, B2 and B3 in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Annal. Chem.* **75**, 313-318.
- Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Thiel, P. G., W. F. O. Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., Peralta Sanhueza, C. E., Gonzalez, H. H. L., Resnik, S. L. (1993). Fumonisin in Argentinian field trial corn. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 891-895.
- Sydenham, E. W., Stockenstrom, S., Thiel, P. G., Shepard, G., Koch, K. R., Marasas, W. F. O. (1995). Potential of alkaline hydrolysis for removal of fumonisins from contaminated corn. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1198-1201.
- Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Shephard, G. S., Gelderblom, W. C. A., Nieuwenhuis, J. J. (1991b). Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1089-1093.
- Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Stockenstrom, S., Shepard, G. S. (1985). Ca (OH)₂ Treatment: Its influence on fumonisin B1 in corn. *VIII International IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins*.

- Sydenham, E. W., Van Der Westhuizen, L., Stockenstrom, S., Shephard, G. S., Thiel, P. G. (1994). Fumonisin- contaminated maize, physical treatment for partial decontamination of bulk shipments. *Food Add. Contam.* **11**, 25-32.
- Thakur, R. A., Smith, J. S. (1996). Determination of fumonisins B1 and B2 their major hydrolysis products in corn, feed and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1047-1052.
- Taniwaki, M. H., P., J.I Urbano, G.R., Teixeira, A. A., Leitao, M. F. F. (1999). Fungi producing ochratoxin A in coffee. *Proceedings of the 18th international scientific colloquium on coffee, Helsinki, Finland, 2-6 August*, 239-249.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., Iamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 173-179.
- Task 3.2 (2002). Directorate-General, E. C. S. E., and Protection, H. a. C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. Reports on tasks for scientific cooperation Accessed 5 September 2007. http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf.
- Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, É. (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* **134**, 171-176.
- Thakur, R. A., Smith, J. S. (1996). Determination of fumonisins B1 and B2 their major hydrolysis products in corn, feed and meat, using HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1047-1052.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Gelderblom, W. C. A. (1992). The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* **117**, 3-9.
- Thuvander, A., Paulsen, J. E., Axberg, K., Johansson, N., Vidnes, A., Enghardt-Barbieri, H., Trygg, K., Lund-Larsen, K., Jahrl, S., Widenfalk, A., Bosnes, V., Alexander, J., Hult, K., Olsen, M. (2001). Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 1145-1151.
- Torelli, E., Firrao, G., Locci, R., Gobbi, E. (2006). Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes used for the production of "passito" wines. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 307-312.
- Torres, A. M., Reynoso, M. M., Rojo, F. G., Ramirez, M. L., Chulze, S. N. (2001). *Fusarium* species (Section Liseola) and its mycotoxins in maize harvested in Northern Argentina. *Food Add. Contam.* **18**, 836-843.
- Tressou, J., Leblanc, J. C., Feinberg, M., Bertail, P. (2004). Statistical methodology to evaluate food exposure to a contaminant and influence of sanitary limits: Application to Ochratoxin A. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 252-263.
- Tseng, T. C., Liu, C. Y. (1997). Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based foodstuffs in Taiwan market. *Mycopathologia* **137**, 57-61.
- Tsokos, M. (1987). *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*. EMALSA Interamericana División Mc Graw- Hill, Madrid, España.
- Van der Merwe, K. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature* **205**, 1112 - 1113.

- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L. (1965). Mycotoxins II: The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *J. Chem. Soc.* **1965**, 7083 - 7088.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J., Kozakiewicz, Z. (1996). Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4461-4464.
- Velluti, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2001). Note. Occurrence of fumonisin B1 in spanish corn-based foods for animal and human consumption. *Food Science and Technology International* **7**, 433-437.
- Verger, P., Counil, E., Tressou, J., Leblanc, J. C. (2005). Some recent advances in modelling dietary exposure to ochratoxin A. *Food Add. Contam.* **22**, 94-98.
- Versantvoort, C., Oomen, A., Van de Kamp, E., Rompelberg, C., Sips, A. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 31-40.
- Versantvoort, C., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. (2004). RIVM report 320102002/2004, Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. Bilthoven, Holanda. <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320102002.pdf>
- Vieira, A. P., Badiale-Furlong, E., Oliveira, M. L. M. (1999). Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **19**, 221-225.
- Visual Basic (2004) Macro para validación e ingreso de datos estadísticos.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. (2000). Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **888**, 321-326.
- Voss, K. A., Humpf, U. (2004). Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 255-269.
- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., and Martlbauer, E. (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2483-2488.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T., Merrill Jr., A. H. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14486-14490.
- Ware, G., Umrigar, P. P., Carman, A., Kuan, S. (1994). Evaluation of fumonitests immunoaffinity columns. *Anal. Lett.* **27**, 693-715.
- Weidenbörner, M. (2001). Foods and fumonisins. *Eur. Food Res. Technol.* **212**, 262-273.
- Westhuizen, L., Shepard, G. S., Scussel, V. M., Costa, L. L. F., Vismer, H. F., Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O. (2003). Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5574-5578.
- Wu, F., Miller, J. D., Casman, E. A. (2004). The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **23**, 397-424.
- Xie, W., Mirocha, Ch. J., Chen, J. (1997). Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolysed fumonisin B1 in corn by on-line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1251-1255

- Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y. (1994). Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1626-1629.
- Zimmerli, B., Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *J. Chromatogr. B* **666**, 85-99.

ANEXOS

Encuesta Mar del Plata

Instructivo Encuesta Mar del Plata

Encuesta General Rodríguez

Instructivo Encuesta General Rodríguez

Resultados Individuales Mar del Plata - Preguntas 1 a 19

Resultados Individuales Mar del Plata - Preguntas 20 a 38

Resultados Individuales Mar del Plata - Preguntas 39 a 43 y OTA

Instructivo Resultados Individuales Mar del Plata

Resultados Individuales General Rodríguez - Preguntas 1 a 19

Resultados Individuales General Rodríguez - Preguntas 20 a 38

Resultados Individuales General Rodríguez - Preguntas 39 a 40 y OTA

Instructivo Resultados Individuales General Rodríguez

“Survey of Argentinean human plasma for ochratoxin A”. Pacin, A.M., Ciancio Bovier, E.V., Motta, E., Resnik, S.L., Villa, D., Olsen, M. (2008). *Food Additives and Contaminants* **25**: 635-641.

“Effect of *in vitro* digestion on fumonisin B1 in corn flakes”. Motta, E.L., Scott, P.M. (2007). *Mycotoxin Research* **23**: 166-172.

“Fumonisin B₁, B₂ y B₃ en copos de maíz comercializados en Mar del Plata, Argentina”. Motta, E., Pacin, A., Cano, G., Resnik, S.L. (2002). *9º Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Buenos Aires, Argentina.

“Estimación de la ingesta de alimentos en 210 donantes de sangre en la ciudad de Mar del Plata”. Motta, E., Ciancio Bovier, E., Pacin, A., Resnik, S.L. y Villa, D. (2006). *Libro de Actas del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos* (Tomo III, pp. 1197-1203), Mar del Plata, Argentina

Instructivo Encuesta Mar del Plata

Nº de pregunta y detalle	Cantidad
1) Leche, manteca, crema de leche.	1 vaso = 200 ml
2) Queso blando, rallar, fresco, mar del plata.	50 grs = 2 cucharadas soperas
3) Carne vacuna, vísceras y derivados	200 grs = 10 x 6 x 2,5 cm
4) Carne porcina, vísceras y chacinados	150 grs = 12 x 8 x 2 cm
5) Carne de aves, vísceras y derivados	150 grs = 12 x 8 x 2 cm
6) Otras carnes	150 grs = 12 x 8 x 2 cm
7) Jamón crudo, bondiola, salames, panceta.	1 feta = 20 grs
8) Jamón cocido, matambres, salchichón.	1 feta = 20 grs
9) Galletitas dulces y saladas	hasta 10 = 100 grs
10) Panificados	Hasta 2 porciones = 150 grs = 2 panes, 2 porciones pizza, 1 plato de pastas, 6 tapas de enpanadas, 3 facturas.
11) Fideos envasados no frescos.	1 porción = 1 plato
12) Todo tipo de sopas en sobre.	1 sobre = 50 grs
13) Arroz, galletas de arroz, arroz inflado	1 porción = 1 taza cocida
14) Polenta, maizena, copos de maíz	1 porción = 1 taza cocida
15) Nestum, muesli, barras de cereal.	1 porción = 1 taza cocida
16) Avena y derivados	1 porción = 2 cucharadas soperas
17) Verduras crudas	1 porción = 1 plato soperero (verduras de hoja, zanahoria, remolacha)
18) Verduras cocidas	1 porción = 1 plato soperero (verduras de hoja, papa, batata, zapallo)
19) Porotos, lentejas, garbanzos	1 porción = 1 taza cocida
20) Porotos, brotes, milanesas, salsa, leche.	1 porción = 1 taza cocida
21) Frutas frescas.	1 porción = 1 manzana, 1 banana, 1 durazno, 2 ciruelas, 2 damascos, 1 racimo de uvas, 3 higos.
22) Frutas ácidas.	1 porción = 1 pomelo, 1 naranja, 1 kiwi, 2 rodajas de ananá, 8 quinotos, 1 limón.
23) Frutas secas.	1 porción = 1 pocillo de nueces, almendras, maní, avellanas.
24) Mantecol, manteca de maní.	1 porción = 1 barra de mantecol- 15 x 4 x 2 cm
25) Dulces de frutas	1 porción = 2 cucharadas soperas
26) Dulce de leche	1 porción = 2 cucharadas soperas
29) Repostería	1 porción = 2 masas, una porción de: torta, tarta, budín, postres, 1 alfajor.
30) Golosinas	Hasta 100 grs = 1 porción de: chocolate, caramelos, helados, alfajores.
31) Snacks salados	1 porción en bolsitas de 50 grs.: chizitos, papitas, pochoclo.
32) Jugos de naranja, pomelo, manzana, etc.	2 vasos son aproximadamente: 400ml (menos de 0.5 litros)
33) Todo tipo de vinos	2 vasos son aproximadamente: 400ml (menos de 0.5 litros)

Instructivo Encuesta Mar del Plata

34) Todo tipo de cervezas	2 vasos son aproximadamente: 400ml (menos de 0.5 litros)
35) Vodka, caña, aperitivos, ron, whisky.	1 vaso son aproximadamente: 200ml
36) Todo tipo de gaseosas con edulcorante	2 vasos son aproximadamente: 400ml (menos de 0.5 litros)
37) Todo tipo de gaseosas con azúcar	2 vasos son aproximadamente: 400ml (menos de 0.5 litros)
38) Pasas de uvas, damascos, ciruelas, duraznos	1 porción = 100 grs = 3/4 de taza
39) Huevos	1 unidad = 50 grs
40) Café	Hasta 1 porción : 5 tacitas: 30 grs Hasta 2 porciones : 10 tacitas: 70 grs Hasta 3 porciones : 20 tacitas: 140 grs Mas de 3 porciones : 200 grs
41) Infusiones (mate, te de cualquier tipo) Calcular el mate por litro	Hasta 1 porción : 5 tazas: 30 grs Hasta 2 porciones : 10 tazas: 70 grs Hasta 3 porciones : 20 tazas: 140 grs Mas de 3 porciones : 200 grs
42) Chocolate y/o cacao en polvo o líquido o cualquier tipo de chocolate y/o bombón Calcular las leches chocolatadas	Hasta 1 porción = 1 cucharada ó 1 leche chocolatada ó un chocolate chico (30 grs) Hasta 2 porciones = entre 2 y 3 cucharadas ó 2 leches ó 1 chocolate (60 grs) Hasta 3 porciones = entre 4 y 5 cucharadas ó 3 leches ó 100 grs chocolate Mas de 3 porciones = mas de 6 cucharadas o mas de 100 grs de chocolate
43) Riñón de cerdo	medio riñón = 100 grs

Encuesta Mar del Plata

Fecha: <input style="width: 100%;" type="text"/>	Fiambres(crudos) <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 7 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 3 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Encuesta N°: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Hasta 3 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Datos Personales	
Nombre: <input style="width: 100%;" type="text"/> Edad: <input style="width: 200px; height: 20px;" type="text"/> Peso(kgs): <input style="width: 200px; height: 20px;" type="text"/> Talla(mts): <input style="width: 200px; height: 20px;" type="text"/> Ubicación familiar de la persona entrevistada : <input style="width: 100%;" type="text"/>	Fiambres(cocidos) <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 8 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 3 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
La persona entrevistada esta:	
Sana <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Embarazada <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Enferma en tratamiento con medicamentos <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Enferma en tratamiento con dieta <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Otros: <input style="width: 100%;" type="text"/>	Galletitas y/o Galletas <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 9 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 10 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 15 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 20 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Encuesta Alimentaria	
Nota: Las siguientes preguntas deberán contestarse solo por opción alternativa	
Leche y/o yoghourt <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 1 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Menos de un vaso <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> 1 Vaso <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> 2 vasos <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de dos vasos <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Panificados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 10 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 4 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Quesos <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 2 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 50 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 200 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 200 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Fideos secos <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 11 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Carne vacuna <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 3 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 150 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Sopas deshidratadas <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 12 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Carne porcina <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 4 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 150 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Arroz y derivados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 13 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Carne de ave <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 5 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 150 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Polenta y derivados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 14 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Otras Carnes <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 6 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> Hasta 150 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Cereales mezclados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 15 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div> hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Avena <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 16 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div>	Dulce de leche <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N 26 <div style="text-align: right; margin-right: 20px;">C</div>

Encuesta Mar del Plata

<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Verduras(cruadas)</u> D S M E N 17</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Edulcorantes</u> D S M E N 27</p> <p style="text-align: center;">(frecuencia solamente)</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p><u>Azúcar</u> D S M E N 28</p> <p style="text-align: center;">(frecuencia solamente)</p>
<p><u>Verduras(cocidas)</u> D S M E N 18</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Repostería y afines</u> D S M E N 29</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 porciones <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Legumbres</u> D S M E N 19</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Golosinas</u> D S M E N 30</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Soja y derivados</u> D S M E N 20</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Snacks</u> D S M E N 31</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Frutas frescas</u> D S M E N 21</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Jugo de frutas</u> D S M E N 32</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 4 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Frutas ácidas</u> D S M E N 22</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Vino</u> D S M E N 33</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Frutas secas</u> D S M E N 23</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Cerveza</u> D S M E N 34</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Pastas de maní</u> D S M E N 24</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Otras</u> D S M E N 35</p> <p style="text-align: center;">bebidas alcohólicas</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 vaso <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Dulces de frutas</u> D S M E N 25</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Gaseosa(comun)</u> D S M E N 36</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Gaseosa(light)</u> D S M E N 37</p> <p style="text-align: center;">C</p>	<p><u>Frutas desecadas</u> D S M E N 38</p> <p style="text-align: center;">C</p>
<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porción <input type="checkbox"/></p>

Encuesta Mar del Plata

<p>Hasta 4 vasos Hasta 6 vasos Mas de 6 vasos</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<p>Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<p><u>Huevos</u></p>	<p style="text-align: center;">D S M E N</p>		<p>39</p>	<p><u>Café</u></p>	<p style="text-align: center;">D S M E N</p>	<p>40</p>
	<p>C</p>				<p>C</p>	
<p>Hasta 1 unidad Hasta 2 unidades Mas de 2 unidades</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			<p>Hasta 1 porción Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<p><u>Infusiones</u></p>	<p style="text-align: center;">D S M E N</p>		<p>41</p>	<p><u>Chocolate</u></p>	<p style="text-align: center;">D S M E N</p>	<p>42</p>
	<p>C</p>				<p>C</p>	
<p>Hasta 1 porción Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			<p>Hasta 1 porción Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<p><u>Riñón de cerdo</u></p>	<p style="text-align: center;">D S M E N</p>		<p>43</p>			
	<p>C</p>					
<p>Hasta 100 grs. Hasta 300 grs. mas de 300 grs.</p>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>					

Encuesta General Rodríguez

Fecha: <input style="width: 100%;" type="text"/>	Fiambres(crudos) <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 7
Encuesta N°: <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/>	Hasta 3 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/>
Datos Personales	
Nombre: <input style="width: 100%;" type="text"/> Edad: <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> Peso(kgs): <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> Talla(mts): <input style="width: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> Ubicación familiar de la persona entrevistada : <input style="width: 100%;" type="text"/>	Fiambres(cocidos) <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 8
Hasta 3 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/>	Hasta 3 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px;" type="text"/>
La persona entrevistada esta:	
Sana <input style="width: 20px;" type="text"/> Embarazada <input style="width: 20px;" type="text"/> Enferma en tratamiento con medicamentos <input style="width: 20px;" type="text"/> Enferma en tratamiento con dieta <input style="width: 20px;" type="text"/> Otros: <input style="width: 100%;" type="text"/>	Galletitas y/o Galletas <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 9
Hasta 10 <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 15 <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 20 <input style="width: 20px;" type="text"/>	Hasta 10 <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 15 <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 20 <input style="width: 20px;" type="text"/>
Encuesta Alimentaria	
Nota: Las siguientes preguntas deberan contestarse solo por opcion alternativa	
Leche y/o yoghourt <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 1	Panificados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 10
Menos de un vaso <input style="width: 20px;" type="text"/> 1 Vaso <input style="width: 20px;" type="text"/> 2 vasos <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de dos vasos <input style="width: 20px;" type="text"/>	Hasta 2 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 4 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 6 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 6 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/>
Quesos <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 2	
Hasta 50 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 200 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 200 grs <input style="width: 20px;" type="text"/>	Fideos secos <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 11
Hasta 150 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs <input style="width: 20px;" type="text"/>	Hasta 1 porcion <input style="width: 20px;" type="text"/> hasta 2 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> hasta 3 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 3 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/>
Carne vacuna <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 3	
Hasta 50 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 200 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 200 grs <input style="width: 20px;" type="text"/>	Sopas deshidratadas <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 12
Hasta 150 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs <input style="width: 20px;" type="text"/>	hasta 1 porción <input style="width: 20px;" type="text"/> hasta 2 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de porciones <input style="width: 20px;" type="text"/>
Carne porcina <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 4	
Hasta 150 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/>	Arroz y derivados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 13
Hasta 150 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/>	hasta 1 porción <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> hasta 3 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 3 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/>
Carne de ave <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 5	
Hasta 150 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/>	Polenta y derivados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 14
Hasta 150 grs <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px;" type="text"/>	hasta 1 porción <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> Hasta 3 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/> Mas de 3 porciones <input style="width: 20px;" type="text"/>
Otras Carnes <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 6	
Cereales mezclados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 15	Cereales mezclados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px;" type="text"/> / 15

Encuesta General Rodríguez

		C			C	
Hasta 150 grs Hasta 350 grs mas de 350 grs		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
<u>Avena</u>	D	S	M	E	N	16
hasta 1 porción Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Verduras(cruadas)</u>	D	S	M	E	N	17
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Verduras(cocidas)</u>	D	S	M	E	N	18
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Legumbres</u>	D	S	M	E	N	19
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Soja y derivados</u>	D	S	M	E	N	20
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Mas de 2 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Frutas frescas</u>	D	S	M	E	N	21
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Frutas acidas</u>	D	S	M	E	N	22
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Frutas secas</u>	D	S	M	E	N	23
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Mas de 2 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Pastas de mani</u>	D	S	M	E	N	24
		<input type="checkbox"/>				
hasta 1 porción Hasta 2 porciones Hasta 2 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Dulce de leche</u>	D	S	M	E	N	26
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Edulcorantes</u> (frecuencia solamente)	D	S	M	E	N	27
<u>Azucar</u> (frecuencia solamente)	D	S	M	E	N	28
<u>Reposteria y afines</u>	D	S	M	E	N	29
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Mas de 2 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Golosinas</u>	D	S	M	E	N	30
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Snacks</u>	D	S	M	E	N	31
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Jugo de frutas</u>	D	S	M	E	N	32
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Vino</u>	D	S	M	E	N	33
Hasta 2 vasos Hasta 4 vasos Mas de 4 vasos		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Cerveza</u>	D	S	M	E	N	34
Hasta 2 vasos Hasta 4 vasos Hasta 6 vasos Mas de 6 vasos		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>				
<u>Otras</u> bebidas alcoholicas	D	S	M	E	N	35
Hasta 1 vaso		<input type="checkbox"/>				

Encuesta General Rodríguez

<p>Hasta 1 porcion <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Dulces de frutas</u> D S M E N 25</p>	<p><u>Gaseosa(comun)</u> D S M E N 36</p>
<p>Hasta 1 porcion <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Gaseosa(light)</u> D S M E N 37</p>	<p><u>Frutas desecadas</u> D S M E N 38</p>
<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porcion <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Huevos</u> D S M E N 39</p>	
<p>Hasta 1 unidad <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 unidades <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 unidades <input type="checkbox"/></p>	

Encuesta General Rodríguez

Fecha: <input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>	Fiambres(crudos) <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 7
Encuesta N°: <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>	Hasta 3 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Datos Personales	
Nombre: <input style="width: 250px; height: 20px;" type="text"/> Edad: <input style="width: 50px; height: 20px;" type="text"/> Peso(kgs): <input style="width: 50px; height: 20px;" type="text"/> Talla(mts): <input style="width: 50px; height: 20px;" type="text"/> Ubicación familiar de la persona entrevistada : <input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>	Fiambres(cocidos) <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 8 Hasta 3 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 fetas <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
La persona entrevistada esta:	
Sana <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Embarazada <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Enferma en tratamiento con medicamentos <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Enferma en tratamiento con dieta <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Otros: <input style="width: 150px; height: 20px;" type="text"/>	Galletitas y/o Galletas <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 9 Hasta 10 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 15 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 20 <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Encuesta Alimentaria	
Nota: Las siguientes preguntas deberan contestarse solo por opcion alternativa	
Leche y/o yoghourt <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 1 Menos de un vaso <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> 1 Vaso <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> 2 vasos <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de dos vasos <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Panificados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 10 Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 4 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 6 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 6 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Quesos <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 2 Hasta 50 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 200 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 200 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Fideos secos <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 11 Hasta 1 porcion <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Carne vacuna <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 3 Hasta 150 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Sopas deshidratadas <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 12 hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Carne porcina <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 4 Hasta 150 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Arroz y derivados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 13 hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> hasta 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Carne de ave <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 5 Hasta 150 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> mas de 350 grs. <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Polenta y derivados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 14 hasta 1 porción <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 2 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Hasta 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> Mas de 3 porciones <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Otras Carnes <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 6	Cereales mezclados <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> C <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / 15

Encuesta General Rodríguez

	C		C
Hasta 150 grs Hasta 350 grs mas de 350 grs	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<u>Avena</u>	D S M E N	16	<u>Dulce de leche</u>
hasta 1 porción Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones
<u>Verduras(crudas)</u>	D S M E N	17	<u>Edulcorantes</u> (frecuencia solamente)
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		<u>Azucar</u> (frecuencia solamente)
<u>Verduras(cocidas)</u>	D S M E N	18	<u>Reposteria y afines</u>
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Mas de 2 porciones
<u>Legumbres</u>	D S M E N	19	<u>Golosinas</u>
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones
<u>Soja y derivados</u>	D S M E N	20	<u>Snacks</u>
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Mas de 2 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones
<u>Frutas frescas</u>	D S M E N	21	<u>Jugo de frutas</u>
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 2 vasos Hasta 4 vasos Mas de 4 vasos
<u>Frutas acidas</u>	D S M E N	22	<u>Vino</u>
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Hasta 3 porciones Mas de 3 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 2 vasos Hasta 4 vasos Hasta 6 vasos Mas de 6 vasos
<u>Frutas secas</u>	D S M E N	23	<u>Cerveza</u>
Hasta 1 porcion Hasta 2 porciones Mas de 2 porciones	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		Hasta 2 vasos Hasta 4 vasos Hasta 6 vasos Mas de 6 vasos
<u>Pastas de mani</u>	D S M E N	24	<u>Otras</u> <u>bebidas alcoholicas</u>
			Hasta 1 vaso

Encuesta General Rodríguez

<p>Hasta 1 porcion <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Dulces de frutas</u> D S M E N 25</p>	<p><u>Gaseosa(comun)</u> D S M E N 36</p>
<p>Hasta 1 porcion <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Gaseosa(light)</u> D S M E N 37</p>	<p><u>Frutas desecadas</u> D S M E N 38</p>
<p>Hasta 2 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 4 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 6 vasos <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 6 vasos <input type="checkbox"/></p>	<p>Hasta 1 porcion <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 3 porciones <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 3 porciones <input type="checkbox"/></p>
<p><u>Huevos</u> D S M E N 39</p>	
<p>Hasta 1 unidad <input type="checkbox"/></p> <p>Hasta 2 unidades <input type="checkbox"/></p> <p>Mas de 2 unidades <input type="checkbox"/></p>	

Resultados individuales MDP - Preguntas 1 a 19

Datos personales					Preguntas																																					
Nº	Edad	Peso	Talla	Cond.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19	
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr		
1	43	102	178	1	1	100	4	180	1	350	2	350	3	320	1	340	4	60	2	60	1	100	1	150	2	100	5	2	250	2	120	5	5	1	150	1	180	2	50			
2	31	71	196	1	1	400	4	40	1	120	5	4	400	4	400	4	50	2	60	4	90	1	450	4	100	4	50	4	120	4	120	5	5	1	150	1	180	5				
3	29	68	164	1	1	200	1	40	4	120	2	300	1	350	2	350	4	60	4	60	1	85	1	150	2	200	5	2	120	5	5	2	130	2	180	5						
4	39	76,5	160	1	4	100	1	45	1	130	4	140	4	150	4	150	4	60	4	60	4	90	4	150	2	250	5	1	120	4	130	5	5	1	150	1	180	4	80			
5	26	102	160	1	5		4	50	1	150	4	150	2	150	5		4	60	4	60	5		1	145	2	100	5	2	250	2	125	5	5	1	300	1	300	5				
6	44	65	162	1	2	100	2	45	1	350	4	150	2	350	2	150	4	60	4	60	2	100	2	300	1	100	5	1	120	4	140	4	100	5	1	320	1	310	4	80		
7	57	70	150	1	1	150	2	45	2	200	4	120	1	200	4	120	2	50	2	60	1	100	1	300	1	100	2	50	1	120	1	130	5	5	2	150	2	180	4	80		
8	58	81	176	1	1	200	1	48	2	350	3	300	2	150	2	350	2	55	2	50	1	90	1	300	2	100	4	50	2	120	2	120	2	100	2	110	1	150	1	180	1	80
9	46	72	170	1	5		4	40	1	150	4	150	2	350	2	150	1	60	1	120	1	100	1	300	2	100	5	5	5	5	5	5	5	5	1	150	1	180	2	80		
10	61	72	170	3	3	100	3	50	2	450	3	420	2	400	5		5		5		2	150	3	150	1	100	1	50	2	120	2	120	4	100	3	200	1	300	1	320	3	80
11	48	78	153	1	1	100	2	50	2	400	4	150	2	350	2	150	2	120	2	120	1	90	2	300	1	100	5	2	250	3	120	3	100	5	1	300	1	310	4	80		
12	18	60	170	1	2	100	1	50	1	350	5		2	200	5		1	60	1	60	5		1	450	5		1	50	4	120	5		5	5	1	150	2	180	5			
13	46	82	172	1	5		2	50	1	350	5		2	350	5		2	120	2	120	1	150	2	300	2	100	5	2	250	3	120	5	5	1	300	5		3	150			
14	27	78	178	1	5		5		1	350	4	140	5		5		2	120	2	110	2	100	1	150	2	200	5	2	250	5		5	5	5	5	5	5	5	4	80		
15	21	85	177	1	4	100	2	42	2	350	4	340	4	350	5		1	60	1	60	4	95	1	350	2	200	5	2	250	4	120	5	5	1	150	1	180	4	80			
16	51	83	170	1	5		4	50	2	350	4	150	2	350	2	150	2	120	2	120	5		1	550	2	300	5	4	120	2	120	5	5	1	300	2	320	2	150			
17	41	85	152	1	5		1	50	1	350	5		1	350	4	150	2	60	2	60	1	95	1	350	2	200	5	2	250	4	250	2	100	5	1	150	1	180	4	80		
18	36	64	165	1	3	100	2	180	1	350	4	140	1	350	5		5		5		1	100	2	350	2	300	5	5	5	5	5	5	5	1	300	4	180	5				
19	49	60	175	1	2	200	2	50	1	340	5		2	350	3	350	2	120	2	120	5		1	450	2	300	5	2	250	2	250	5	5	1	150	1	180	2	150			
20	57	62	159	1	1	400	1	150	3	350	5		4	350	3	350	4	60	4	60	4	100	1	300	2	200	5	2	120	2	120	2	100	5	1	150	1	320	3	80		
21	48	63	162	1	1	100	1	50	2	350	4	140	1	350	2	340	1	60	1	60	1	90	2	150	1	100	4	50	2	380	2	120	2	100	5	1	150	1	170	4	80	
22	41	83	175	1	1	100	1	50	2	350	4	140	2	350	4	150	2	120	2	120	1	150	1	450	2	200	3	50	2	120	3	120	5	5	1	150	2	175	5			
23	39	79	175	1	2	200	1	50	2	400	3	450	2	350	2	340	2	120	2	120	1	95	1	450	2	300	5	2	250	3	120	5	5	1	150	1	180	4	80			
24	35	72	180	1	2	200	2	50	2	450	4	150	2	350	2	340	3	60	3	60	1	150	1	300	2	300	4	50	2	250	2	250	1	100	1	110	1	150	1	180	2	80
25	30	78	166	1	1	100	2	150	1	340	2	340	2	350	4	150	1	120	1	120	1	90	1	150	2	200	4	50	4	120	4	120	5	5	2	300	2	300	4	80		
27	37	87	182	1	5		4	45	2	450	4	145	3	345	4	150	3	60	3	60	4	90	1	350	2	100	5	3	120	3	120	5	5	1	300	4	150	4	80			
28	33	85	179	1	1	400	2	200	2	350	5		2	150	2	150	5		2	120	1	150	1	300	2	200	5	3	120	2	120	5	5	2	450	0		4	80			
29	62	62	168	1	1	500	2	50	2	150	5		2	450	4	150	3	60	3	60	2	90	1	350	2	200	5	2	250	43	120	5	5	2	300	3	300	3	150			
30	45	72	170	1	5		2	180	2	340	5		2	340	3	350	5		2	60	1	90	2	150	2	100	2	100	2	120	3	250	4	100	5	4	150	2	300	2	80	
31	25	77	174	1	1	200	5		1	350	5		5		5		5		5		1	150	1	350	2	200	5	2	250	5		5	5	1	150	2	300	5				
32	24	53	165	1	2	200	3	180	2	340	4	150	2	350	3	150	5		5		4	90	4	150	2	200	3	50	2	250	2	250	3	200	5	2	300	5	5			
33	22	75	180	1	2	200	2	200	2	450	4	150	2	150	5		2	120	2	120	1	220	1	450	2	300	2	100	4	120	5		2	200	2	100	5		2	150	3	80
34	49	85	176	1	5		2	200	1	150	4	150	2	350	2	150	4	60	4	60	4	90	1	350	2	100	5	2	250	2	250	5	5	1	150	1	150	2	160			
35	23	67	165	1	1	200	2	350	2	350	4	150	2	350	4	150	4	60	4	60	1	90	1	450	2	300	5	4	120	5		5	5	2	300	5		5				
36	51	90	165	1	1	200	2	350	2	350	4	150	2	350	4	150	4	60	4	60	1	90	1	450	2	300	5	4	120	5		5	5	2	300	5		5				
37	23	63	170	1	1	100	1	200	2	360	5		2	360	2	350	2	60	2	60	1	90	1	350	2	300	5	2	250	3	380	2	100	1	100	2	150	2	150	4	80	
38	60	85	169	1	1	200	2	350	2	360	5		2	350	3	350	5		2	120	1	100	1	150	2	300	5	5	2	250	1	200	5	1	300	2	300	3	80			
39	45	79	170	1	4	100	2	50	1	450	4	150	2	150	4	150	2	120	3	60	1	90	1	350	2	300	5	2	250	4	120	5	5	1	150	2	300	5				
40	33	71	167	4	1	100	1	50	5		5		5		2	150	5		5		1	150	1	450	2	200	5	2	250	3	120	5	5	1	150	1	300	3	80			
41	33	65	170	1	3	100	2	200	2	500	2	350	2	150	4	150	1	60	1	60	1	90	1	150	2	100	5	5	5	5	4	100	5	2	150	2	150	5				
42	24	79	175	1	2	100	2	50	3	340	3	150	5		2	150	2	120	2	60	1	90	1	350	5		5	4	120	3	250	5	5	2	150	2	150	3	80			
43	44	75	170	1	2	500	2	250	2	350	5		2	350	3	150	5		2	60	1	90	1	350	2	100	5	2	120	2	120	2	100	2	300	1	150	1	150	3	80	

Resultados individuales MDP - Preguntas 1 a 19

92	36	68	163	1	5		2	50	1	150	4	150	2	150	2	60	5		1	100	1	150	3	100	5		2	120	4	120	5		5		1	120	1	150	3	90										
93	29	78	174	1	2	200	2	200	1	350	4	150	2	150	3	150	3	60	3	60	1	100	1	150	1	300	5		2	250	2	250	5		5		1	120	5		5									
Datos personales				Preguntas																																														
	Edad	Peso	Talla	Cond.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19									
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr								
94	34	81	170	1	3	200	2	200	1	350	5		2	350	4	150	2	120	2	120	1	100	1	300	2	300	5		2	120	2	120	5		5		2	120	2	150	5									
95	18	72	170	1	1	300	2	50	2	150	5		2	150	4	150	2	60	2	60	2	100	1	300	2	100	5		2	120	2	120	5		5		2	120	5		5									
96	44	70	168	1	1	200	1	200	1	350	4	150	2	150	2	150	2	60	2	60	1	150	1	300	4	100	5		2	120	2	120	2	100	5		1	120	1	150	2	90								
97	58	52	144	1	3	200	3	50	2	150	4	150	5		3	150	4	60	4	50	5		2	150	2	100	5		2	250	2	120	5		3	100	2	120	2	150	3	90								
98	48	62	156	1	5		1	50	2	150	5		5		5		3	60	3	60	2	150	1	300	2	100	5		2	120	2	120	5		5		1	120	1	150	2	90								
99	31	69	164	1	1	400	4	50	1	150	4	150	4	150	3	150	3	60	3	60	1	300	1	300	2	300	5		2	250	2	120	4	120	5	100	5		2	150	3	90								
100	47	95	160	1	5		2	80	2	150	5		2	150	2	150	1	60	1	60	1	60	2	150	2	100	5		1	120	2	120	5		5		1	120	2	120	3	90								
101	20	80	192	1	1	400	2	350	1	340	3	150	3	150	3	150	1	60	1	60	1	120	1	300	2	200	5		3	120	3	120	5		5		1	120	3	150	5									
105	24	75	175	1	2	200	2	220	1	350	3	150	3	150	5		3	60	3	60	1	120	1	300	3	100	2	100	2	120	5		4	100	5		5		5		5									
106	55	64	170	1	1	450	1	50	2	150	4	150	2	150	4	150	5		2	120	1	120	1	150	2	100	5		2	120	2	120	5		5		2	120	2	120	2	90								
107	24	51	160	1	2	200	2	200	1	350	4	150	2	150	5		2	60	2	60	1	120	1	300	2	100	5		2	120	4	120	5		5		2	120	2	120	4	90								
108	47	98	175	1	3	100	1	200	1	150	4	150	2	150	5		2	60	2	60	1	120	1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		1	120	1	150	2	90								
109	33	93	168	1	3	200	2	50	1	150	5		3	350	3	150	2	120	2	120	1	60	1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		1	120	1	120	5									
110	27	66	160	1	2	400	2	60	2	150	5		2	350	2	150	4	60	4	60	1	60	2	150	2	100	5		2	250	2	120	4	100	5		1	120	1	120	2	90								
111	39	92	171	1	5		1	60	2	150	5		1	150	5		5		4	60	1	60	1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		1	120	1	120	2	90								
112	26	75	170	1	2	700	1	120	1	150	4	150	2	150	5		2	120	5		1	100	1	150	2	300	5		2	120	3	120	5		5		5		1	120	2	90								
113	48	78	175	1	2	200	2	200	2	150	5		2	150	2	150	5		5		1	100	1	150	2	100	5		2	120	2	120	2	100	2	100	1	120	1	120	3	90								
114	47	89	180	3 Y4	1	100	1	50	2	150	4	150	2	150	2	150	4	60	4	60	1	100	1	150	2	300	5		2	250	4	120	1	100	1	100	1	120	1	120	2	90								
115	23	65	164	1	4	100	2	200	2	150	5		2	150	2	150	5		3	60	1	100	1	150	2	300	4	50	2	120	4	120	5		5		1	120	1	120	4	90								
116	45	78	158	1	1	100	1	50	1	150	5		2	150	2	150	3	60	3	60	1	100	1	150	3	100	2	50	2	120	4	120	5		5		1	120	1	120	5									
117	21	58	168	1	1	100	2	50	1	150	5		2	150	2	150	3	60	3	60	2	100	1	150	2	100	5		2	120	5		3	100	5		1	120	1	120	2	90								
118	24	66	170	1	2	100	2	50	1	350	5		2	150	5		2	60	2	60	1	100	1	300	2	350	5		2	120	5		2	100	5		2	120	2	120	5									
119	33	50	156	1	1	200	2	50	1	350	5		2	150	2	150	1	60	1	60	1	100	2	300	2	100	3	50	2	120	5		2	100	5		1	120	2	120	5									
120	33	120	183	3	4	100	1	50	2	150	5		2	150	2	150	2	60	2	60	1	100	1	150	2	340	4	50	2	120	4	120	5		5		2	450	2	500	2	160								
121	48	86	170	1	3	100	5		1	350	5		2	150	2	150	4	60	4	60	5		2	150	2	150	5		2	120	5	120	5		5		2	120	5		5									
122	47	67	172	1	4	200	2	200	2	350	4	150	1	150	4	150	3	60	3	60	1	300	1	300	2	150	5		3	120	5		1	100	5		2	120	2	350	5									
123	32	71	162	1	1	200	1	120	1	150	5		2	150	2	150	2	60	2	60	1	300	1	300	2	340	5		2	120	4	120	5		5		1	120	2	120	3	90								
124	33	105	192	1	1	220	2	200	2	350	5		2	150	3	150	5		5		1	300	1	300	2	340	2	50	5		5		1	200	5		1	120	5		5									
125	23	81	172	1	1	250	1	180	1	340	5		4	150	4	150	5		1	60	2	300	2	150	2	150	5		2	120	5		5		5		5		5		5									
126	49	83	176	1	2	240	1	40	2	150	4	150	4	150	4	150	2	60	2	60	2	100	1	300	2	350	4	50	2	120	4	120	5		5		1	350	2	350	4	90								
127	33	115	180	1	3	100	2	40	1	340	5		2	350	4	150	2	120	4	60	5		1	150	2	400	5		2	250	4	120	5		5		1	120	1	120	5									
128	41	87	180	1	2	220	5		1	350	5		2	150	3	150	1	120	1	120	5		1	450	2	300	5		2	120	2	120	5		5		1	120	5		4	90								
129	41	95	174	4	1	200	2	50	2	350	5		5		2	150	2	120	4	60	4	60	1	300	1	150	5		2	250	5		1	100	5		1	120	1	120	5									
130	32	100	170	1	3	200	2	180	3	340	5		2	150	3	150	3	60	3	60	5		1	300	2	400	5		2	250	5		5		5		2	120	2	120	5									
131	26	78	180	1	2	250	2	200	2	350	5		1	150	2	150	3	60	3	60	1	220	1	550	2	300	5		2	250	3	120	5		5		2	350	5		5									
132	34	67	170	1	1	100	2	60	1	400	2	150	2	150	2	150	5		2	60	2	240	1	300	2	150	2	50	2	120	2	120	5		5		1	120	2	120	3	90								
133	44	84	167	1	2	100	2	200	1	360	3	150	2	350	3	350	2	120	2	120	1	100	1	300	2	300	5		2	150	4	120	3	100	4	100	1	120	2	120	3	90								
134	56	67	170	1	2	200	2	50	2	350	5		3	150	3	200	4	60	4	60	5		1	500	2	400	5		2	120	2	250	5		5		1	350	2	350	3	90								
135	34	70	169	1	1	200	2	200	2	350	5		2	150	5		2	60	2	60	1	220	1	150	2	150	5		2	120	5		2	100	4	100	2	120	2	120	5									
136	35	75	171	1	5		2	50	2	350	3	1																																						

Resultados individuales MDP - Preguntas 1 a 19

143	36	90	170	1	5		2	200	2	350	5		2	150	5		2	60	2	60	2	220	1	300	2	300	3	50	5		5		5		1	300	1	350	1	300					
144	33	73	182	1	2	200	1	50	1	350	3	350	2	150	3	350	3	60	3	60	1	100	1	300	2	300	5		2	300	2	250	5		3	100	1	120	2	120	2	300			
145	24	74	180	1	1	100	3	50	2	350	5		2	150	3	150	2	60	2	60	1	100	1	300	2	300	5		5		4	120	4	100	5		1	120	2	120	2	90			
Datos personales				Preguntas																																									
				Edad	Peso	Talla	Cond.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19	
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	
146	42	44	176	1	3	200	2	200	1	400	4	150	2	150	3	150	3	60	3	60	1	100	1	300	2	150	3	50	3	120	5		4	90	5		1	120	2	120	3	90			
147	43	63	165	1	1	100	2	50	1	350	3	150	2	200	2	220	3	60	3	60	2	240	1	450	2	140	5		2	140	2	130	5		5		2	200	2	120	2	90			
148	53	93	172	1	1	200	2	50	1	150	3	150	2	200	2	150	2	60	2	60	2	100	1	150	2	150	5		2	140	2	130	2	90	2	90	1	120	1	130	2	90			
149	24	65	169	1	2	200	1	200	2	200	5		5		2	300	2	60	2	60	1	100	1	150	2	150	5		2	140	2	120	1	90	5		1	130	2	130	2	100			
150	21	82	158	1	1	100	2	50	2	200	5		2	150	3	150	2	60	2	60	1	100	1	150	2	150	5		2	140	5		2	100	5		1	130	2	130	5				
151	25	76	169	1	2	200	2	200	4	150	2	150	1	360	5		1	60	1	60	1	240	1	450	2	150	5		2	140	5		5		5		1	120	5		5				
152	28	68	173	1	2	200	1	50	3	350	5		2	150	2	150	4	60	4	60	1	100	3	300	2	150	5		2	140	5		4	100	5		1	120	1	130	4	90			
153	45	90	157	1	2	200	1	50	1	340	5		2	300	2	200	2	60	2	60	1	200	1	300	2	150	5		2	140	5		2	100	5		1	120	1	100	5				
154	50	60	160	1	1	200	2	50	1	150	5		2	300	3	150	3	60	3	60	1	100	1	150	2	150	5		2	150	2	130	5		3	100	1	120	3	120	4	90			
155	37	88	169	1	3	200	2	50	2	150	3	150	2	350	3	150	2	60	2	60	1	120	1	300	2	200	5		2	150	5		1	100	5		1	120	2	120	4	90			
156	64	94	170	1	1	500	2	50	2	350	5		2	150	2	150	5		5		1	100	2	150	2		5		2	120	3	130	5		5		1	120	1	120	5				
157	46	118	170	1	1	200	2	200	1	350	2	150	2	150	2	150	2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	5	0	2	120	5	0	5	0	5	0	2								
158	59	80	166	1	1	400	5		2	150	3		2	150	2		5		5		1	100	2	150	2	100	5		2	120	5		5		5		1	150	1	180	2	80			
159	34	90	178	1	1	150	2	50	2	150	5		2	150	5		2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		1	150	2	180	2	80			
160	33	110	169	4	1	200	1	50	2	150	2	150	1	150	5		2	60	2	60	1	100	1	150	2	100	5		2	120	5		1	100	5		1	150	2	180	5				
161	48	110	165	100	3	200	2	50	1	150	3	150	1	150	5		2	60	2	60	1	100	1	450	2	100	3	50	3	120	5		2	100	5		1	150	2	180	2	80			
162	44	65	159	1	2	200	2	50	1	150	5		2	150	2	150	2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	5		2	120	4	120	3	100	5		2	150	2	180	5				
163	39	160	186	1	3	500	2	200	1	450	5		2	150	5		1	60	1	60	1	150	1	450	2	300	3	50	3	120	5			5		1	150	1	180		80				
164	52	63	163	100	5		2	50	1	450	3	150	2	150	3	150	2	60	2	60	1	100	1	300	1	100	5		2	120	4	120	5		5		1	150	3	180	5				
165	25	80	169	1	1	200	5		1	450	5		2	350	3	350	2	60	2	60	1	220	1	450	3	100	5		2	120	5		1	100	5		2	150	5		5				
166	38	61	164	1	5		3	200	2	350	5		5		5		2	60	2	60	2	100	1	450	2	100	5		1	120	4	120	5		5		1	150	1	180	5				
167	19	68	166	1	1	500	1	200	2	150	5		2	150	5		2	60	2	60	1	100	1	450	2	100	5		2	120	5		2	100	5		1	150	2	180	5				
168	29	70	165	100	1	200	1	50	1	350	5		2	150	5		2	60	2	60	1	150	1	300	2	100	5		2	120	2	120	5		5		1	150		180		80			
169	31	62	173	1	2	400	3	50	2	350	4	150	2	150	5		3	60	3	60	2	100	1	300	2	200	3	100	1	120	5		1	200	5		1	150	1	180	3	80			
170	24	71	179	1	1	200	2	50	2	350	3	150	3	150	3	150	2	60	2	60	1	100	1	450	1	100	5		3	120	5		5		5		3	150	2	180	2	80			
171	25	91	165	1	1	150	2	200	1	350	3	150	2	150	3	150	5		2	60	1	100	1	450	2	100	5		2	120	5		5		5		1	150	5		5				
172	38	89	180	100	1	200	2	200	2	350	3	150	1	150	3	150	2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	5		2	120	3	120	4	100	5		1	150	1	180	3	80			
173	37	60	170	1	1	400	2	50	2	350	5		2	350	3	150	5		5		5		1	450	2	300	5		2	120	2	120	3	100	5		1	150	1	180	5				
174	54	65	157	100	1	200	2	200	1	350	5		2	150	2	150	5		3	60	1	100	1	150	2	100	5		2	120	4	120	1	100	5		1	150	1	180	2	80			
175	23	61	174	1	1	200	2	200	1	150	3	150	2	150	3	150	4	60	4	60	1	100	1	300	2	200	5		2	120	3	120		100	1	110	1	150	2	180	4	80			
176	47	70	156	1	5		2	50	1	350	5		5		5		5		5		5		1	450	5		5		2	120	2	250	5		5		1	150	5		5				
177	24	50	167	1	2	200	2	250	1	150	5		2	150	2	150	3	120	3	120	1	100	1	450	2	100	5		2	380	2	250	5		5		2	150	5		5				
178	35	78	180	100	5		2	200	1	350	2	150	2	150	3	150	2	120	2	120	1	100	1	150	2	300	5		2	250	2	250	3	100	5		1	150	2	180	2	80			
179	53	70	168	1	2	500	1	50	1	150	4	150	3	350	2	350	3	60	3	60	1	100	1	300	2	200	5		4	120	4	120	5		5		1	300	1	360	3	80			
180	32	80	170	1	2	200	2	50	1	350	5		3	150	3	150	5		2	60	1	100	1	150	1	100	5		1	120	3	120	5		5		1	150	2	180	2	80			
181	45	70	165	1	5		2	50	2	350	2	150	1	150	2	150	1	60	1	60	5		1	450	1	100	5		5		5		5		5		1	150	5		5				
182	48	72	169	1	1	200	2	50	1	150	3	450	2	150	4	150	2	120	2	120	1	100	1	150	2	300	5		2	250	5		5		5		2	300	2	180	5				
183	25	62	157	1	2	200	2	50	2	150	3	150	2	150	5		1	60	1	60	1	150	1	300	2	100	5		4	120	4	120	5		5		2	300	2	180	5				
184	22	74	167	1	1	200	2	50	2	150	3	150	2																																

Resultados individuales MDP - Preguntas 1 a 19

191	24	89	178	1	2	400	5		1	150	5		2	150	4	150	5		2	120	1	220	2	300	1	100	5		2	250	2	120	5		5		2	150	1	180	5		
192	31	77	165	1	2	200	2	50	1	150	3	150	3	150	5			60	2	60	2	100	1	150	2	100	5		2	120	3	120	4	100	5		5		5	5	5	5	
193	28	76	175	1	1	150	1	50	1	150	4	150	2	150	4	150	2	60	2	60	1	150	1	300	2	100	5		1	120	2	120	3	100	5		2	150	2	180	4	80	
Datos personales				Preguntas																																							
	Edad	Peso	Talla	Cond.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	
195	26	73	170	1	3	150	1	50	1	150	3	150	2	150	3	350	3	60	4	60	1	100	1	150	2	300	2	50	5		2	120	5		5		3	150	3	180	5		
196	22	80	186	1	1	400	1	50	1	150	2	150	2	150	3	150	2	120	2	120	1	150	1	300	2	200	5		2	250	3	120	2	100	5		1	150	5		5		
197	32	56	160	1	3	200	2	50	1	150	2	150	1	150	3	150	3	60	3	60	2	100	1	300	2	200	5		3	120	5		5		1	150	1	180	4	80			
198	39	54	162	1	2	200	1	50	1	150	3	450	2	150	2	150	2	60	2	60	1	150	1	300	2	200	5		2	120	2	120	2	300	5		1	150	3	360	4	80	
199	49	66	157	1	1	200	1	50	1	150	2	150	2	350	4	150	4	60	4	60	1	150	1	150	2	200	5		2	250	3	120	1	100	5		1	150	1	180	1	80	
200	52	92	176	100	1	200	2	200	5		5		5		5		5		5		1	150	1	150	2	100	5		2	120	3	120	2	100	3	200	1	150	1	180	2	160	
201	46	70	180	1	1	400	2	50	2	350	4	150	1	150	3	150	4	60	4	60	1	150	4	150	4	100	1	50	1	120			5		5		5		1	180	4	80	
202	46	70	168	100	1	150	2	200	1	150	2	150	2	150	2	150	2	60	4	60	2	100	1	150	2	200	5		2	250	4	120	5		5		1	150	1	180	5		
203	61	60	160	1	2	200	1	50	3	150	5		2	150	4	150	3	60	5		4	100	1	300	3	200	5		4	120	5		2	100	5		1	150	5		5		
204	54	80	168	1	5		4	50	1	350	5		2	150	4	150	3	60	3	60	1	100	1	150	2	200	5		5		4	120	5		5		1	150	1	180	5		
205	24	60	170	1	2	200	1	50	2	350	3	150	2	150	5		5		5		1	150	2	300	2	300	5		1	120	5		5		2	200	2	150	2	180	1	160	
206	43	70	163	100	1	200	1	50	1	150	4	150	2	350	4	150	2	120	2	60	1	100	1	150	2	200	1	50	2	120	4	120	4	100	5		2	150	2	500	4	80	
207	42	75	174	100	2	200	2	50	1	150	3	450	3	350	3	150	1	60	1	60	1	100	1	300	2	100	3	50	2	120	5		5		1	110	1	150	5		5		
208	35	75	170	1	2	150	2	50	1	350	2	150	3	150	3	150		60	4	60	1	100	1	300	2	100	5		2	120	2	120	4	100	5		1	150	2	360	2	80	
209	63	65	163	3	1	200	1	50	2	450	4	150	2	350	3	350	3	60	3	60	1	100	1	150	1	200	5		2	120	4	120	2	200	3	110	1	150	1	180	2	80	
210	39	95	182	1	1	150	1	50	2	450	3	150	2	150	3	150	3	60	5		1	100	1	300	2	100	4	50	5		4	120	2	100	5		1	150	3	360	4	80	

Resultados Individuales MDP - Preguntas 20 a 38

Datos personales					Preguntas																																						
	Edad	Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr				
1	43	102	178	1	5		4	230	5		5		4	80	5		5		5		4	80	4	100	1	50	5		1	360	2	300	5		5		5		5		5		
2	31	71	196	1	5		1	120	1	100	5		4	80	4	80	2	70	5		1		2	80	2	95	5		5		4	350	5		1	340	5		5		5		
3	29	68	164	1	5		1	130	1	80	5		5		1	70	5		5		1		4	80	5		4	50	1	700	5		5		5		1	350	5		5		
4	39	76,5	160	1	5		1	120	1	100	5		5		1	75	2	80	5		1		1	75	5		4	50	5		5		4		5		5		5		5		
5	26	102	160	1	5		1	340	1	200	5		5		5		5		5		1		5		5		5		5		4	400	5		1	370	5		5		5		
6	44	65	162	1	5		2	120	2	100	5		5		4		4	70	5		1		4	75	2	90	2	50	5		1	400	4	400	5		1	2000	5		5		
7	57	70	150	1	4	50	2	120	1	200	5		4	80	4	70	4	70	5		2		1	80	4	95	2	50	2	400	5		5		5		2	350	5		5		
8	58	81	176	1	3	50	1	120	1	100	5		4	80	3	180	4	70	5		1		2	80	2	90	2	50	2	400	4	400	4	350	4	200	1	700	5		5		
9	46	72	170	1	5		1	120	1	85	4	100	5		5		4	70	5		1		5		5		1	100	1	400	1	370	2	350	5		5		5		5		
10	61	72	170	3	5		1	360	1	360	2	100	5		1	70	4	70	5		1		2	80	1	90	5		5		5		5		5		5		2	350	1	1	
11	48	78	153	1	5		1	120	1	100	4	100	4	80	1	70	1	70	1		5		2	80	1	90	3	50	2	400	2	400	3	350	5		2	350	5		2		
12	18	60	170	1	5		5		1	100	1	100	3	80	2	70	5		5		1		3	80	1	95	2	50	2	700	5		2	700	2	200	1	350	5		5		
	53	96	176	1	2	50	1	360	4	85	4	100	5		5		4	70	5		4		2	80	4	95	5		5		5		1	320	5		2	600	5		2		
13	46	82	172	1	5		1	360	2	350	5		5		1		2	160	5		1		4		2	180	2	100	5		1	400	1	350	5		4	350	5		3		
14	27	78	178	1	5		2	120	2	100	5		5		5		5		5		1		5		5		2	100	1	350	5		2	700	5		1	300	5		5		
15	21	85	177	1	2	160	2	120	2	100	5		5		2	65	5		5		1		5		4	95	5		2	400	2	400	2	700	5		4	300	5		5		
16	51	83	170	1	5		1	360	1	350	5		5		1	60	5		2		1		5		2	90	1	100	1	350	5		2	700	5		5		5		5		
17	41	85	152	1	4	50	1	120	1	100	5		5		4	70	5		5		1		4	80	5		5		1	400	5		5		5		1	700	5		5		
18	36	64	165	1	5		1	120	1	100	5		5		5		4		5		1		3	80	4	100	3	100	5		5		2	700	5		1	700	5		5		
19	49	60	175	1	5		1	120	5		5		4	80	5		4	70	5		1		3	80	2	100	5		1	400	1	400	5		5		1		5		3		
20	57	62	159	1	4	50	1	120	5		4	100	5		1	70	4	70	5		1		2	80	4	100	5		5		1	400	1	350	5		1	350	5		4		
21	48	63	162	1	5		1	120	1	120	5		4		1	65	1	70	5		1		2	80	1	95	2	100	1	350	2	400	1	350	5		1	350	5		5		
22	41	83	175	1	5		2	360	1	350	3	300	3	80	1	70	2	70	5		1		1		1	90	3	100	1	350	2	350	2	340	5		2	350	2	350	5		5
23	39	79	175	1	3	50	1	120	2	100	2	100	5		1	65	1	65	5		1		2	150	2	180	5		5		1	350	1	350	2	200	4	350	5		5		
24	35	72	180	1	2	50	1	120	1	100	3	100	3	80	2	65	2	70	1		1		2	80	3	100	5		1	350	4	350	4	350	5		1	350	5		3		
25	30	78	166	1	5		1	120	1	120	4	100	5		4	65	4	70	5		1		5		2	90	2	100	1	350	1	700	1	500	5		1	350	5		2		
27	37	87	182	1	5		1	350	2	120	5		5		5		3	160	5		5		5		2	180	3	100	2	700	2	700	2	700	5		4	350	5		5		
28	33	85	179	1	4	50	1	350	1	350	5		5		5		2	160	5		1		4	80	4	90	2	100	1	350	5		2	340	5		1	350	5		5		
29	62	62	168	1	5		2	350	4	350	5		5		2	65	5		5		1		4	80	5		5		1	350	2	350	5		5		3	350	5		5		
30	45	72	170	1	5		1	120	4	120	4	100	3	200	2	66	3	70	5		1		3	150	5		4	150	5		5		1	350	5		2	1100	5		5		
31	25	77	174	1	5		4	120	4	350	3	100	5		2	70	1	70	1		1		4	80	5		5		1	350	5		2	700	5		1	700	5		5		
32	24	53	165	1	3	50	1	120	1	120	3	100	4	80	1	70	1	70	5		4		2	80	5		3	100	5		5		5		5		1	350	5		3		
33	22	75	180	1	5		2	120	5		4	100	4	80	1	70	2	70	5		1		2	80	2	300	2	100	5		5		2		5		3	350	5		5		
34	49	85	176	1	5		1	350	1	120	5		5		5		5		5		5		5		5		3	100	5		1	350	1	350	5		1	350	5		4		
35	23	67	165	1	5		1	120	5		5		5		5		4	70	5		1		3	80	2	90	2	100	2	700	2	700	2	350	5		1	350	5		5		
36	51	90	165	1	5		1	120	5		5		5		5		4	70	5		1		3	80	2	90	2	100	2	700	2	700	2	350	5		1	350	5		5		
37	23	63	170	1	2	50	2	350	2	350	1	100	5		5		5		5		1		5		4	90	3	100	2	700	2	350	2	350	5		5		5		1		
38	60	85	169	1	3	50	1	350	4	120	5		4	80	5		5		5		5		4	80	4	90	5		5		5		5		5		5		1	350	5		5
39	45	79	170	1	5		3	120	4	120	4	100	2	160	2	70	4	70	5		1		2	150	4	90	3	100	1	350	1	350	1	350	5		2	350	5		3		
40	33	71	167	4	2	250	1	120	1	120	4	100	4	80	1	70	1	70	5		1		4	80	4	90	3	100	2	350	5		2	350	5		1	350	5		4		
41	33	65	170	1	5		3	120	2	120	4	100	3	80	2	70	5		2		2		5		3	90	2	100	5		2	350	2	350	5		1	350	5		5		
42	24	79	175	1	2	250	2	350	4	120	5		3	160	5		4	70	5		1		4	80	2	400	2	150	1	350	4	350	4	350	5		1	350	5		5		
43	44	75	170	1	4	50	1	120	1	120	4	100	5		2	70	2	140	5		1		2	80	2	90	4	100	4	350	5		4	350	5		1	350	5		5		

Resultados Individuales MDP - Preguntas 20 a 38

Datos personales				Preguntas																																								
Nº	Edad		Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr				
44	50	66	160	1	5			1	120	2	120	5		3	80	4	70	5		5		1		4	80	5		5		2	350	5		5		5		2	350	5		3		
45	18	62	172	1	5			1	350	1	120	5		5		2	70	5		1		5		1		2		1	100	5		5		2	350	5		1	350	5		2		
46	33	72	165	1	5			5		5		5		5		4	70	5		1		2	150	4	90	3	100	5		5		5		2	350	5		2	350	5		5		
47	22	80	181	1	5			1	120	1	120	5		4	80	2	70	4	70	5		1		5		5		2	100	1	350	5		2	350	5		3	350	3	350	5		
48	34	54	150	1	2	160		1	120	1	120	4	100	5		1		5		1		5		3	80	5		4	100	1	350	4	350	4	350	5		2	350	5		5		
49	31	82	175	1	5			5		5		5		5		4	70	5		1		4	80	2	400	2	100	5		2	700	2	700	5		1	350	5		5	5		5	
50	45	88	168	1	5			1	120	4	120	5		4	80	5		4	70	5		1		4	80	4	90	5		4	350	3	350	5		5		2	350	5		5		
51	61	82	170	1	2	50	2	120	5		5		1	80	4	70	5		1		2		2	80	4	90	4	100	2	700	2	700	2	700	2	200	4	350	4	350	5		5	
52	20	75	176	1	3	50	4	120	4	120	5		4	80	5		3	140	5		1		4	80	3	90	4	100	4	350	5		2	350	5		2	350	5		5			
53	19	57	156	1	3	20	1	120	1	120	3	100	4	80	3	70	3	70	5		1		3	80	2	90	3	150	4	350	2	350	2	350	2	350	5		1	350	5		4	
54	60	73	165	4	5			1	120	2	120	5		5		4	70	1		5		4	80	5		5		2	700	4	350	5		5		4	350	4	350	5		5		
55	45	67	165	1	3	25	1	120	2	120	5		5		4	70	1	70	5		5		2	80	1	90	2	100	5		1	350	5		5		5		5	5		2		
56	28	89	189	1	3	25	1	120	1	120	5		5		3	70	4	70	5		1		4	80	3	90	4	100	1	350	5		2	700	5		1	350	5		5			
57	28	60	167	1	2	25	1	120	1	120	5		5		1	70	5		1		5		5		4	90	4	100	1	350	2	350	5		5		5		4	359	5			
58	45	95	180	1	1	20	1	120	4	120	5		5		2	70	1	70	2		1		2	80	5		2	150	4	350	2	350	5		5		1	350	5		5			
59	52	85	175	1	5			1	120	1	120	4	100	5		2	70	2	250	5		1		3	80	2	200	3	100	5		1	350	4	350	5		5		5	5		5	
60	47	74	170	1	5			1	120	1	120	3	100	5		5		5		5		1		4		4	90	2	100	1	350	5		1	350	5		1	350	5		5		
61	37	74	170	1	1	80	2	120	4	120	5		5		2	70	5		5		1		4	80	4	90	4	100	2	350	5		5		5		2	350	5		5			
62	53	64	164	3	5			1	120	1	120	1	100	4	80	1	70	4	70	5		5		4	80	4	90	2	100	5		1	350	1	350	1	350	1	340	5		1		
63	33	78	172	3	2	80	1	120	5		5		2	80	2	70	2	70	5		1		3	75	2	200	2	100	1	350	3	350	4	350	5		3	350	5		5			
64	19	70	169	1	3	80	1	120	1	120	2	100	3	80	1	70	2	70	5		5		3	80	3	90	3	100	5		5		2	350	5		5		5		1			
65	38	78	173	1	5			2	360	4	100	4	100	5		1	70	4	70	5		1		2	150	5		4	100	5		2	350	2	350	5		5		5	5		5	
66	38	110	186	1	5			1	240	5		5		3	80	1	70	2	70	5		1		2	150	1	90	2	100	1	350	1	350	5		5		1	350	5		5		
67	34	76	159	1	2	80	1	240	2	300	4	90	4	80	2	80	2	250	1		5		3	150	5		4	100	1	350	5		5		5		2	350	5		5			
68	46	74	186	1	5			2	120	2	100	5		3	80	5		4	70	5		1		3	80	5		2	100	1	350	2	350	2	700	5		1	350	5		2		
69	33	53	150	1	3	80	4	130	4	130	5		5		2	80	5		5		5		4	80	5		4	100	5		4	350	4	350	5		5		5	5		5		
70	37	93	178	1	5			1	240	3	120	5		5		1	80	1	70	5		1		2	80	5		4	100	5		2	350	2	350	5		2	350	5		5		
71	23	76	176	1	2	80	1	130	1	300	5		5		1	80	2	70	5		1		3	80	4	90	4	100	5		2	700	2	700	5		1	350	5		2			
72	62	85	178	1	4	80	1	200	1	120	2	200	4	80	2	80	4	70	5		5		4	80	4	90	2	100	5		5		2	350	5		1	350	5		4			
73	26	83	168	3	5			1	130	1	130	4	90	5		5		5		5		1		5		5		3	100	4	350	3	350	3	350	5		1	700	5		5		
74	27	97	190	1	2	80	2	130	3	120	5		5		2	70	5		5		1		5		5		5		3	350	4	350	4	350	4	350	5		1	350	5		5	
75	35	87	182	1	5			1	130	1	120	4	90	4	80	2	70	4	70	5		1		3	80	4	90	1	100	1	350	2	350	2	350	5		1	350	5		5		
76	47	90	157	1	1	80	2	240	2	200	5		5		2	70	2	160	1		5		4	80	4	90	4	100	3	350	4	350	4	350	5		1	360	5		5			
77	24	83	180	1	5			2	130	2	120	4	90	4	80	2	70	3	160	5		1		1	80	1	90	2	100	4	350	5		2	700	5		5		1	700	5		5
78	47	64	166	1	5			1	130	3	120	4	90	5		5		5		5		1		2	80-	5		5		4	350	1	350	5		5		5		5	5		5	
79	28	105	179	1	1	80	5		3	120	5		2	80	1	70	2	80	5		1		3	85	2	300	2	100	1	350	5		2	700	5		2	350	5		5	5		5
80	51	98	185	1	5			1	240	1	200	5		5		4	80	4	80	1		5		4	85	4	90	2	100	4	350	5		5		5		2	350	5		5		
81	47	79	168	1	2	80	1	140	1	120	4	90	4	80	4	70	5		5		1		3	85	4	90	1	100	5		1	350	1	350	5		1	350	1	350	5		5	
82	43	97	172	3	1	80	2	240	2	300	5		3	80	3	70	3	80	5		1		4	85	3	90	2	100	2	900	5		5		5		1	350	5		4			
83	33	80	170	1	5			1	130	1	120	5		5		3	70	3	80	5		1		1	85	4	90	2	100	1	350	1	350	2	700	5		1	350	5		5		
84	53	98	177	1	4	80	2	240	4	120	4	90	5		1	70	5		5		1		4	85	2	90	3	100	5		1	700	5		5		5		5	5		5		
85	43	67	167	1	2	80	2	240	3	120	5		4	80	4	70	4	80	5		5		3	80	3	90	5		5		5		5		5		5		5	5		5		
86	24	81	175	1	3	80	2	360	2	300	5		4	80	1	80	2	160	1		1		2	85	4	90	2	100	5		5		5		5		1	350	5		5			
87	18	64	175	1	5			2	360	5		5		5		5		2	250	5		1		4	85	5		4	100	4	350	3	350	3	350	5		1	350					

Resultados Individuales MDP - Preguntas 20 a 38

92	36	68	163	1	5		1	140	1	120	4	90	5		1	80	2	90	5		1	3	80	4	90	4	100	1	350	5		2	350	5		2	350	5		5	5		
93	29	78	174	1	1	90	2	120	2	300	5	5		5		5		5		1		5		5		5		5		1	700	5		1	350	5		5	5				
Datos personales				Preguntas																																							
Edad Peso Talla Cond.				20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38			
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr				
94	34	81	170	1	5		2	120	2	120	5		4	80	5		5		5		1		4	90	4	90	2	100	1	350	5		5		5		1	400	5		5		
95	18	72	170	1	5		1	240	1	120	1	90	2	90	2	90	2	90	5		1		2	90	1	90	1	100	5		5		2	2000	5		1	400	5		2		
96	44	70	168	1	2	90	1	120	1	120	4	90	4	90	1	90	5		5		1		4	80	1	90	2	100	1	350	2	700	2	700	5		3	350	5		5		
97	58	52	144	1	3	90	2	120	2	120	4	90	4	90	4	90	4	90	5		5		4	80	5		5		2	700	5		5		5		2	350	5		5		
98	48	62	156	1	1	90	1	120	1	120	5		5		2	90	5		5		1		3	80	5		5		5		5		5		5		5		5		5		
99	31	69	164	1	1	80	1	120	1	120	4	90	2	90	2	90	2	90	5		1		3	80	1	90	2	100	5		5		5		5		5		1	400	5		3
100	47	95	160	1	3	80	1	120	1	120	5		4	90	4	80	4	90	5		1		4	80	5		4	100	1	350	5		5		5		5		1	350	5		5
101	20	80	192	1	5		1	240	1	120	5		2	80	2	80	1	90	5		1		3	80	1	90	2	100	1	700	5		5		5		5		1	500	5		5
105	24	75	175	1	1	70	2	120	2	120	4	90	2	80	2	80	5		5		1		4	80	5		2	100	1	350	5		2	700	5		2	350	5		5		
106	55	64	170	1	5		1	120	1	300	5		2	80	2	80	2	90	5		1		4	80	4	90	4	100	5		1	350	5		5		5		5		5		
107	24	51	160	1	5		1	240	2	300	2	90	5		5		4	90	5		1		2	80	4	90	2	100	5		5		4	350	5		4	350	5		4		
108	47	98	175	1	3	70	1	120	1	120	4	90	3	80	1	90	1	90	5		1		2	90	4	90	2	100	5		1	350	4	350	5		2	350	5		4		
109	33	93	168	1	5		1	120	1	120	5		5		2	80	3	90	5		1		4	90	1	90	1	100	1	350	5		2	700	5		1	350	5		2		
110	27	66	160	1	2	70	1	120	1	120	5		5		1	90	4	90	1		5		4	90	1	90	4	100	1	350	5		5		5		5		5		5		
111	39	92	171	1	1	70	5		5		5		5		5		5		5		1		5		4	90	5		5		1	350	5		5		5		1	400	5		5
112	26	75	170	1	5		2	240	2	120	2	90	2	80	5		5		5		1		3	90	2	200	2	100	2	350	5		2	700	5		1	400	5		5		
113	48	78	175	1	3	70	1	120	1	120	5		5		2	90	3	90	5		4		4	90	5		4	100	1	350	1	350	5		5		5		1		5		2
114	47	89	180	3 Y4	5		1	240	1	120	4	90	5		1	90	4	90	1		5		2	150	1	90	5		5		2	350	2	350	5		5		5		5		1
115	23	65	164	1	5		2	120	2	120	5		5		2	90	2	90	5		1		2	150	1	90	4	100	5		5		2	350	5		2	350	5		5		5
116	45	78	158	1	5		2	120	5		5		5		1	90	3	80	5		1		4	90	1	90	3	100	5		5		5		5		4	350	5		5		
117	21	58	168	1	4	70	1	240	1	120	5		5		2	90	5		5		1		5		2	90	2	100	2	350	5		2	350	5		5		5		5		5
118	24	66	170	1	5		2	120	2	120	5		5		5		5		5		1		2	90	2	90	2	100	1	700	5		2	1000	5		2	350	5		5		
119	33	50	156	1	1	60	1	120	2	120	5		5		5		5		5		1		2	90	5		4	100	4	350	5		4	350	5		1	350	5		5		
120	33	120	183	3	1	50	1	240	1	120	5		5		1	80	4	80	5		1		4	90	5		2	100	1	350	1	350	5		5		1	450	5		5		
121	48	86	170	1	5		2	120	5		5		5		5		5		5		5		4	90	2	90	4	100	5		1	350	5		5		5		2	350	5		5
122	47	67	172	1	4	50	2	240	2	120	4	90	5		1	80	3	90	5		1		2	90	2	90	3	100	3	340	2	350	2	350	5		1	350	5		5		
123	32	71	162	1	1	50	1	240	1	120	4	90	5		4	80	2	90	5		1		4	90	2	90	2	100	5		4	350	4	350	5		1	350	5		5		
124	33	105	192	1	5		1	120	1	120	5		5		1	80	1	90	5		1		2	90	5		4	100	1	750	5		5		2	350	5		5		5		
125	23	81	172	1	1	50	1	240	1	300	5		5		2			5		1		4	90	1	90	5		5		5		5		5		2	400	5		5			
126	49	83	176	1	1	40	1	120	1	300	4	90	5		4	80	5		5		1		4	90	2	90	5		1	350	2	700	5		5		5		5		5		
127	33	115	180	1	1	30	2	120	2	300	5		4	80	2	80	4	90	5		1		2	150	2	200	2	100	1	700	5		5		5		2	400	5		5		
128	41	87	180	1	1	40	3	120	5		5		5		2	90	5		5		1		3	90	1	90	1	100	5		1	350	5		5		2	350	5		5		
129	41	95	174	4	5		2	240	2	300	5		5		1	80	5		5		1		4	90	5		4	100	5		4	350	4	350	5		2	350	5		5		
130	32	100	170	1	5		2	240	2	300	5		5		1	80	2	90	5		1		4	90	4	90	2	100	1	350	5		2	350	5		1	400	5		5		
131	26	78	180	1	5		1	300	1	300	5		5		2	80	5		5		1		5		5		4	100	4	340	2	350	2	350	5		1	350	5		2		
132	34	67	170	1	2	160	1	120	1	120	5		4	90	1	80	2	160	5		1		2	80	4	90	4	100	5		5		5		5		5		1	350	5		5
133	44	84	167	1	5		1	450	1	450	4	80	3	80	2	80	3	90	2		1		3	90	3	90	2	150	3	350	1	350	3	700	5		3	350	5		4		
134	56	67	170	1	5		1	300	4	300	5		5		2	80	5		5		1		4	80	4	90	5		2	350	1	350	5		5		1	350	5		5		
135	34	70	169	1	5		1	120	5		5		5		2	80	1	90	5		1		2	80	1	90	1	150	5		5		5		5		1	450	5		5		
136	35	75	171	1	1	50	2	120	2	120	5		5		5		5		5		5		5		4	90	1	100	5		2	350	2	350	5		1	350	5		5		
137	21	85	185	1	5		1	300	1	120	5		2	90	5		2	90	5		1		3	250	1	90	1	100	5		5		5		5		5		1	350	5		5
138			170	1	5		5		2	120	5		5		5		5		5		5		4	80	3	90	2	100	5		5		2	700	5		2	350	5		5		
139	57	78	169	1	5		1	120	1	120	3	80	5		5		5		5		1		5		2	90	3	100	5		5		1	700	5		5		5		5		
140	41	60	157	1	1	50	2																																				

Resultados Individuales MDP - Preguntas 20 a 38

143	36	90	170	1	5			1	120	1	120	5		2	90	5		3	90	5		1		4	80	1	90	2	100	1	350	5		1	700	5		1	350	5		5
144	33	73	182	1	5			1	300	1	300	5		5		1	80	1	90	5		1		2	80	2	90	3	100	1	350	5		2	350	5		1	350	5		5
145	24	74	180	1	5			2	120	1	120	3	80	5		2	80	2	90	5		1		4	80	1	90	1	100	1	350	5		4	350	5		1	400	5		5

Datos personales					Preguntas																																						
Nº	Edad	Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		
					Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr			
146	42	44	176	1	1	50	1	300	1	300	5		5		3	90	3	90	5		1		4	80	2	90	3	100	5		2	350	2	350	5		1	350	5		2		
147	43	63	165	1	1	50	1	300	1	120	5		5		1	90	5		5		1		2	90	1	90	4	90	5		1	350	2	350	5		4	350	5		5		
148	53	93	172	1	3	50	1	120	1	120	2	80	5		2	90	2	90	5		1		3	80	1	90	2	90	2	350	2	350	5		5		5		5		4		
149	24	65	169	1	5		1	120	1	120	5		5		1	90	4	90	5		5		2	80	1	90	4	90	2	340	5		5		5		5		5		5		
150	21	82	158	1	5		1	120	1	120	5		5		5		5		5		1		5		1	90	3	90	2	340	5		3	350	5		1	350	5		5		
151	25	76	169	1	5		1	300	1	300	5		5		5		5		5		1		5		1	80	1	90	1	320	5		2	350	5		1	350	5		5		
152	28	68	173	1	5		2	120	1	120	1	80	5		2	90	5		1		5		4	80	4	80	4	90	1	320	2	340	5		5		5		5		5		
153	45	90	157	1	2	40	1	120	1	120	5		5		1	90	5		1		1		2	100	2	80	5		5		5		5		5		1	350	4	350	4		4
154	50	60	160	1	1	50	1	120	1	120	5		2	90	4	90	2	90	5		1		3	90	1	80	2	90	1	360	5		5		5		2	350	5		5		
155	37	88	169	1	2	50	1	120	1	120	4	80	4	90	1	90	5		1		5		3	90	5		2	90	5		5		5		2	350	5		4		4		
156	64	94	170	1	5		1	120	1	120	5		5		5		5		1		5		4	90	5		5		1	350	1	340	5		5		5		5		1		
157	46	118	170	1																																							
158	59	80	166	1	2	80	1	120	1		5	0	5	0	1	5	0	1		5		5	0	5	0	5	0	1	350	1	350	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	
159	34	90	178	1	3	80	5	0	1	100	1	100	5	0	5	0	1	80	5		1		2	75	4		2	50	5	0	5		5	0	5	0	1	350	5	0	5		
160	33	110	169	4	5	0	1	120	1	100	5	0	5	0	1	90	5	0	1		5		2	75	2		2	50	1	0	5		3	350	5	0	5	0	1	700	5		5
161	48	110	165	100	5	0	1	240	1	100	5	0	5	0	5	0	4	80	5		1		3	75	1	200	3	50	5	0	5		5	0	5	0	1	350	5	0	4		4
162	44	65	159	1	2	80	1	360	1	200	4	100	2	80	5	0	5	0	5		1		4	75	4		2	50	3	350	1	350	2	350	5	0	1	700	5	0	5		
163	39	160	186	1	2	80	3	120	3	100	3	100	3	80	1	90	1	80	1		1		2	75	1	200	2	100	1	0	5		5	0		1	2000	5	0	5		5	
164	52	63	163	100	5	0	1	120	1	100	5	0	5	0	5	0	5	0	5		1		3	75	4	100	2	50	5	0	2	350	2	350	5	0	2	350	5	0	5		5
165	25	80	169	1	1	80	1	120	1	100	5	0		80	2	90	5	0	5		1		3	75	1	100	2	50	5	0	5		3	350	5	0	1	2000	5	0	5		5
166	38	61	164	1	5	0	5	0	5	0	5	0	3	80	5	0	5	0	5		1		3	75	1	100	4	50	5	0	5		5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	2
167	19	68	166	1	5	0	1	360	1	300	5	0	2	80	5	0	1	80	5		1		75	1	100	2	50	5	0	5		5	0	5	0	1	700	5	0	5		5	
168	29	70	165	100	4	80	2	120	2	100		5	0	1	90	1	80	5		1		3	75	100	2	50	1	0	5		5	0	5	0	1	1100	5	0	2		2		
169	31	62	173	1	2	80	2	120	2	100	2	200	5	0	1	90		80	5		5		2	75	1	100	2	50	2	0	5		5	0	5	0	1	350	5	0	2		2
170	24	71	179	1	4	80	2	120	3	100	5	0	5	0	1	90	1	80	5		1		4	75	2	100	2	50		0	5		5	0	5	0	1	350	5	0	5		5
171	25	91	165	1	2	80	1	120	1	100	5	0	5	0	5	0	1	80	5		1		2	75	5	0	5	0	5	0	2	350	2	350	5	0	1	700	5	0	5		5
172	38	89	180	100	2	80	3	240	3	100	5	0	3	80	1	90	2	80	5		1		2	75	5	0	2	50		350	1	350	1	350		2	350	5	0	5		5	
173	37	60	170	1	2	80	1	120	1	100	5	0	2	80	2	90	2	80	5		1		3	75	2	100	2	50	2	0	5		5	0	5	0	5	0	5	0	5		5
174	54	65	157	100	1	80	1	240	1	100	4	100	5	0	2	90	5	0	1		1		4	75	4	100	5	0	5	0	2	350	5	0	5	0	2	350	5	0	5		5
175	23	61	174	1	5	0	2	120	2	100	5	0	5	0	4	90	4	80	5		1		4	75	4	100	4	50	2	0	5		3	700	5	0	2	350	5	0	2		2
176	47	70	156	1	5	0	2	240	2	200	5	0	5	0	5	0	5	0	5		1		5	0	5	0		5	0	2	350	5	0	5	0	1	700	5	0	5		5	
177	24	50	167	1	5	0	2	360	2	300	5	0	5	0	2	270	2	250			1		4	75	1	100		50	5	0	2	350	2	350	5	0	1	700	5	0	5		5
178	35	78	180	100	5	0	1	120	1	100	5	0	5	0	1	90	1	80	5		1		4	75	5	0	5	0	5	0	2	350	2	350	2	200	1	700	5	0	5		5
179	53	70	168	1	5	0	1	360	1	100		100	3	80	2	90	3	80	5		1		2	75	5	0	5	0	2	350	1	350	5	0	5	0	5	0	5	0	4		4
180	32	80	170	1	2	80	2	120	2	100	5	0	5	0	2	90	3	80	5		1		3	75	4	100	3	50	1	0	5		5	0	5	0	2	350	5	0	5		5
181	45	70	165	1	5	0	1	240	1	100	5	0	5	0	1	90	1	80	5		1		1	75	5	0	2	50	1	0	5		1	350	5	0	1	350	5	0	2		2
182	48	72	169	1	5	0	1	120	1	100		5	0	1	90	1	80	5		1		3	75	4	100	2	50	5	0	1	350	1	350	5	0	4	350	5	0	5		5	
183	25	62	157	1	1	80	1	120	1	100	5	0	3	80	1	90	5	0	5		1		1	75	1	100	2	50	1	0	5		5	0	5	0	1	700	5	0	5		5
184	22	74	167	1	2	80	1	120	1	100	4	100	3	80	2	90	5	0	5		1		5	0	3	100	5	0	1	0	5		5	0	5	0	3	350	5	0	5		5
185	50	85	179	1	2	80	4	120	5	0	5	0			5	0	5	0	5		1		3	75	5	0	5	0	1	0	5		5	0	5	0	2	350	5	0	5		5
186	44	117	182	100	1	80	2																																				

Resultados Individuales MDP - Preguntas 20 a 38

191	24	89	178	1	2	80	1	120	1	100	5	0	5	0	1	180	5	0	5	1	3	75	5	0	3	100	1	0	5	5	0	5	0	1	350	5	0	1			
192	31	77	165	1	5	0	2	120	2	100	4	100	3	80	2	360	2	350	5	1	2	75	5	0	3	50	2	0	5	3	350	5	0	1	350	5	0	5			
193	28	76	175	1	2	80	1	360	1	100	5	0	2	280	1	90	1	80	5	1	2	75	2	100	3	50	1	0	5	5	0	5	0	1	700	5	0	4			
Datos personales				Preguntas																																					
	Edad	Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr		
195	26	73	170	1	2	80	1	120	2	100	5	0	5	0	1	90	3	80	5	1	4	75	1	100	3	50	1	0	5	2	700	5	0	1	700	5	0	5			
196	22	80	186	1	5	0	2	240	2	100	4	100	2	160	4	90	2	80	5	1	4	75	1	100	2	100	1	0	5	2	700	5	0	1	700	5	0	3			
197	32	56	160	1	3	80	1	360	1	200	4	100	5	0	2	90	2	80	5	1	5	0	2	100	2	50	5	0	5	2	700	5	0	1	700	5	0	5			
198	39	54	162	1	1	80	1	120	1	100	5	0	5	0	1	90	1	80	5	1	2	150	2	300	4	50	2	0	5	2	350	5	0	2	700	5	0	5			
199	49	66	157	1	2	80	1	240	1	100	5	0	5	0	1	90	5	0	1	4	4	75	5	0	2	100	5	0	1	350	1	350	5	0	5	0	5	0	5		
200	52	92	176	100	2	160	1	360	1	300	2	100	5	0	1	90	3	80	5	1	2	75	2	100	4	50	1	0	5	2	350	5	0	1	700	5	0	5			
201	46	70	180	1	5	0	1	120	1	100	5	0	5	0	1	90	5	0	1	5	5	0	1	100	3	50	1	0	5	1	350	5	0	5	0	5	0	5	0	5	
202	46	70	168	100	1	80	1	240	1	100	5	0	5	0	1	90	2	80	5	1	3	75	2	200	2	50	1	0	5	2	350	5	0	2	700	5	0	5			
203	61	60	160	1	5	0	1	360	4	100	5	0	5	0	1	90	5	0	1	5	5	0	5	0	5	0	1	350	1	350	5	0	5	0	5	0	5	0	3		
204	54	80	168	1	1	80	1	240	1	100	4	100	3	80	1	90	5	0	5	5	3	75	1	100	3	50	5	0	1	350	5	0	5	0	5	0	1	6	5		
205	24	60	170	1	1	160	1	120	1	100	2	100	2	80	1	90	5	0	5	5	5	0	1	100	2	50	1	0	5	5	0	5	0	1	1100	5	0	5			
206	43	70	163	100	2	80	2	240	2	100	5	0	3	80	1	90	3	80	1	5	4	75	2	100	3	50	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	
207	42	75	174	100	5	0	5	0	2	100	5	0	80	2	180	2	80	5	1	1	1	75	2	100	2	250	5	0	4	700	4	700	5	0	1	350	5	0	5		
208	35	75	170	1	5	0	2	120	2	100	5	0	5	0	1	90	1	80	5	5	3	75	2	100	50	5	0	5	2	350	5	0	1	350	5	0	5				
209	63	65	163	3	4	80	1	240	1	200	4	100	5	0	1	90	3	80	1	5	4	75	4	100	4	50	5	0	1	350	5	0	5	0	2	350	5	0	3		
210	39	95	182	1	3	80	1	120	1	100	5	0	5	0	1	90	5	0	5	1	3	150	2	100	2	50	5	0	2	350	2	350	5	0	1	700	4	700	5		

Resultados Individuales MDP - Preguntas 20 a 38

8
Gr
100
100
200
200
100
100
100
100
100
100
100
100
100

Resultados individuales MDP - Preguntas 39 a 43 y OTA

Datos personales					Preguntas										N° CIM	Resultado de OA ng/ml
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		41		42		43			
N°	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr		
1	43	102	178	1	1	50	4	15	1	15	4	30	3	60	8961	0
2	31	71	196	1	2	100	5		1	30	2	30	5		8962	0
3	29	68	164	1	2	50	1	30	5		4	26	5		9293	0
4	39	76,5	160	1	1	45	4	20	1	30	4	30	5			
5	26	102	160	1	2	90	4	30	1	70	5		5		9294	0
6	44	65	162	1	4	50	4	30	1	140	5		5		9403	0
7	57	70	150	1	2	50	1	15	1	140	4	30	5		9434	0
8	58	81	176	1	2	100	2	30	1	140	2	30	5		9435	0
9	46	72	170	1	2	100	4	30	1	200	4	30	5		9436	0
10	61	72	170	3	2	100	4	15	1	200	4	30	5		9437	0
11	48	78	153	1	2	100	1	30	1	200	2	30	4	80	9438	0,0190
12	18	60	170	1	5		1	30	1	200-	5		5		9519	0,0880
	53	96	176	1	2	50	4	15	1	150	5		5			
13	46	82	172	1	2	50	2	30	1	200	5		5		9439	0,0510
14	27	78	178	1	5		4	12	1	200	5		5		9484	0,0510
15	21	85	177	1	3	50	5		1	150	5		5		9485	0,0500
16	51	83	170	1	2	100	4	12	1	70	5		5		9486	0
17	41	85	152	1	2	50	5		5		5		5		9487	
18	36	64	165	1	2	100	4	12	1	200	5		5		9514	0
19	49	60	175	1	2	100	5		1	200	5		5		9515	0,1010
20	57	62	159	1	4	50	4	12	1	150	4	30	5		9516	0,1133
21	48	63	162	1	2	100	1	12	1	70	2	30	4	100	9517	0,0410
22	41	83	175	1	2	100	1	15	1	150	2	30	5		9518	0
23	39	79	175	1	2	100	2	30	1	150	2	60	5			
24	35	72	180	1	2	100	2	25	1	70	5		5		9597	0,0430
25	30	78	166	1	5		4	12	1	200	4	60	5		9598	0
27	37	87	182	1	2	200	5		1	300	2	60	5		9599	0
28	33	85	179	1	2	100	2	12	1	300	5		5		9600	0
29	62	62	168	1	1	50	3	12	1	200	5		4	100	9601	0
30	45	72	170	1	2	200	2	30	1	70	2	60	5		9602	0,2996
31	25	77	174	1	2	200	1	12	1	70	5		5		9681	0,3028
32	24	53	165	1	3	200	5		2	70	1	60	5		9682	0
33	22	75	180	1	2	200	2	30	1	200	2	30	5		9683	0
34	49	85	176	1	2	200	5		1	200	5		4	100	9684	0
35	23	67	165	1	2	100	4	30	1	200	1	60	5		9691	0,1287
36	51	90	165	1	2	100	4	30	1	200	1	60	5		9692	1,2674
37	23	63	170	1	3	50	2	30	1	70	4	60	5		9693	0,0590
38	60	85	169	1	2	100	5		1	250	5		5		9694	0,0730
39	45	79	170	1	2	50	2	30	1	300	3	30	5		9703	0
40	33	71	167	4	2	50	1	12	1	70	2	30	5		9714	2,3498
41	33	65	170	1	3	50	3	12	1	70	3	30	5		9715	0,0400
42	24	79	175	1	2	200	5		1	70	4	30	4	100	9716	0,1422
43	44	75	170	1	2	50	1	12	1	200	4	12	5			
44	50	66	160	1	2	100	5		1	200	5		4	100	9717	0,0610

Resultados individuales MDP - Preguntas 39 a 43 y OTA

Datos personales				Preguntas											N° CIM	Resultado de OA ng/ml
Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		41		42		43				
N°	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr
45	18	62	172	1	2	200	2	30	1	200	4	12	4	100	9718	0,0800
46	33	72	165	1	4	50	5		1	70	5		4	100	9719	0,0730
47	22	80	181	1	3	50	1	12	1	70	5		4	100	9749	2,7553
48	34	54	150	1	2	50	1	12	1	200	5		5		9750	0,1070
49	31	82	175	1	2	100	4	12	1	200	5		5		9751	0,1394
50	45	88	168	1	2	50	5		1	70	5		5		9752	0,1647
51	61	82	170	1	2	100	5		1	70	5		5		9753	0,1473
52	20	75	176	1	2	200	4	12	1	70	5		5		9754	0,0850
53	19	57	156	1	2	200	2	12	1	200	2	30	5		9757	0,0579
54	60	73	165	4	2	200	1	12	1	200	5		5		9758	0,1231
55	45	67	165	1	1	50	4	12	1	200	5	5			9759	0
56	28	89	189	1	2	50	1	12	2	200	5		5		9760	0
57	28	60	167	1	2	200	5		1	70	5		5		9763	0,2771
58	45	95	180	1	2	100	4	12	1	70	4	30	5		9764	0,2522
59	52	85	175	1	2	200	4	12	1	70	5		5		9765	0,9692
60	47	74	170	1	2	200	1	12	1	70	5		5		9766	0,7248
61	37	74	170	1	3	100	4	12	1	70	5		5		9777	0
62	53	64	164	3	2	100	1	12	1	70	2	30	5		9778	0
63	33	78	172	3	2	200	5		1	200	2	30	5		9779	0
64	19	70	169	1	2	200	5		5		2	30	3	90	9780	0,5544
65	38	78	173	1	2	50	1	12	2	70	5		5		9790	0,6701
66	38	110	186	1	2	100	5		1	200	5		5		9791	0,3287
67	34	76	159	1	2	50	1	14	1	220	3	60	5		9792	0,7000
68	46	74	186	1	2	100	5		1	70	3	60	4	100	9793	0
69	33	53	150	1	2	220	1	12	1	100	4	30	5		9810	0,2756
70	37	93	178	1	3	100	2	14	1	200	2	30	5		9811	1,3679
71	23	76	176	1	5		5		1	200	5		5		9812	1,8785
72	62	85	178	1	4	100	5		1	200	3	30	5		9813	0
73	26	83	168	3	2	100	4	15	1	140	5		5		9814	0,4773
74	27	97	190	1	2	100	1	12	1	120	4	30	5		9815	0,1150
75	35	87	182	1	2	100	1	12	1	200	4	30			9825	0
76	47	90	157	1	2	100	2	20	1	200	3	30	4	100	9826	0
77	24	83	180	1	2	100	4	12	1	150	4	30	5		9827	0
78	47	64	166	1	2	150	1	12	1	200	5		5		9828	0
79	28	105	179	1	2	220	1	14	1	70	1	30	4	90	9829	0
80	51	98	185	1	2	100	4	14	1	70	5		5		9842	0,7885
81	47	79	168	1	2	220	5		1	220	5		5		9843	0,4882
82	43	97	172	3	2	100	2	20	1	70	5		5		9844	0,5341
83	33	80	170	1	2	220	4	14	1	140	4	30	5		9845	1,0833
84	53	98	177	1	2	220	2	20	1	140	4	30	4	90	9846	0
85	43	67	167	1	2	210	3	14	1	140	5		5		9847	0,2234
86	24	81	175	1	1	100	2	15	1	200	2	30	5		9848	0,1205
87	18	64	175	1	2	220	1	13	1	200	2	30	5		9849	0,1576
88	18	72	182	1	2	220	2	14	1	200	5		5		9850	0
89	41	70	168	1	5		5		1	200	2	30	5		9869	0
90	43	78	170	1	2	200	5		1	140	3	30	5		9870	0,4395
91	32	50	165	1	2	100	4	13	1	200	5		5		9871	0
92	36	68	163	1	1	100	1	14	1	140	3	30	5		9887	0
93	29	78	174	1	2	100	5		1	140	5		5		9888	0,8033

Resultados individuales MDP - Preguntas 39 a 43 y OTA

Datos personales					Preguntas										N° CIM	Resultado de OA ng/ml
N°	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		41		42		43			
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr
94	34	81	170	1	2	200	5		1	220	5		5		9889	0,2692
95	18	72	170	1	2	200	1	14	1	70	2	30	5		9894	0,4459
96	44	70	168	1	2	220	5		1	220	5		5		9895	0
97	58	52	144	1	4	100	5		1	70	4	15	5		9896	0,0950
98	48	62	156	1	2	220	5		1	220	5		5		9897	0
99	31	69	164	1	3	200	3	15	1	70	5		5		9898	1,0587
100	47	95	160	1	2	220	5		1	140	4	15	5		9899	5,3571
101	20	80	192	1	1	100	1	14	1	70	5		5		9900	1,2080
105	24	75	175	1	2	220	5		1	220	1	20	5			
106	55	64	170	1	2	200	2	30	1	140	4	15	5		9901	0
107	24	51	160	1	4	100	3	30	1	140	2	15	5		9902	0
108	47	98	175	1	2	100	2	14	1	220	5		5		9903	0,7310
109	33	93	168	1	2	100	5		1	140	3	15	5		9904	0,1923
110	27	66	160	1	2	220	1	14	1	220	2	15	5		9905	3,0000
111	39	92	171	1	2	200	4	30	1	220	5		5		9906	0,5943
112	26	75	170	1	2	200	1	30	5		2	15	5		9907	0,8857
113	48	78	175	1	2	100	2	14	1	220	2	15	5		9908	0
114	47	89	180	3 Y4	2	200	1	14	1	220	2	15	5		9909	0,1843
115	23	65	164	1	2	200	5		1	140	4	20	5		9910	0
116	45	78	158	1	2	200	1	14	1	200	5		5		9911	0,2444
117	21	58	168	1	2	100	4	15	1	200	2	15	5		9912	0
118	24	66	170	1	2	100	5		1	100	2	15	5		9913	0
119	33	50	156	1	2	220	1	14	2	200	2	15	5		9914	0
120	33	120	183	3	1	100	5		1	200	5		5		9915	0,1125
121	48	86	170	1	2	200	5		1	200	5		5		9916	0,3333
122	47	67	172	1	2	200	2	14	1	220	5		5		9917	0,4385
123	32	71	162	1	2	100	5		1	200	4		5		9918	0,0169
124	33	105	192	1	2	220	1	14	1	220	5		4	90	9919	0,0910
125	23	81	172	1	2	100	4	15	5		1	16	5		9920	0,2358
126	49	83	176	1	2	200	1	14	1	220	2	15	5		9921	0,1144
127	33	115	180	1	2	200	5		1	220	5		5		9922	0
128	41	87	180	1	2	200	5		1	220	5		5		9923	0,1788
129	41	95	174	4	2	200	5		1	70	2	30	5		9930	0,1117
130	32	100	170	1	2	200	5		1	200	5		5		9931	0,1334
131	26	78	180	1	1	100	4	15	1	220	2	30	5		9932	0,2653
132	34	67	170	1	2	200	4	14	1	200	3	15	5		9933	0,4331
133	44	84	167	1	2	200	1	15	1	220	4	30	4	90	9947	0,4222
134	56	67	170	1	4	100	5		1	70	5		5		9948	0
135	34	70	169	1	2	100	1	15	1	70	2	15	5		9949	0,1661
136	35	75	171	1	2	220	5		1	70	5	5			9950	0,7194
137	21	85	185	1	2	200	1	15	1	220	2	15	5		9955	0
138			170	1	5		5		1	220	5		5		9956	0
139	57	78	169	1	2	100	5		1	220	5		5		9957	0,2220
140	41	60	157	1	2	100	2	15	1	220	3	15	5		9958	0,1720
141	48	120	187	1	1	100	1	15	1	220	5		5		9960	0,4083
142	33	90	157	1	2	100	5		1	140	2	15	5		9961	0,1413
143	36	90	170	1	2	200	5		1	220	5		5		9962	0,1126
144	33	73	182	1	2	100	1	30	1	70	5		3	80	9963	0,2730
145	24	74	180	1	2	100	5		1	140	2	15	5		9964	0,2017

Resultados individuales MDP - Preguntas 39 a 43 y OTA

Datos personales				Preguntas											N° CIM		Resultado de OA ng/ml
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		41		42		43		Fr	Gr	
N°	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	
146	42	44	176	1	3	200	4	15	1	140	4	15	5		9965	0	
147	43	63	165	1	2	150	2	30	1	140	5		5		9970	8,4296	
148	53	93	172	1	2	200	2	14	1	140	2		5		9971	0	
149	24	65	169	1	2	100	1	15	1	220	2	15	5		9972	0	
150	21	82	158	1	2	100	5		1	220	3	14	5		9973	0,4791	
151	25	76	169	1	5		5		1	220	5		5		9975	0,7066	
152	28	68	173	1	2	100	4	14	1	140	2	14	5		9976	0,0220	
153	45	90	157	1	2	100	5		1	140	2	14	5		9977	0,0440	
154	50	60	160	1	2	100	1	15	1	220	5		5		9978	0,2750	
155	37	88	169	1	2	100	5		1	220	3	15	5		9979	0,2080	
156	64	94	170	1	3	100	5		1	140	5		5		9980	0	
157	46	118	170	1											9991	0	
158	59	80	166	1	4	50	1	30	1	30	2		5	0	9992	0	
159	34	90	178	1	2	50	1	30	1	140	1	30	5	0	9993	0	
160	33	110	169	4	2	50	2	30	5	0	5	0	5	0	9994	2,4023	
161	48	110	165	100	2	50	1	30	1	70	5	0	5	0	9995	0,1720	
162	44	65	159	1	2	50	2	30		70	2	30	5	0	9996	7,9129	
163	39	160	186	1	2	200	1	140	1	140	2	30	5	0	9997	0,1017	
164	52	63	163	100	2		1	140	1	200	5	0	5	0	9998	0	
165	25	80	169	1	2	200	4	30	1	200	2	30	5	0	9999	0,2866	
166	38	61	164	1	2	200	5	0	1	200	5	0	5	0	20000	0,1077	
167	19	68	166	1	2	50	2	30	1	70	1	30	5	0	20044	0	
168	29	70	165	100	2		1	30	1	70	5	0	5	0	20045	0,3388	
169	31	62	173	1	2	50	5	0	1	140	3	30	5	0	20046	0	
170	24	71	179	1	2	50	5	0	1	140	2	30	5	0	20047	0	
171	25	91	165	1	2	50	1	30	1	30	5	0	5	0	20075	0,1611	
172	38	89	180	100	2		5	0	1	140	5	0	5	0	20076	0,1683	
173	37	60	170	1	2	50	5	0	1	140	2	30	5	0	20077	0,2785	
174	54	65	157	100	2		5	0	1	140	5	0	5	0	20078	0,0260	
175	23	61	174	1	2	50	5	0	1	30	1	30	5	0	20079	0	
176	47	70	156	1	4	50	5	0	1	70	5	0	5	0	20080	0	
177	24	50	167	1	2	50	5	0	1	140	2	60	5	0	20081	0,0840	
178	35	78	180	100	2		2	70	1	140	5	0	5	0	20082	0,0520	
179	53	70	168	1	4	50	3	70	1	140	4	30	5	0	20083	0,6920	
180	32	80	170	1	2	200	2	30	1	200	5	0	5	0	20084	47,6388	
181	45	70	165	1	1	50	5	0	1	140	2	30	5	0	20085	0,1739	
182	48	72	169	1	2	50	1	30	1	30	5	0			20086	0,2069	
183	25	62	157	1		50	5	0	1	140	5	0	5	0	20113	0,2839	
184	22	74	167	1	4	50	1	30	2	70	5	0	5	0			
185	50	85	179	1	2	50	5	0	1	200	5	0	5	0	20115	0	
186	44	117	182	100	2				1	30	3	30	5	0	20116	0,2232	
187	26	65	172	1	2	50	3	70	1	140	2	30	5	0	20117	0	
188	64	82	170	1	4	50	5	0	1	200	5	0	5	0	20118	0,4034	
189	60	85	178	100	2		5	0	1	140	5	0	5	0	20119	0,0580	
190	51	84	180	100	2		5	0	1	140	4	30	5	0	20120	1,1394	
191	24	89	178	1	2	50	5	0	1	70	5	0	5	0	20121	0,2400	
192	31	77	165	1	2	50	3	30	1	140	2	30	5	0	20145	0	
193	28	76	175	1	2	50	3	30	1	70	1	30	5	0	20146	0	

Resultados individuales MDP - Preguntas 39 a 43 y OTA

Datos personales				Preguntas											N° CIM		Resultado de OA ng/ml
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		41		42		43		Fr	Gr	
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	
195	26	73	170	1	5	0	2	30	1	30	5	0	5	0	20147	0,9530	
196	22	80	186	1	4	50	2	30	1	200	1	30	5	0	20148	0	
197	32	56	160	1	2	50			1	70	5	0	5	0	20149	1,2475	
198	39	54	162	1	2	50	4	30	1	140	2	60	5	0	20150	0	
199	49	66	157	1	4	50	1	70	1	200	5	0	5	0	20151	0	
200	52	92	176	100	2		2	30	1	30	5	0	5	0	20152	3,3571	
201	46	70	180	1	4	50	1	30	1	140	5	0	5	0	20165	0	
202	46	70	168	100	2		5	0	1	200	1	30	5	0	20166	0,119	
203	61	60	160	1	5	0	5	0	1	200	5	0	5	0	20167	0,1766	
204	54	80	168	1	4	50		30	1	70	2	30	5	0	20168	0,2941	
205	24	60	170	1		50	2	70	1	200	5	0			20219	0	
206	43	70	163	100	2		5	0	5	0	2	110	5	0	20220	2,8710	
207	42	75	174	100	2		2	70	1	200	2	60	5	0	20221	0,4537	
208	35	75	170	1	2	50	1	30	1	70	5	0	5	0	20222	0	
209	63	65	163	3	2	50	2	30	1	140	3	30	4	100	20251	0	
210	39	95	182	1	2	50	1	30	1	200	2	30	5	0	20252	0,2284	

Resultados Individuales GR - Preguntas 1 a 19

Datos personales					Preguntas																																									
Nº	Edad		Peso		Talla		Cond.		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19	
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr		
1	36	71	165	1	4	150	4	50	1	150	2	150	2	150	5		5		2	120	2	100	1	300	1	100	5		2	120	2	250	5		5		2	150	1	180	3	80				
2	39	115	175	1	2	200	1	200	1	450	4	450	2	450	5		5		5		1	100	1	450	2	200	2	100	4	120	2	250	4	100	5		2	150	2	360	2	160				
3	36	84	172	1	5		2	50	1	350	5		2	350	5		5		5		1	100	1	150	2	200	5		2	250	3	250	5		5		2	150	1	360	3	80				
4	46	70	168	1	2	200	3	200	1	150	3	150	3	350	5		5		5		2	100	1	300	3	100	5		1	250	3	250	4	100	5		2	300	2	360	2	80				
6	36	67	160	1	2	200	2	200	1	150	3	150	2	150	5		5		2	60	1	100	1	300	2	100	5		2	120	3	120	5		5		2	150	2	180	3	80				
7	37	67	168	1	2	200	1	200	1	350	3	350	2	350	5		1	60	1	60	1	100	1	150	2	100	2	50	5		5		5		1	300	1	360	5							
8	23	65	160	1	1	200	2	200	1	150	4	150	2	150	5		5		2	60	2	100	1	300	1	100	5		2	250	4	120	5		5		2	150	2	360	2	80				
9	23	80	172	1	2	150	2	200	1	150	5		2	350	5		3	60	2	60	1	100	1	150	2	100	5		2	120	3	120	4	100	5		3	150	2	180	3	80				
12	38	70	160	1	1	400	1	200	1	150	5		5		5		5		2	180	5		1	450	2	200	5		2	250	2	250	5		5		1	300	2	180	5					
13	47	60	165	1	1	200	2	50	1	150	4	150	2	350	3	150	5		3	120	5		1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		1	150	1	180	3	80				
14	44	73	170	1	1	150	2	200	2	350	4	150	2	350	4	350	3	60	2	120	1	150	5		2	100	5		2	120	5		5		5		2	300	1	360	5					
16	44	86	170	1	2	200	2	50	1	150	5		3	150	5		5		3	120	2	100	2	150	2	100	3	50	2	120	5		5		5		2	150	3	180	3	80				
17	38	90	180	1	2	200	3	200	2	350	4	450	2	350	5		5		3	120	2	100	1	150	2	200	5		3	250	3	250	5		5		2	300	2	360	2	80				
18	27	61	157	1	2	200	1	50	1	350	5		2	350	3	150	4	60	4	60	1	150	4	150	2	100	5		1	120	3	120	5		4	110	2	150	2	180	5					
19	25	67	185	1	2	500	2	200	2	350	4	350	3	350	2	350	5		3	180	1	220	1	450	1	300	5		2	380	2	380	5		5		2	150	2	180	2	80				
20	46	68	168	1	1	200	2	50	1	350	4	350	2	350	5		2	60	2	60	4	100	1	300	4	100	5		2	250	3	120	5		5		2	150	4	180	2	80				
21	29	61	165	1	2	200	2	250	2	450	4	350	2	350	2	350	4	60	2	60	1	150	1	300	2	100	5		2	120	3	120	5		5		2	300	2	360	2	80				
22	25	70	158	1	2	200	1	50	2	350	5		2	350	2	350	5		2	60	1	100	2	300	2	100	3	50	2	120	5		2	100	5		1	150	1	180	2	80				
23	30	80	174	1	2	200	2	200	2	350	5		3	150	5		5		3	60	2	100	1	150	2	100	5		2	120	4	120	5		5		2	150	2	180	2	80				
24	31	70	163	1	1	400	2	200	1	350	5		2	150	5		5		1	60	2	100	1	150	2	100	3	50	2	120	4	120	5		5		2	150	2	180	2	80				
25	34	90	173	1	2	500	2	200	1	350	5		2	150	2	350	4	60	3	120	5		1	300	2	200	5		3	120	3	250	5		5		2	150	2	180	2	160				
26	19	79	163	1	3	200	1	200	1	350	3	150	3	350	5		5		1	120	2	100	1	300	2	200	5		3	120	3	120	3	100	5		1	150	2	180	4	80				
27	52	79	165	1	1	500	1	50	1	150	3	350	2	350	3	150	3	60	2	120	1	100	1	450	1	100	2	100	2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	3	160				
28	26	78	173	1	1	150	2	200	1	350	3	350	2	350	4	150	4	60	3	60	2	150	1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	360	5					
29	43	76	168	1	2	150	2	50	2	350	2	150	2	350	3	150	3	60	3	60	2	100	1	150	1	200	2	50	2	120	5		5		5		2	150	1	180	5					
31	24	63	170	1	2	200	2	200	1	350	4	350	2	450	5		4	120	4	120	1	220	2	300	1	200	4	100	2	120	4	250	5		5		3	450	2	360	4	160				
32	21	82	1,85	1	1	200	2	50	1	150	5		2	350	5		3	120	3	120	1	220	5		2	100	5		2	250	3	120	5		5		2	150	3	180	5					
33	27	62	173	1	2	200	1	50	1	350	4	350	3	350	3	350	3	120	3	120	2	150	1	300	2	100	5		2	120	3	120	5		5		2	150	2	180	3	80				
35	25	82	170	1	1	400	3	50	1	150	4	450	2	350	2	350	2	60	2	60	1	100	1	150	2	200	5		2	250	5		5		5		2	150	2	180	3	80				
36	19	100	192	1	1	500	2	50	1	350	2	450	2	150	2	350	5		2	180	1	220	2	150	2	200	5		3	120	4	120	4	100	5		1	150	2	360	2	160				
37	24	66	170	1	2	500	1	200	1	450	5		2	450	5		2	120	2	120	2	150	1	300	1	200	5		2	250	2	250	5		5		1	300	1	300	5					
38	22	61	170	1	1	200	2	50	1	150	5		2	150	5		2	60	2	60	1	100	1	150	1	100	5		2	120	5		2	100	5		2	300	2	360	3	80				
40	50	73	170	1	1	200	5		1	350	2	350	2	350	5		1	60	1	60	5		1	300	2	100	5		5		5		5		5		2	50	2	150	5					
41	25	63	165	1	2	150	5		2	150	3	150	2	350	4	150	5		1	120	5		1	150	2	200	5		2	120	5		5		5		2	150	2	360	4	80				
42	48	76	173	1	2	200	1	50	2	150	5		2	350	4	150	5		2	60	2	100	1	150	2	100	5		2	120	5		2	100	5		1	150	2	180	5					
43	42	74	167	1	1	200	1	50	2	350	4	150	1	350	5		3	120	2	120	2	100	1	300	2	100	5		2	120	4	120	5		5		1	150	2	180	4	80				
44	23	88	180	1	1	400	2	200	2	150	5		5		3	350	5		2	120	2	100	1	300	2	200	5		3	120	3	120	1	100	5		1	150	2	180	5					
45	24	70	170	1	5		5		1	350	5		2	150	5		5		5		2	100	1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		5		2	180	5					
46	23	64	165	1	2	400	2	50	1	350	4	350	2	150	4	150	2	60	2	120	2	100	1	300	2	200	2	50	2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	5					
47	18	60	160	1	1	200	5		1	150	5		2	350	5		5		5		2	100	1	150	1	100	5		2	120	5		5		5		5		2	180	1	80				
48	26	82	173	1	3	200	4	50	1	150	4	150	3	150	5		5		5		5		1	300	1	200	2	50	1	120	5		5		5		1	150	5		5					
49	26	73	170	1	2	200	2	50	2	150	3	150	2	15																																

Resultados Individuales GR - Preguntas 1 a 19

Datos personales				Preguntas																																								
Edad Peso Talla Cond.				1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19				
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr						
51	50	80	180	1			2	400	2	50	1	150	4	150	2	150	2	150	5		5		1	100	1	150	2	100	5		2	120	5		1	100	5		2	150	2	180	2	80
52	37	91	173	1	1	5		2	50	1	350	4	350	2	350	5		2	180	2	180	5		1	150	2	200	5		3	120	5		5		5		2	150	2	180	5		
53	41	72	169	1	1	200	5		1	150	4	150	2	350	2	350	1	60	5		1	100	1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	180	5			
54	43	75	170	1	2	200	1	50	2	350	3	350	2	350	3	150	1	60	1	60	1	150	1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	180	3	80		
58	52	69	178	1	5		2	200	2	350	4	350	2	350	4	350	3	60	3	60	1	150	1	150	2	100	1	50	5		2	250	5		1	110	1	150	2	360	5			
59	41	94	199	1	1	200	3	200	2	450	3	450	2	150	3	350	5		2	180	1	100	2	150	2	200	2	50	2	250	3	120	2	100	5		1	150	2	180	2	80		
60	29	86	178	1	2	200	2	200	2	350	4	350	2	350	4	450	5		3	180	1	220	1	550	2	200	5		2	250	3	250	5		5		2	150	1	180	3	160		
63	40	57	165	1	1	400	2	50	2	150	4	150	2	350	5		2	60	2	60	1	150	2	150	2	100	5		2	120	5		1	100	2	110	2	150	1	180	4	80		
64	41	70	170	1	1	500	2	200	1	450	3	450	3	350	3	350	2	120	2	120	1	220	1	150	1	200	4	50	2	250	4	120	4	100	5		2	150	2	180	5			
65	23	75	155	1	4	200	3	50	1	350	5		2	350	5		5		3	120	2	100	4	150	1	100	5		3	120	5		5		5		2	150	1	180	5			
66	23	62	182	1	1	400	1	50	2	150	4	350	2	350	3	450	3	60	2	100	1	150	2	100	5		2	120	3	120	5		5		2	150	2	180	3	80				
67	22	80	180	1	4	150	2	200	1	350	4	350	1	350	3	350	3	120	3	120	2	100	1	300	3	100	5		2	120	5		5		5		2	150	5		5			
68	22	106	190	1	3	500	2	50	1	350	4	350	2	350	5		5		3	180	1	220	1	300	2	200	4	50	2	250	4	250	4	100	5		3	300	3	360	4	80		
69	18	57	166	1	4	150	1	200	2	350	4	350	2	350	4	350	2	120	2	120	1	100	1	300	2	200	5		2	250	5		5		5		1	150	2	180	5			
70	20	85	178	1	2	400	1	50	2	150	4	150	2	350	4	150	4	60	4	60	3	100	1	300	2	200	5		4	120	3	250	5		5		2	150	2	360	4	80		
71	41	60	162	1	2	400	2	50	2	350	3	350	2	350	3	350	2	60	2	60	1	100	1	150	2	200	3	50	2	250	3	250	3	100	5		2	300	2	360	2	160		
72	55	100	175	1	3	150	2	50	1	150	4	150	2	350	5		1	60	1	60	1	100	1	300	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	300	2	360	4	160		
73	23	90	190	1	4	200	2	200	2	350	4	350	3	350	5		5		2	120	1	220	1	450	2	200	5		5		5		5		2	300	2	360	5					
74	60	78	180	1	1	400	2	200	1	150	4	150	2	350	2	150	5		3	120	2	100	1	150	2	100	5		2	250	2	250	1	100	1	110	1	150	2	180	2	80		
75	19	55	160	1	3	150	2	50	2	350	4	150	3	150	5		5		2	120	1	150	1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		3	150	3	180	5			
76	42	80	180	1	1	150	2	50	1	350	5		2	150	4	150	5		3	120	4	150	1	150	2	200	5		1	120	5		5		5		1	150	5		2	80		
77	26	63	165	1	1	150	2	50	1	150	4	150	2	350	5		2	120	2	120	2	100	1	150	1	200	5		2	250	4	120	4	100	5		5		2	180	2	160		
78	22	98	185	1	2	200	4	200	2	350	3	350	2	350	5		5		2	60	1	100	1	150	2	100	5		2	250	2	250	5		4	110	1	150	1	180	2	160		
79	27	96	186	1	1	500	2	200	2	150	2	150	2	150	2	350	3	120	3	120	1	220	2	150	2	100	5		2	120	5		2	400	3	110	1	450	2	360	2	80		
80	36	78	178	1	4	400	2	50	1	150	4	150	3	150	5		2	60	2	60	5		2	300	2	100	5		1	250	5		5		5		4	150	4	180	4	80		
81	45	72	170	1	2	150	2	50	2	150	5		2	150	5		5		5		1	100	1	150	2	200	5		2	120	4	120	5		5		1	150	2	180	5			
82	43	84	180	1	1	200	1	50	1	150	5		2	350	4	350	5		2	60	1	100	1	150	2	200	5		3	250	4	120	2	100	4	110	1	150	1	180	4	160		
83	37	68	160	1	3	200	2	200	1	150	3	150	2	150	5		5		5		2	100	1	150	5		5		2	120	5		5		5		5		2	180	5			
84	30	74	170	1	5		2	200	1	350	4	350	1	350	5		1	60	1	60	1	220	1	300	1	100	5		2	250	4	250	5		5		2	150	2	180	5			
85	38	76	159	1	2	400	2	200	2	150	5		2	150	3	150	2	120	2	120	2	150	2	150	2	100	1	50	5		5		2	100	5		2	300	2	180	4	80		
86	51	75	171	1	1	400	3	50	1	350	5		1	150	5		5		5		5		1	450	2	200	5		5		5		5		4	150	2	360	5					
87	32	76	185	1	1	200	2	200	1	150	5		2	150	3	150	4	60	4	60	2	150	1	550	2	200	2	50	2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	5			
88	46	65	170	1	3	500	2	200	1	150	3	450	2	350	4	150	2	120	2	120	5		1	300	2	200	5		2	250	3	250	5		5		2	150	2	180	3	160		
89	60	77	165	1	2	400	2	200	1	150	3	350	2	350	3	350	2	60	2	60	1	150	1	300	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	180	2	80		
91	29	106	165	1	1	200	2	200	2	350	4	350	2	350	2	350	5		5		1	100	1	150	2	100	5		2	250	3	120	2	100	5		2	300	2	500	5			
92	46	73	165	1	4	200	2	50	2	150	5		2	150	5		2	60	2	60	1	100	1	150	2	100	5		3	120	5		5		5		1	150	2	180	5			
93	44	75	171	1	1	200	1	50	2	150	3	150	2	150	3	350	2	120	2	60	1	100	1	150	2	100	5		2	250	3	120	2	100	5		2	300	2	180	3	80		
94	24	95	185	1	1	200	2	50	1	350	5		2	350	4	150	2	120	2	120	1	220	2	150	2	200	5		5		3	380	1	200	5		2	300	2	180	3	80		
95	45	90	165	1	2	150	1	50	1	150	4	150	2	150	5		1	60	5		2	100	5		2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	180	2	80		
96	34	87	190	1	1	200	2	200	1	350	5		5		5		5		2	60	1	100	1	150	3	100	5		5		2	250	5		5		2	150	2	360	5			
97	54	93	168	1	2	200	2	50	1	150	5		2	150	2	150	5		5		2	100	1	150	2	100	5		5		2	120	5		5		2	150	2	180	5			
98	32	92	165	1	1	500	2	200	1	150	4	150	2	150	3	150	2</																											

Resultados Individuales GR - Preguntas 1 a 19

105	29	51	160	1	2	200	2	200	2	350	5		2	350	4	150	4	60	4	60	1	220	5		2	100	5		2	120	3	120	4	100	2	110	2	150	2	180	3	80
106	32	70	163	1	1	200	4	50	1	350	5		3	350	3	350	5		2	120	1	150	1	300	2	100	5		2	250	3	120	5		5		5		5		2	160
Datos personales				Preguntas																																						
	Edad	Peso	Talla	Cond.	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19	
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr
107	32	75	170	1	1	400	5		1	350	5		2	450	5		2	120	2	120	1	100	1	150	3	100	5		5		5		5		5		5		2	180	5	
108	27	80	167	1	1	200	5		1	150	5		2	150	5		2	180	2	180	5		1	450	4	200	5		2	250	2	120	5		5		1	150	1	180	2	80
109	18	67	174	1	1	200	5		2	150	5		2	150	3	350	5		2	120	5		1	150	5		5		2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	2	80
111	43	82	163	1	1	200	1	50	2	350	4	350	2	350	4	150	2	120	1	100	2	450	3	200	5		2	250	4	250	4	100	4	110	2	550	2	180	4	80		
112	35	105	180	1	2	500	2	200	1	150	3	350	2	150	5		2	180	2	180	2	150	1	300	1	200	5		1	250	2	120	5		5		2	150	2	360	4	250
113	50	69	150	1	1	150	1	50	2	150	3	150	3	350	3	150	5		2	60	2	100	2	150	1	100	5		2	120	2	120	5		5		1	150	1	180	2	80
114	21	60	172	1	2	200	2	200	1	150	4	150	2	150	3	350	2	60	2	60	1	100	1	550	2	200	5		2	120	3	250	2	100	5		2	150	1	180	2	80
115	43	75	178	1	2	400	2	50	2	350	5		2	350	3	350	2	120	2	120	1	100	1	150	1	200	5		2	250	3	250	5		3	110	2	150	2	180	2	80
116	52	78	175	1	3	400	2	200	1	350	5		2	350	4	150	2	120	2	120	2	100	1	150	2	100	5		2	120	2	120	5		5		1	150	1	180	3	80
117	30	91	178	1	2	200	2	200	1	450	3	350	3	350	4	350	4	120	4	120	1	220	1	550	2	200	3	100	2	250	2	120	5		5		3	150	2	360	3	80
118	41	80	164	1	3	150	2	50	3	150	4	150	3	150	4	150	5		2	120	1	220	2	300	2	200	4	50	2	120	3	120	5		5		2	150	2	180	4	80
120	57	74	168	1	1	200	1	200	1	350	4	350	2	350	5		2	120	2	120	1	100	1	300	2	200	5		2	250	2	250	4	200	2	110	2	300	2	360	3	160
121	48	75	165	1	2	200	2	50	1	350	5		2	350	5		2	60	2	60	1	100	1	150	2	200	5		2	250	3	120	5		5		1	300	1	180	4	80
122	58	90	160	1	5		3	200	2	150	5		2	150	4	350	4	120	4	120	2	150	1	300	2	200	5		2	250	4	250	4	100	4	110	2	300	2	360	3	160
125	21	68	173	1	1	500	2	50	2	350	5		2	350	3	350	2	120	2	120	1	220	1	300	1	100	5		2	250	5		2	200	5		2	300	1	360	3	160
126	20	87	192	1	1	400	2	250	1	150	5		2	350	4	450	2	180	5		1	220	1	300	2	200	5		2	250	2	120	1	200	5		1	300	2	180	3	80
130	20	85	175	1	2	200	2	200	1	350	4	350	3	350	4	350	2	120	2	120	2	100	1	450	1	300	5		2	380	2	250	4	100	5		2	150	2	180	2	80
131	36	92	165	1	5		2	200	1	350	1	150	3	150	3	350	2	60	2	60	2	100	1	150	2	200	3	50	2	250	5		5		5		2	150	2	180	5	
133	43	90	165	1	5		2	50	1	150	5		2	150	5		2	60	2	60	1	100	5		1	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	360	3	160
134	54	76	160	1	1	200	1	50	1	350	2	350	3	350	3	350	3	120	5		1	150	4	150	2	200	5		2	250	3	250	2	100	5		2	300	2	360	2	80
136	32	70	172	1	1	200	3	50	1	150	2	150	2	150	3	150	4	120	4	120	1	220	2	150	3	100	3	50	2	120	4	120	5		5		2	150	2	180	4	80
137	22	66	173	1	1	200	2	50	1	150	4	150	2	150	4	150	2	120	2	120	2	150	1	150	2	200	5		2	250	5		5		5		2	150	2	180	3	80
138	27	80	177	1	2	200	2	50	1	350	2	350	3	350	3	450	3	120	3	120	1	150	1	150	2	200	5		3	250	5		5		5		2	300	2	180	5	
139	28	90	187	1	1	200	2	200	1	350	3	350	2	350	4	350	2	120	2	120	1	220	2	150	2	200	2	50	2	250	4	250	5		5		2	150	2	180	4	80
140	35	85	178	1	2	150	2	50	2	350	4	350	2	350	4	350	2	60	2	120	2	100	1	150	2	100	5		2	120	4	120	5		5		2	300	2	180	5	
141	36	88	176	1	1	200	2	200	1	350	3	350	2	350	4	350	2	60	2	60	1	150	1	150	2	200	5		2	250	2	120	5		5		5		2	180	3	80
142	19	62	175	1	2	200	3	50	2	450	5		5		4	350	5		5		1	100	1	150	2	100	5		2	120	5		5		2		2	150	2	180	5	
143	42	62	162	1	4	200	1	50	1	150	4	150	2	350	4	350	4	120	2	120	1	150	1	150	2	100	5		2	250	4	250	5		5		2	150	2	180	5	
144	41	70	157	1	1	400	2	250	1	350	4	150	3	350	5		3	120	3	120	1	150	1	300	2	200	5		3	250	5		5		5		2	150	2	180	5	
145	28	72	174	1	4	200	2	50	1	350	4	350	2	350	5		5		5		1	100	1	300	2	100	5		2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	2	80
146	35	90	187	1	2	500	3	200	1	350	5		3	350	5		3	120	3	120	2	220	1	300	5		5		2	250	5		5		5		2	300	2	360	5	
147	38	100	182	1	2	200	2	50	2	350	5		2	350	5		5		3	120	2	100	1	300	2	200	5		2	250	2	120	5		5		2	150	2	180	2	80
148	42	66	162	1	1	200	1	200	1	150	5		1	150	3	450	3	180	2	120	1	220	1	150	2	100	2	50	3	120	3	120	5		5		2	150	1	180	5	
149	44	51	155	1	2	200	1	200	2	150	4	150	2	150	2	350	2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	2	50	2	120	5		5		5		1	150	1	180	1	80
150	37	60	165	1	4	200	2	200	2	350	3	450	2	450	4	350	2	60	2	60	5		1	300	2	200	5		2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	5	
151	47	94	160	1	3	200	3	50	1	450	2	350	2	350	5		5		5		1	100	1	450	2	200	5		5		5		5		5		1	300	5		5	
152	26	110	180	1	2	500	1	200	1	450	2	450	2	450	3	450	4	180	2	180	1	220	1	450	2	400	5		2	450	2	450	4	200	5		1	450	2	500	2	250
153	19	80	175	1	1	400	2	200	2	350	5		5		3	150	1	60	1	60	5		1	300	2	200	2	100	2	250	3	250	5		5		3	300	2	360	5	
155	30	74	171	1	3	400	2	50	1	150	5		2	150	3	350	5		5		1	100	1	150	2	100	5		5		5		2	100	5		2	150	2	180	5	
157	32																																									

Resultados Individuales GR - Preguntas 1 a 19

164	29	77	182	1	1	500	2	50	1	350	3	350	2	350	3	450	4	120	3	120	1	220	1	550	2	200	3	50	2	380	5		2	100	5		2	150	3	180	3	160							
165	20	68	160	1	2	200	2	50	2	150	5	5	2	150	3	150	5		5		1	100	5		2	100	1	50	2	120	5		2	100	5		1	150	1	180	2	80							
166	52	82	178	1	1	400	2	50	1	350	2	450	5		4	450	5		5		5		1	150	2	200	5		2	120	3	250	5		5		2	150	2	180	3	80							
Datos personales				Preguntas																																													
				Edad		Peso		Talla		Cond.		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19	
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr					
167	29	75	178	1	5		5		1	350	5		5		5		5		5		5		1	150	2	200	5		2	250	3	250	5		5		2	300	2	360	3	160							
168	47	71	169	1	1	200	5		2	350	5		3	350	4	450	5		5		5		1	300	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	1	180	3	160							
169	35	90	173	1	1	150	2	50	1	350	5		4	150	5		2	60	5		2	100	1	150	2	100	5		2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	4	160							
170	61	80	176	1	2	400	1	50	1	350	3	350	3	350	3	350	3	350	2	120	2	120	1	100	1	150	3	100	5		2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	2	80					
171	30	78	168	1	2	200	1	50	1	150	5		2	150	5		5		2	60	5		1	300	2	100	5		2	120	5		1	100	5		1	300	2	180	5								
172	30	73	170	1	1	500	2	200	1	150	5		2	150	3	350	3	120	3	120	1	150	1	150	2	100	3	50	2	120	2	120	3	100	5		2	150	3	180	3	80							
173	21	60	165	1	5		3	50	1	150	5		2	450	4	350	2	60	2	60	5		1	150	1	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	180	5								
174	26	90	175	1	5		5		2	350	5		2	150	5		5		5		2	100	1	300	1	200	5		2	250	5		5		5		2	150	1	180	5								
175	32	93	178	1	5		2	50	1	150	3	150	2	150	4	350	2	60	2	60	1	150	1	150	1	100	5		2	120	3	250	5		5		2	150	2	180	3	80							
176	28	75	180	1	4	200	2	200	1	350	2	350	2	350	5		5		5		5		1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		4	150	2	180	5								
177	20	104	175	1	5		2	200	1	350	4	450	2	350	5		2	120	2	120	2	100	1	150	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	180	5								
178	34	75	165	1	1	500	2	200	1	150	3	150	2	150	2	350	2	120	2	120	1	100	5		2	200	5		2	120	5		1	100	1	110	2	300	1	180	2	80							
179	38	67	167	1	1	500	2	50	1	350	2	150	2	350	5		5		5		2	150	1	450	2	100	5		5		5		5		2	150	2	180	5										
180	42	80	185	1	1	200	1	50	1	350	5		2	350	3	350	5		2	60	1	100	1	150	2	200	2	50	2	250	3	250	1	100	5		2	300	2	360	3	160							
181	34	71	154	1	3	200	2	200	2	350	3	150	2	350	2	150	2	120	2	120	1	100	1	150	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	1	180	2	160							
182	37	90	185	1	2	200	2	200	1	350	5		3	350	5		2	180	2	180	1	100	1	150	1	100	2	50	2	120	5		5		5		2	150	2	180	5								
183	29	82	182	1	1	500	5		1	150	5		2	150	5		3	120	3	120	1	100	1	150	2	200	5		2	250	3	120	5		5		2	150	2	500	3	160							
185	57	80	168	1	2	200	2	50	1	150	5		2	350	3	150	2	120	2	120	1	100	1	150	2	200	1	50	2	120	2	120	5		5		2	300	2	360	5								
186	44	98	198	1	1	500	1	200	1	450	4	450	2	450	2	450	5		5		2	220	1	300	5		5	2	250	2	380	5		5		2	150	2	360	2	160								
187	22	67	197	1	1	400	2	200	1	450	5		2	150	5		2	180	2	180	2	100	1	450	5		5	1	250	2	250	5		5		5		2	180	5									
188	34	72	160	1	2	200	2	50	1	150	5		4	150	4	150	5		5		2	150	1	150	1	100	5		1	120	2	120	2	100	5		1	150	1	180	2	80							
189	36	85	161	1	2	400	2	50	1	150	5		2	350	3	350	5		5		3	100	2	150	2	100	5		2	120	2	120	5		5		3	150	2	180	5								
190	30	63	163	1	1	200	2	200	2	150	5		2	350	4	350	5		2	120	2	150	1	300	2	100	2	50	2	120	5		5		5		2	150	1	180	2	80							
191	35	65	165	1	2	200	2	50	1	350	3	150	2	350	2	150	2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	2	50	2	120	2	120	2	100	2	110	1	150	1	180	2	80							
192	35	76	175	1	1	200	2	50	1	150	2	350	2	350	5		2	120	2	120	2	100	1	150	2	200	5		1	120	2	250	2	100	5		1	150	1	180	3	80							
193	29	123	185	1	1	200	2	200	1	350	3	350	2	350	4	150	3	120	3	120	2	100	1	300	1	200	5		2	250	3	120	5		5		2	150	2	180	3	80							
194	31	72	170	1	4	200	2	200	1	350	3	350	2	350	5		2	120	2	120	1	100	1	300	2	100	5		2	250	5		5		5		2	150	2	180	2	80							
196	34	71	170	1	2	500	1	200	1	150	4	350	2	450	5		4	120	4	120	1	150	1	150	2	100	4	50	2	250	4	120	2	100	4	110	4	150	4	180	4	250							
197	36	98	176	1	2	400	1	250	2	350	5		2	350	2	350	5		2	180	1	150	1	450	2	200	5		2	250	3	250	5		5		2	300	2	180	3	250							
199	31	59	172	1	2	200	2	250	2	450	5		2	450	3	450	5		2	120	1	220	1	150	2	200	5		2	120	5		5		5		2	300	2	360	3	80							
200	38	75	168	1	4	200	1	50	2	350	4	150	2	150	4	150	4	120	4	120	1	100	1	150	2	100	5		2	120	4	120	4	100	5		2	150	2	180	2	80							
202	31	63	163	1	2	200	1	50	2	150	3	150	2	150	3	150	5		3	120	1	100	2	150	2	100	1	50	2	120	3	120	5		5		1	150	1	180	5								
205	37	73	168	1	1	400	2	50	1	350	5		2	350	2	150	5		4	60	1	150	1	150	2	200	5		5		5		5		2	300	5		5										
206	20	58	158	1	2	200	3	50	1	150	2	150	2	150	5		5		5		2	100	1	150	2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	5		5								
207	43	106	171	1	2	200	2	50	1	350	2	150	2	350	2	350	2	120	2	120	1	100	1	150	2	200	5		3	250	3	120	5		5		2	150	5		4	80							
208	31	61	168	1	5		2	200	1	150	5		2	150	4	150	3	120	3	120	2	100	1	150	2	100	5		2	120	3	120	5		5		2	150	1	180	3	80							
209	40	115	180	1	3	200	2	50	2	350	3	150	2	350	5		2	120	2	120	2	150	1	150	2	200	2	50	2	120	5		5		5		2	150	2	180	5								
210	44	87	173	1	2	200	2	200	1	150	5		1	350	5		2	120	2	120	1	100	2	150	2	100	2	50	1	120	3	120	5		5		2	150	2	180	5								
211	47	72	174	1	1	200	1	50	1	350	3	150																																					

Resultados Individuales GR - Preguntas 1 a 19

218	28	58	165	1	1	200	1	50	1	150	4	150	2	150	4	150	2	60	2	60	1	150	1	300	2	100	5		2	120	2	120	2	100	5		2	150	2	180	4	80
219	25	67	161	1	4	200	3	50	1	350	5		2	350	5		5		3	60	1	150	1	300	2	100	5		2	120	3	120	5		5		1	150	2	180	3	80
220	36	80	175	1	3	400	2	200	1	150	5		2	350	3	350	2	120	5		1	100	5		2	100	5		2	120	2	120	5		5		2	150	1	180	5	
Datos personales				Preguntas																																						
Edad Peso Talla Cond.				1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr		
222	45	77	168	1	1	200	1	50	2	150	5		2	150	3	150	1	60	1	60	1	100	1	150	5		1	50	5		5		5		1	150	1	180	3	80		
224	52	56	152	1	2	200	2	50	2	350	4	150	2	150	5		5		3	60	1	100	2	150	2	100	5		2	120	4	120	1	100	5		1	150	2	180	4	80
225	34	86	172	1	1	200	1	50	1	350	2	350	2	350	3	350	5		5		1	220	1	150	2	200	5		5		5		5		2	300	2	360	5			
227	31	95	156	1	2	200	3	50	1	150	2	150	2	150	4	350	2	120	2	120	1	100	1	150	2	100	5		2	120	2	120	5		5		2	150	1	180	2	80
228	30	95	180	1	2	400	3	50	1	150	5		2	150	3	150	3	60	3	60	3	100	1	300	3	100	3	100	3	250	3	250	3	100	3	110	3	300	3	360	2	160
229	37	95	190	1	4	200	1	50	1	350	5		2	450	4	450	2	120	2	120	1	150	1	450	2	100	2	50	2	120	2	120	5		5		2	150	2	180	2	80
230	33	96	180	1	1	200	2	50	2	350	4	150	2	350	2	350	2	60	2	60	1	220	1	300	2	100	5		2	120	3	120	2	100	5		2	150	2	180	2	80
231	60	90	170	1	5		1	50	1	150	3	350	2	150	5		1	120	1	120	2	100	1	150	1	100	3	50	2	120	5		5		1	150	1	180	5			
232	18	73	175	1	1	200	2	50	1	350	4	450	2	350	4	150	5		2	120	1	100	2	150	3	200	4	50	3	120	5		5		2	300	2	360	5			
234	24	98	170	1	1	200	2	200	1	150	4	350	2	150	3	150	2	60	2	60	5		1	150	2	100	5		2	120	5		2	100	5		2	150	1	180	2	80
235	37	78	172	1	1	500	2	200	1	150	3	150	2	150	2	150	5		2	180	1	150	1	300	2	100	5		2	120	5		2	100	5		2	150	2	180	5	
236	20	62	175	1	2	200	2	200	1	350	3	350	3	350	5		2	180	2	180	1	100	4	150	2	200	4	50	2	250	4	250	1	100	5		2	150	2	180	5	
239	37	70	165	1	2	200	2	50	1	450	5		2	150	4	150	2	60	2	60	1	100	1	150	2	400	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	180	3	160
240	33	72	168	1	1	200	3	50	1	350	2	150	2	350	4	350	3	180	3	180	2	220	1	150	2	200	4	50	2	250	3	250	3	100	5		2	300	2	360	3	160
241	30	82	167	1	4	150	2	50	1	150	4	150	2	350	4	450	5		2	120	2	100	1	150	2	200	5		2	250	2	250	5		4	110	2	150	2	180	2	160
242	31	78	180	1	1	500	2	200	1	350	4	350	2	350	4	450	4	60	4	60	2	100	1	450	1	300	5		2	120	2	380	2	200	5		5		2	360	2	160
243	39	80	170	1	2	200	2	200	1	350	5		2	350	4	450	2	120	2	120	1	100	2	150	2	100	5		2	120	5		5		5		1	150	1	180	4	80
244	32	74	175	1	4	500	1	250	1	350	5		2	450	4	450	2	180	2	180	4	100	1	150	1	200	5		5		4	250	5		5		2	150	1	180	5	
245	22	75	189	1	2	150	2	50	2	350	5		1	350	3	150	4	180	2	180	1	220	1	300	2	300	5		2	380	2	120	5		5		2	300	2	360	5	
246	23	70	182	1	2	200	4	200	1	450	3	350	2	150	5		5		2	180	2	220	1	450	1	100	5		2	120	5		5		5		2	150	3	180	5	
247	24	93	170	1	2	700	2	50	1	150	4	150	2	150	5		2	60	2	60	1	100	1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	180	5	
248	42	58	162	1	2	200	3	50	2	350	5		2	350	4	350	4	60	4	60	2	100	1	150	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	180	5	
249	55	95	169	1	1	200	1	50	2	150	5		2	350	2	350	2	120	5		1	100	2	150	2	100	5		2	120	2	120	1	100	1	110	1	150	1	180	2	160
250	22	96	170	1	5		2	200	1	350	5		2	450	5		1	120	1	120	1	150	1	300	1	200	5		1	250	3	250	5		5		1	150	2	360	5	
251	65	97	187	1	1	200	2	50	1	350	5		1	150	5		2	120	5		1	150	1	150	2	100	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	180	5	
252	42	74	168	1	1	150	1	200	1	350	3	350	2	150	5		5		5		1	100	5		2	100	5		5		5		5		2	150	2	180	2	80		
253	47	78	165	1	5		1	50	1	150	5		2	150	4	150	3	120	3	120	2	150	1	300	2	100	5		5		5		5		2	150	2	180	3	80		
254	52	70	167	1	1	150	1	200	1	350	3	450	2	350	4	350	2	120	2	120	2	100	1	150	2	100	3	50	3	120	3	120	5		5		2	150	2	180	4	80
255	40	72	170	1	4	200	2	200	1	350	5		3	450	3	150	4	120	4	120	3	100	1	300	2	200	5		2	250	4	250	5		5		1	150	1	180	3	160
257	21	78	180	1	1	200	5		2	450	5		2	350	3	350	2	120	2	120	1	150	1	150	2	100	2	50	2	250	2	250	5		5		1	150	2	180	5	
258	37	87	172	1	2	200	2	50	1	350	5		2	350	3	350	5		5		2	150	1	300	2	200	5		2	250	2	120	5		5		3	150	2	360	2	160
259	43	83	170	1	4	150	2	250	1	350	4	450	2	350	4	450	3	180	3	180	3	150	1	150	2	100	5		1	120	4	120	5		5		2	150	2	360	4	80
260	34	65	162	1	2	500	4	50	1	150	5		2	350	5		5		1	120	2	150	1	150	2	100	5		2	120	3	120	5		5		5		2	180	5	
261	34	62	160	1	2	200	2	200	1	150	5		3	350	3	350	2	180	2	180	1	150	1	300	2	100	5		2	120	5		5		5		2	150	2	180	5	
262	54	80	170	1	2	500	2	200	1	350	5		2	350	4	150	5		5		2	220	1	150	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	180	2	80
263	31	95	182	1	1	400	2	200	1	150	5		2	350	5		2	60	2	60	1	220	1	300	2	200	5		2	250	2	250	5		5		2	150	2	360	2	160
264	42	78	160	1	4	200	2	50	2	350	5		2	350	3	350	2	60	5		4	100	1	150	2	200	5		2	250	5		5		5		2	150	2	180	5	
265	23	58	166	1	2	200	2	250	2	150	4	350	4	350	4	150	5		4	180	1	100	4	150	1	200	4	50	1	250	4	250	5		5		2	300	2	360	4	160
266	44</																																									

Resultados Individuales GR - Preguntas 1 a 19

274	37	100	170	3	1	200	2	50	1	150	4	150	2	350	4	350	3	120	3	120	2	100	1	150	2	200	5		2	250	5		5		5		2	150	2	180	5	
275	42	85	180	1	1	500	1	50	1	150	4	150	3	150	4	150	1	60	1	60	5		1	300	2	400	5		2	250	2	250	5		5		5		2	180	3	160

Resultados Individuales GR - Preguntas 20 a 38

Datos personales					Preguntas																																						
Nº	Edad	Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr			
1	36	71	165	1	5		1	120	2	100	5		5		1	90	4	80	5		1		4	75	2	100	4	50	2	700	1	700	2	700	5		1	350	2	350	3	100	
2	39	115	175	1	5		1	120	1	100	5		5		4	90	1	80	5		1		5		5		2	50	3	350	1	350	2	700	5		1	350	5		5		
3	36	84	172	1	5		4	120	4	100	5		4	80	1	90	1	80	5		1		5		4	100	5		2	350	2	350	5		5		1	350	5		5		
4	46	70	168	1	5		2	120	2	100	4	100	2	80	3	90	3	80	2		1		4	75	5		5		5		3	350	5		5		2	350	2	350	5		
6	36	67	160	1	5		2	120	2	100	5		2	80	2	90	2	80	5		1		3	75	3	100	2	50	2	350	5		5		5		1	350	5		5		
7	37	67	168	1	5		2	120	2	100	5		5		5		5		5		1		3	75	1	100	5		1	350	1	350	5		5		1	700	5		5		
8	23	65	160	1	5		1	120	1	100	5		3	80	5		5		5		1		4	75	5		2	50	2	350	2	700	5		5		2	350	5		5		
9	23	80	172	1	5		2	120	2	100	5		2	80	3	90	2	80	5		1		3	75	2	100	4	50	1	350	3	350	5		5		3	200	2	350	5		5
12	38	70	160	1	5		3	120	3	100	5		5		5		1	160	5		1		3	250	5		5		2	700	5		5		5		2	700	5		5		
13	47	60	165	1	5		2	120	2	100	5		2	80	1	90	1	80	5		1		3	150	2	100	5		2	350	5		5		5		1	350	5		5		
14	44	73	170	1	5		2	240	5		5		5		2	90	5		5		1		4	75	4	100	5		5		2	700	4	700	5		5		5		5		
16	44	86	170	1	5		2	120	2	100	5		2	80	2	90	3	80	5		1		3	150	2	100	5		5		3	700	5		4	350	1	350	5		5		
17	38	90	180	1	5		1	120	2	100	5		5		3	90	5		5		1		4	150	2	100	4	100	4	350	2	350	4	350	5		4	350	5		5		
18	27	61	157	1	5		2	120	2	100	5		2	80	3	90	5		1		5		4	75	1	100	4	50	2	350	5		5		5		2	350	5		5		
19	25	67	185	1	5		1	450	1	450	5		5		3	90	4	80	5		1		4	75	5		2	100	3	350	2	350	2	350	5		2	350	5		5		
20	46	68	168	1	5		5		5		5		4	80	5		3	80	5		1		5		3	100	5		2	350	1	350	3	350	5		5		5		5		
21	29	61	165	1	5		1	120	1	100	5		4	80	2	90	2	80	5		1		3	75	4	100	3	50	1	350	5		5		5		2	350	5		5		
22	25	70	158	1	3	160	1	120	1	100	5		5		2	180	3	160	5		1		4	75	2	100	5		2	350	5		5		5		2	350	5		5		
23	30	80	174	1	5		2	120	2	100	5		2	80	5		2	80	5		1		2	75	1	200	5		2	350	2	350	2	350	5		2	350	2	350	5		5
24	31	70	163	1	4	80	3	120	3	100	5		5		2	90	3	80	5		1		5		1	100	5		5		5		5		4	200	2	350	5		5		
25	34	90	173	1	5		4	120	4	100	5		3	80	5		4	80	5		1		3	75	5		5		3	350	3	350	4	350	5		2	700	2	350	5		5
26	19	79	163	1	5		3	120	2	100	5		2	80	2	90	3	80	5		1		2	150	2	100	3	50	5		5		2	1100	2	400	1	700	5		5		
27	52	79	165	1	3	80	2	240	2	200	3	100	2	80	2	90	2	160	1		1		3	150	2	100	2	50	2	350	5		5		5		2	700	2	350	3	100	
28	26	78	173	1	5		1	120	4	100	5		3	80	2	90	2	80	5		1		1	75	2	100	4	50	2	350	4	350	4	350	5		1	2000	5		5		
29	43	76	168	1	5		2	120	2	100	5		4	80	3	90	2	80	2		1		2	150	4	100	3	50	2	350	1	350	2	700	5		1	350	5		5		
31	24	63	170	1	5		4	360	4	200	5		4	160	2	270	2	160	5		1		2	250	5		5		3	1000	5		3	1100	5		5		5		5		
32	21	82	1,85	1	5		4	240	4	200	5		1	160	5		3	80	5		1		3	250	1	100	5		5		2	2000	2	2000	2	1200	1	1100	5		5		
33	27	62	173	1	5		2	360	2	300	5		4	80	5		3	80	5		1		4	75	3	100	2	50	2	350	2	350	2	350	5		1	350	5		5		
35	25	82	170	1	5		1	240	1	200	5		5		2	90	2	80	5		1		4	150	1	100	5		1	350	5		5		5		1	350	5		5		
36	19	100	192	1	5		2	120	2	100	2	100	2	80	5		4	80	5		1		1	250	5		2	50	2	700	2	350	2	700	2	200	2	350	5		5		
37	24	66	170	1	5		1	240	1	200	5		2	80	5		2	80	5		1		3	150	2	200	3	150	1	1000	3	2000	3	2000	5		5		2	700	5		5
38	22	61	170	1	5		2	120	2	100	5		2	80	2	90	2	80	5		1		1	75	3	100	2	50	1	350	5		5		5		1	350	5		5		
40	50	73	170	1	5		5		1	100	5		5		5		5		5		1		2	75	5		2	50	1	350	2	700	2	700	5		1	350	5		5		
41	25	63	165	1	5		2	120	2	100	5		3	80	5		2	80	5		1		5		5		2	100	2	700	2	350	2	350	5		1	1100	5		5		
42	48	76	173	1	5		1	120	1	100	5		5		1	90	5		5		1		2	75	5		2	50	2	350	2	350	3	350	5		1	350	2	350	5		5
43	42	74	167	1	5		2	120	2	100	5		5		5		2	80	5		5		2	75	5		5		3	350	5		1	700	5		5		5		5		
44	23	88	180	1	2	80	1	120	1	100	5		2	80	1	90	3	80	5		1		3	75	2	100	2	50	2	350	5		3	700	5		1	350	5		5		
45	24	70	170	1	5		2	120	2	100	5		5		5		2	80	5		1		5		1	100	5		5		5		5		5		1	350	5		5		
46	23	64	165	1	5		2	120	2	100	5		2	160	3	90	5		5		1		1	75	5		5		1	700	2	700	2	2000	5		1	350	5		5		
47	18	60	160	1	5		5		5		5		2	80	1	90	5		5		1		2	75	2	100	5		5		2	2000	2	2000	5		1	700	5		5		
48	26	82	173	1	5		2	360	2	300	5		5		5		5		5		1		5		5		2	50	2	350	1	700	1	2000	5		5		2	2000	5		5
49	26	73	170	1	5		2	120	2	100	5		5		2	90	2	160	5		1		2	250	2	100	2	50	1	350	5		3	2000	5		2	700	5		5		
50	38	60	157	1	2	80	1	120	1	100	5		3	80	3	90	5		5		1		3	75	5		5		2	700	5		5		5		1	700	3	100			
51	50	80	180	1	4	80	1	240	1	200	5		1	160	5		2	80	5		1		2	150	1	300	5		2	350	2	1100	5		5		5		5		5		

Resultados Individuales GR - Preguntas 20 a 38

Datos personales					Preguntas																																							
Nº	Edad	Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38			
					Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr		
52	37	91	173	1	5		5		5		5		5		3	90	3	80	5		1		3	75	5		2	50	5		2	350	2	350	5		2	700	5		5		5	
53	41	72	169	1	3	160	2	240	2	200	5		3	80	5		2	80	5		1		5		1	100	5		1	350	5		5		5		5		1	350	5		5	
54	43	75	170	1	5		4	120	2	100	5		5		2	90	2	80	5		1		3	150	4	100	2	100	5		2	350	2	1100	3	400	1	700	5		5		5	
58	52	69	178	1	5		5		5		5		5		2	80	5		5		5		1	3	150	4	100	2	100	5		1	350	5		5		5		1	350	5		5
59	41	94	199	1	2	80	3	120	3	100	5		3	80	3	90	3	80	3		1		2	75	1	100	2	50	3	350	2	700	2	700	4	200	5		1	700	4	100		5
60	29	86	178	1	5		1	120	2	100	4	100	2	80	1	90	2	80	1		5		4	150	4	100	5		2	350	3	350	5		5		5		5		5		5	
63	40	57	165	1	2	160	1	120	2	100	2	100	5		2	90	3	80	5		2		2	75	1	100	4	50	1	350	2	350	4	350	5		5		5		5		2	100
64	41	70	170	1	5		2	240	4	100	5		2	80	5		1	160	5		1		2	150	4	100	3	100	2	700	1	700	4	350	3	200	1	350	5		5		5	
65	23	75	155	1	5		3	120	5		5		4	80	5		5		5		1		4	75	5		2	50	5		5		4	350	5		5		5		5		5	
66	23	62	182	1	5		2	120	2	100	5		2	80	2	90	2	80	5		5		4	75	2	100	5		2	350	2	2000	2	2000	2	400	2	350	5		5		5	
67	22	80	180	1	5		2	120	5		5		2	80	5		2	80	5		1		5		1	100	1	100	2	350	2	2000	2	1100	2	1200	2	350	5		5		5	
68	22	106	190	1	5		4	120	5		4	200	5		4	180	4	80	5		1		2	75	1	100	3	100	5		5		2	2000	5		5		1	700	5		5	
69	18	57	166	1	5		2	240	2	100	5		1	80	5		3	80	5		1		4	75	1	100	4	50	5		5		2	1100	2	400	5		5		5		5	
70	20	85	178	1	5		1	240	1	200	4	100	5		2	180	3	80	5		1		3	75	2	100	2	50	1	350	2	2000	2	2000	5		2	700	5		5		5	
71	41	60	162	1	3	80	2	120	3	100	3	100	4	80	3	90	3	80	5		1		3	75	3	100	3	50	4	350	1	350	4	350	5		2	350	5		4	100		5
72	55	100	175	1	5		1	240	1	200	5		4	80	5		1	80	5		1		3	75	2	100	4	50	1	350	2	2000	4	350	5		1	350	5		5		5	
73	23	90	190	1	5		3	240	5		5		5		1	180	3	160	5		1		5		5		5		2	350	2	2000	5		1	2000	5		5		5		5	
74	60	78	180	1	5		1	240	1	200	2	100	2	80	1	90	2	80	1		1		4	75	3	100	5		4	350	3	350	5		5		2	350	5		5		5	
75	19	55	160	1	5		2	120	2	100	5		2	160	5		2	160	5		1		2	75	2	200	2	50	2	350	5		2	350	3	200	2	350	5		5		5	
76	42	80	180	1	2	80	2	120	2	100	5		5		2	90	5		5		1		4	75	4	100	5		5		5		4	350	5		2	350	5		5		5	
77	26	63	165	1	5		3	120	5		5		4	80	3	90	2	80	5		1		3	150	2	100	2	50	5		5		2	350	5		2	700	5		5		5	
78	22	98	185	1	2	250	1	240	1	200	5		5		4	90	4	80	5		1		4	75	1	100	2	100	4	350	2	700	2	700	3	400	2	700	5		5		5	
79	27	96	186	1	5		3	120	3	100	5		4	80	2	90	5		5		5		5		5		5		2	350	5		5		5		5		5		5		5	
80	36	78	178	1	5		5		5		5		5		5		5		5		1		5		5		5		4	350	4	350	2	700	5		4	350	5		5		5	
81	45	72	170	1	1	80	1	120	4	100	5		4	80	1	90	4	80	5		1		2	75	2	100	5		3	700	1	350	2	700	4	200	5		5		5		5	
82	43	84	180	1	5		2	240	2	200	4	100	2	80	1	90	2	80	1		1		2	150	1	100	4	50	4	350	1	350	2	350	4	200	1	350	4	350	4	100		5
83	37	68	160	1	5		5		2	100	5		5		5		5		5		1		5		5		5		5		1	350	2	700	5		1	350	5		5		5	
84	30	74	170	1	5		2	120	2	100	5		2	80	2	90	2	80	5		1		5		1	100	2	50	5		4	700	4	1100	5		2	700	5		5		5	
85	38	76	159	1	3	160	1	450	1	450	4	100	2	80	2	90	3	80	1		2		2	75	5		4	50	5		4	350	4	350	5		2	700	2	700	5		5	
86	51	75	171	1	5		5		5		5		1	80	5		5		5		1		2	75	5		5		5		1	350	5		5		5		5		5		5	
87	32	76	185	1	5		4	240	4	200	5		4	80	5		2	350	5		1		4	75	5		4	50	5		5		2	350	5		5		5		5		5	
88	46	65	170	1	5		1	120	1	100	3	100	5		3	180	4	80	5		1		4	75	2	100	5		5		2	700	4	1100	5		5		1	700	5		5	
89	60	77	165	1	5		2	120	2	120	5		4	80	2	90	5		1		1		4	75	5		5		5		1	350	2	350	4	200	5		5		5		5	
91	29	106	165	1	5		1	240	1	200	5		4	80	4	180	4	80	2		1		5		1	100	4	50	2	350	5		5		5		1	2000	5		5		5	
92	46	73	165	1	5		1	120	1	100	5		4	80	2	90	5		5		1		5		1	100	5		5		5		5		5		2	1100	5		5		5	
93	44	75	171	1	2	80	1	120	1	100	3	100	5		1	90	3	80	5		5		3	75	5		2	50	1	350	2	350	2	350	5		5		5		3	100		5
94	24	95	185	1	5		1	120	1	100	5		2	160	5	90	5		5		1		3	75	1	200	2	50	2	700	5		2	350	5		1	2000	5		5		5	
95	45	90	165	1	5		5		5		5		5		2	90	5		1		5		2	150	5		2	50	5		1	350	2	350	5		5		1	350	5		5	
96	34	87	190	1	5		1	120	2	100	5		5		1	90	1	80	5		1		1	75	1	100	2	50	2	350	5		2	350	5		5		5		5		5	
97	54	93	168	1	5		1	120	1	100	5		5		5		5		5		1		5		5		2	50	5		2	350	5		5		2	350	5		5		5	
98	32	92	165	1	5		1	120	1	100	5		5		4	90	4	80	5		1		4	75	4	100	4	50	2	350	2	350	2	1100	5		1	2000	5		5		5	
99	20	72	170	1	5		1	240	1	200	5		1	160	1	90	1	250	5		1		4	75	1	100	2	100	2	350	2	700	2	2000	3	200	1	350	5		5		5	
100	21	96	185	1	5		5		1	100	5		5		5		1	80	5		1		5		5		2	50	5		2	350	5		5		2	350	5		5		5	
101	44	82	162	1																																								

Resultados Individuales GR - Preguntas 20 a 38

Datos personales					Preguntas																																												
Nº	Edad		Peso		Talla		Cond.		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38				
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr					
107	32	75	170	1	5		2	120	5	100	5		5		2	270	1	80	5		1		5		5		2	50	5		5		5		5		5		1	350	5		5						
108	27	80	167	1	5		1	120	1	100	5		5		5		4	80	5		1		4	75	5		5		1	700	5		3	2000	5		2	700	5		5								
109	18	67	174	1	5		1	120	1	100	5		5		1	90	2	80	5		1		5		5		3	50	2	700	5		2	700	5		5		1	700	5		5						
111	43	82	163	1	4	80	1	240	2	100	4	100	5		1	90	4	80	4		1		3	75	4	100	5		2	350	3	350	4	350	4	200	3	350	2	350	4	100							
112	35	105	180	1	4	160	2	120	5		5		3	80	5		1	80	5		1		5		1	100	2	50	5		2	700	2	350	5		2	700	5		5								
113	50	69	150	1	2	80	3	120	5		5		5		1	90	2	80	1		2		2	75	5		3	150	5		5		5		5		5		2	350	5								
114	21	60	172	1	3	80	2	120	5		4	100	5		3	90	2	80	5		1		5		5		3	50	3	1000	5		2	700	5		2	1100	5		5								
115	43	75	178	1	5		1	120	1	100	5		1	80	1	90	2	80	5		1		2	75	1	100	5		5		5		5		5		5		1	700	5								
116	52	78	175	1	4	80	2	240	2	200	4	100	4	80	2	90	2	160	5		1		3	150	2	100	4	50	2	350	4	350	5		5		5		5		4	100							
117	30	91	178	1	5		2	240	2	200	5		2	80	4	90	4	80	5		1		4	75	1	100	4	50	5		5		5		5		5		4	350	5		5						
118	41	80	164	1	5		4	120	4	100	5		4	80	2	90	2	80	5		1		3	150	2	100	3	50	3	350	5		4	350	5		3	350	5		5								
120	57	74	168	1	5		3	120	3	100	5		5		5		5		5		1		4	75	4	100	4	50	3	350	3	350	4	350	5		3	350	5		5								
121	48	75	165	1	5		2	240	2	200	5		5		3	90	3	80	5		1		4	75	5		4	50	4	350	5		1	350	5		1	700	5		5								
122	58	90	160	1	5		3	120	3	100	5		4	80	3	90	3	80	1		1		4	150	2	100	5		2	350	4	350	5		4	200	2	700	2	700	4	200							
125	21	68	173	1	5		2	240	2	200	5		1	80	2	90	1	80	5		1		2	150	2	100	2	50	2	350	5		5		5		5		2	350	2	350	5						
126	20	87	192	1	5		1	120	1	100	1	100	2	80	2	350	2	350	5		1		2	250	1	100	2	250	1	350	5		5		5		1	350	5		5								
130	20	85	175	1	2	160	2	360	2	300	5		2	160	1	90	1	80	5		1		4	150	2	200	2	50	2	350	2	700	2	700	5		1	2000	5		5								
131	36	92	165	1	5		5		2	300	5		5		2	90	2	80	5		1		5		2	100	5		5		2	700	2	2000	5		2	1100	5		5								
133	43	90	165	1	5		3	120	5		5		5		5		5		5		1		5		2	100	5		5		3	700	5		1	1100	5		5										
134	54	76	160	1	3	80	1	240	1	200	5		5		5		5		5		1		3	75	5		5		2	350	5		5		2	700	5		5										
136	32	70	172	1	5		1	120	1	100	5		5		2	180	2	160	5		1		4	75	2	200	4	50	1	700	5		2	1100	5		3	350	5		5								
137	22	66	173	1	5		2	240	2	200	5		2	80	2	90	3	80	5		1		2	150	2	100	2	50	5		5		2	350	5		2	350	5		5								
138	27	80	177	1	5		4	120	5		5		5		5		4	80	1		5		5		4	100	2	50	5		5		1	700	5		3	350	5		5								
139	28	90	187	1	5		2	240	2	200	4	100	2	80	2	90	2	80	5		1		2	250	1	100	4	50	2	700	5		2	2000	5		1	700	5		5								
140	35	85	178	1	5		2	120	2	100	5		5		2	180	2	160	5		1		2	75	2	100	4	50	2	350	1	350	4	350	5		2	350	5		5								
141	36	88	176	1	5		4	120	4	100	5		5		5		2	80	5		1		2	75	2	100	5		5		2	350	2	350	5		5		5										
142	19	62	175	1	5		5		5		5		5		2	160	1	90	5		5		2	150	1	100	5		5		2	700	2	2000	5		1	1100	5		5								
143	42	62	162	1	5		3	240	3	200	5		4	80	3	180	2	80	1		1		2	150	5		4	50	5		5		4	350	5		2	350	5		5								
144	41	70	157	1	5		2	120	3	200	5		2	160	1	180	1	80	5		1		3	75	1	100	3	50	5		5		5		5		2	350	2	350	5		5						
145	28	72	174	1	5		5		1	200	5		5		5		2	80	5		1		4	250	1	300	5		5		2	350	5		5		2	350	5		5								
146	35	90	187	1	5		2	240	2	200	5		5		2	180	3	250	5		1		5		5		4	150	5		5		5		5		5		5		1	700	5		5				
147	38	100	182	1	5		2	240	2	200	5		5		2	90	5		5		1		2	150	5		5		5		5		5		5		5		5		5								
148	42	66	162	1	3	160	4	80	5		2	100	2	80	1	90	1	80	5		1		2	75	1	200	2	50	2	700	5		5		5		5		1	350	5		5						
149	44	51	155	1	5		2	120	5		4	100	1	160	5		5		5		1		3	250	5		5		5		2	350	5		1	350	5		5										
150	37	60	165	1	5		2	240	2	200	5		5		1	180	2	160	5		1		2	250	2	200	2	100	2	700	5		3	700	5		1	350	5		5								
151	47	94	160	1	5		5		5		5		5		5		5		5		1		5		5		5		1	2000	2	700	5		2	700	5		5										
152	26	110	180	1	5		1	360	1	300	4	300	3	280	1	270	2	250	5		1		1	250	4	100	4	150	5		2	350	5		5		1	700	5		5								
153	19	80	175	1	5		5		5		5		5		2	90	5		5		1		5		2	100	2	50	5		5		2	2000	5		5		1	350	5		5						
155	30	74	171	1	5		1	120	1	100	5		5		2	90	5		5		1		5		5		5		5		4	350	5		5		5		5										
157	32	95	160	1	4	80	2	120	2	100	5		5		2	90	5		1		1		3	150	2	100	3	50	1	350	5		5		5		2	700	5		5								
158	46	60	155	1	5		2	240	2	200	5		5		1	90	5		5		1		5		1	100	5		5		5		5		5		5		5		5								
159	28	84	178	1	5		2	120	2	100	5		5		5		2	80	5		1</																												

Resultados Individuales GR - Preguntas 20 a 38

Datos personales					Preguntas																																								
Nº	Edad	Peso	Talla	Cond.	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38				
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr			
167	29	75	178	1	5	5		5		5		5		5		2	90	5		5		1		2	150	5		5		5		5		3	2000	5		5		1	1100	5			
168	47	71	169	1	5	5		2	100	5		5		2	90	2	80	5		1		5		5		5		2	700	5		5		5		2	1100	5		5		5			
169	35	90	173	1	5	5		5		5		5		3	80	5		5		1		3	75	5		5		5		2	700	1	1100	5		5		5		5		5			
170	61	80	176	1	5	2	120	2	100	4	100	2	80	2	90	2	80	5		1		5		2	100	2	50	4	350	1	350	4	700	5		4	700	5		5		5			
171	30	78	168	1	5	2	120	5		5		5		5		1	80	5		1		2	75	5		2	50	5		5		5		5		1	350	5		5		5			
172	30	73	170	1	5	1	120	1	100	3	100	5		1	90	1	80	5		1		1	75	1	100	3	50	5		2	350	5		5		1	700	5		5		5			
173	21	60	165	1	5	1	360	1	300	5		5		5		3	250	5		1		4	250	5		5		5		2	350	2	2000	5		5		5		5		5			
174	26	90	175	1	5	2	120	5		5		2	80	5	2	80	5		1		5		1	100	2	50	5		5		2	2000	5		5		2	350	5		2	350	5		
175	32	93	178	1	5	2	120	2	100	2	100	2	80	5	2	80	5		1		5		1	100	1	50	5		2	350	3	700	5		1	700	5		5		5				
176	28	75	180	1	5	1	120	5		5		5		5		5		5		1		3	75	5		2	50	5		5		5		5		1	1100	5		5		5			
177	20	104	175	1	2	160	5		2	200	5		4	80	5		4	80	5		1		4	75	1	100	2	100	1	350	2	700	2	2000	5		4	700	5		5		5		
178	34	75	165	1	2	80	2	240	2	200	5		5	5		5		5		1		5		5		5		2	350	5		5		5		5		5		5		5			
179	38	67	167	1	5	2	120	2	100	5		5		5		2	80	5		1		5		2	100	5		5		1	350	2	700	5		4	700	5		5		5			
180	42	80	185	1	5	1	120	1	100	5		5		3	90	1	80	5		1		2	150	1	100	5		5		1	350	5		5		5		5		5		5			
181	34	71	154	1	5	2	120	2	100	5		2	80	1	90	2	80	1		1		2	150	1	100	1	50	5		2	1100	2	1100	2	200	1	1100	5		5		5			
182	37	90	185	1	5	2	120	2	100	5		5		2	90	5		5		1		4	75	1	100	5		5		5		5		5		2	700	5		5		5			
183	29	82	182	1	5	1	120	1	100	5		2	80	1	90	3	80	5		1		3	75	2	100	2	50	5		5		2	2000	5		5		5		5		5			
185	57	80	168	1	5	1	120	1	100	4	100	4	80	2	90	2	80	5		1		2	75	1	100	5		3	350	1	350	5		5		2	700	5		5		5			
186	44	98	198	1	5	2	120	2	100	5		5		5		5		5		1		5		5		2	50	2	700	5		5		5		2	350	5		5		5			
187	22	67	197	1	5	1	120	1	100	5		5		1	90	5		5		1		5		5		2	50	5		2	350	5		5		1	350	5		5		5			
188	34	72	160	1	5	1	120	1	100	5		5		5		5		5		1		5		5		2	50	2	350	5		5		5		2	350	5		5		5			
189	36	85	161	1	5	2	120	2	100	5		5		5		5		5		1		4	75	5		2	50	2	350	4	350	4	350	5		2	350	5		5		5			
190	30	63	163	1	5	2	120	2	100	5		2	80	5	2	80	5		1		2	75	5		5		5		2	1100	4	1100	5		2	350	5		5		5				
191	35	65	165	1	5	2	120	1	100	2	100	2	80	1	90	2	80	5		1		5		2	100	2	50	1	350	2	350	2	700	5		2	350	5		5		5			
192	35	76	175	1	5	1	120	1	100	3	100	2	80	1	90	2	80	5		1		2	150	5		2	50	5		5		2	1100	2	200	5		1	350	4	100		5		
193	29	123	185	1	5	2	120	2	100	5		2	80	2	90	2	80	5		1		3	75	2	100	3	50	3	700	2	700	4	350	2	1100	2	350	2	350	5		5			
194	31	72	170	1	5	5		5		5		5		2	80	1	90	5		5		1		2	150	5		5		2	700	2	1100	5		1	350	5		5		5			
196	34	71	170	1	4	160	2	120	4	100	4	200	4	80	4	90	4	80	5		1		2	150	1	100	2	100	2	350	4	350	4	1100	4	200	4	350	4	350	4	350	4	350	4
197	36	98	176	1	5	1	240	1	200	5		5		1	90	1	80	5		1		2	150	2	200	5		2	350	5		5		5		2	700	5		3	100		5		
199	31	59	172	1	5	1	120	1	100	5		5		5		1	80	5		1		2	250	5		2	50	5		5		5		5		1	350	5		5		5			
200	38	75	168	1	3	80	2	120	2	100	5		5		2	90	2	80	5		1		4	75	5		3	50	2	350	3	350	5		2	350	5		5		5				
202	31	63	163	1	5	2	240	5		5		4	80	2	180	2	160	1		5		2	75	2	100	5		1	350	5		5		5		2	350	3	350	3	100		5		
205	37	73	168	1	5	1	240	2	200	5		5		2	90	4	80	1		5		5		5		5		5		5		5		5		5		1	1100	5		5		5	
206	20	58	158	1	5	2	120	2	100	5		3	80	2	90	5		5		1		5		2	100	3	50	5		5		3	350	5		5		1	350	5		5		5	
207	43	106	171	1	5	1	120	1	100	3	100	5		1	90	3	80	5		5		3	150	5		2	50	5		1	350	5		5		5		1	700	3	100		5		
208	31	61	168	1	5	2	120	2	100	5		1	80	1	90	2	160	5		1		5		1	100	3	50	5		5		2	350	5		5		1	700	8		5		5	
209	40	115	180	1	5	1	120	1	100	5		5		5		5		5		1		3	150	2	100	5		1	350	5		5		5		1	350	5		5		5			
210	44	87	173	1	5	2	120	2	100	5		2	80	1	90	1	80	5		1		2	75	5		5		5		2	700	5		2	1100	5		5		5		5			
211	47	72	174	1	5	1	120	5		5		1	80	5		1	80	5		1		2	75	1	100	1	50	2	1000	5		2	2000	5		1	700	5		5		5			
212	43	75	175	1	2	80	1	120	1	100	2	100	1	160	1	90	1	80	5		1		2	75	1	100	1	50	1	350	2	350	5		1	350	5		5		1	350	5	1	100
213	42	80	171	1	5	1	120	1	100	5		5		1	90	1	80	5		1		5		2	100	2	50	5		1	350	2	350	5		5		2	700	5		5			
214	28	53	160	1	5	1	120	1	100	5		5		1	90	5		5		5		4	75	5		5		1	350	2	350	3	350	5		5		5		5		5			
215	41	79	175	1	5	2	240	2	200	5		2	160	1	90	2	80	5		1		5		2	100	5		5		1	350	5		5		2	350	2	350	5		5			
216	20	75	180	1	5	3	120	3	100	5		5		2																															

Resultados Individuales GR - Preguntas 20 a 38

Datos personales					Preguntas																																									
Nº	Edad		Peso		Talla		Cond.		20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38	
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr	Fr	Gr		
222	45	77	168	1	5		5		5		3	100	5		5		5		5		5		1		5		5		5		1	350	5		5		1	350	5		5		5			
224	52	56	152	1	1	80	2	120	2	100	4	100	5		1	90	2	80	5		2		3	75	2	100	5		5		3	700	2	350	5		5		5		5		3	100		
225	34	86	172	1	5		2	240	2	200	5		1	160	5		5		1	5		2	250	1	200	5		1	700	5		5		5		1	700	5		5		5				
227	31	95	156	1	2	80	2	120	2	100	2	100	5		2	90	5		2	90	5		5	2	100	2	50	2	350	3	350	3	350	3	200	5		1	700	2	100					
228	30	95	180	1	4	80	1	240	1	100	5		3	80	3	90	3	80	5		1	3	75	1	100	3	50	3	350	5		5		5		2	350	5		5		5				
229	37	95	190	1	5		1	240	1	200	5		4	80	1	90	2	80	5		1	2	250	1	100	5		5		4	350	2	700	5		2	350	5		5		5				
230	33	96	180	1	5		1	240	1	200	5		4	80	2	90	2	80	5		1	2	250	2	100	2	50	2	350	2	350	1	350	5		1	350	5		5		5				
231	60	90	170	1	5		1	240	5		5		5		5		4	80	5		1	5		5		5		1	350	5		5		5		2	350	5		5		5				
232	18	73	175	1	5		4	120	4	100	5		2	160	2	90	2	80	5		1	2	250	2	100	5		3	350	4	1100	2	1100	5		2	700	5		5		5				
234	24	98	170	1	5		1	120	1	100	5		5		5		2	80	5		1	5		1	100	5		1	700	5		2	700	2	200	1	1100	5		5		5				
235	37	78	172	1	5		2	120	2	100	5		1	160	1	90	2	80	5		1	3	75	2	100	2	50	2	350	5		5		5		1	350	5		5		5				
236	20	62	175	1	5		2	120	2	100	5		5		1	90	2	80	5		1	2	250	5		5		2	700	2	2000	2	1200	5		5		5		5		5				
239	37	70	165	1	5		2	120	2	100	5		1	80	2	90	2	80	5		1	1	75	1	100	2	50	5		5		2	700	5		5		1	700	5		5				
240	33	72	168	1	5		2	360	2	300	5		2	160	2	180	1	160	5		1	3	250	3	200	2	100	2	350	2	1100	2	2000	5		1	350	5		5		5				
241	30	82	167	1	5		1	360	1	300	5		5		5		2	80	5		1	2	250	2	100	5		2	350	2	2000	5		3	200	2	350	5		5		5				
242	31	78	180	1	3	160	2	360	2	300	5		2	280	4	270	2	160	5		1	4	75	2	300	3	150	4	350	3	350	3	350	5		2	350	5		5		5				
243	39	80	170	1	1	80	1	240	4	200	5		4	80	5		2	80	5		1	3	75	5		3	50	5		5		5		1	700	5		5		5		5				
244	32	74	175	1	5		5		5		5		5		5		5		5		1	5		5		3	100	2	350	1	2000	2	2000	5		1	700	5		5		5				
245	22	75	189	1	5		2	360	2	300	5		2	160	5		2	160	5		1	3	250	1	100	4	100	2	1000	5		2	2000	5		2	1100	5		5		5				
246	23	70	182	1	5		2	240	2	100	5		2	160	5		1	250	5		1	5		2	300	2	50	5		5		5		5		1	700	5		5		5				
247	24	93	170	1	2	80	1	120	1	100	5		4	80	1	90	1	80	5		1	4	75	1	200	4	50	1	350	1	350	4	350	4	200	1	350	5		5		5				
248	42	58	162	1	5		2	120	2	100	5		5		2	90	2	80	5		1	5		2	100	2	50	2	350	2	350	5		5		5		1	350	5		5				
249	55	95	169	1	2	80	1	120	2	100	2	100	5		2	90	5		5		1	5		1	100	5		1	350	2	700	5		5		5		5		5		2	100			
250	22	96	170	1	5		5		5		5		2	80	2	180	5		5		1	2	150	1	200	3	50	5		5		2	2000	5		5		1	700	5		5				
251	65	97	187	1	5		2	120	2	100	5		5		1	90	5		1	5		2	75	2	100	2	50	5		2	350	5		5		1	350	5		5		5				
252	42	74	168	1	5		2	120	2	100	5		5		5		5		5		1	5		2	75	1	100	5		1	350	5		5		2	400	5		5		5				
253	47	78	165	1	5		3	120	5		5		5		3	90	5		1	1		2	150	5		2	50	5		1	350	5		5		5		5		2	350	3	100			
254	52	70	167	1	5		1	120	1	100	5		2	80	1	90	1	80	5		1	2	150	1	200	5		5		1	350	5		5		5		5		1	700	5		5		
255	40	72	170	1	5		1	120	1	100	3	100	5		5		3	80	5		1	5		5		4	50	1	350	1	350	4	2000	5		2	350	5		5		5				
257	21	78	180	1	5		1	120	1	100	5		2	80	2	90	2	80	5		1	2	75	2	100	5		5		5		5		5		1	1100	5		5		5				
258	37	87	172	1	2	80	2	120	2	100	5		5		5		5		5		1	5		5		2	50	1	1000	5		5		5		2	700	5		5		5				
259	43	83	170	1	5		2	240	2	200	5		5		4	90	4	80	5		1	4	75	4	100	2	50	2	350	2	350	4	350	5		2	350	5		5		5				
260	34	65	162	1	5		2	240	2	200	5		2	80	2	90	2	80	5		1	2	150	2	100	5		5		5		5		5		1	1100	5		5		5				
261	34	62	160	1	5		2	120	2	100	5		5		5		2	80	5		1	5		5		2	50	5		2	350	5		5		4	350	5		5		5				
262	54	80	170	1	5		2	360	2	300	5		4	80	2	180	2	80	5		1	2	150	2	100	5		2	350	5		5		5		2	350	5		5		5				
263	31	95	182	1	5		2	240	2	200	5		5		1	90	1	80	5		1	5		5		2	1000	5		4	700	2	200	2	700	5		5		5		5				
264	42	78	160	1	5		5		5		5		5		5		2	80	5		1	2	150	1	100	5		5		5		5		5		5		5		5		5				
265	23	58	166	1	4	80	2	240	2	200	4	100	4	80	4	90	5		1	1		4	75	4	100	5		1	350	4	350	3	700	5		5		5		5		5				
266	44	96	169	1	4	80	1	450	2	200	5		5		4	90	5		5		1	1	75	5		4	50	1	350	5		5		5		5		5		5		5				
267	39	80	167	1	2	80	2	360	2	450	5		4	80	5		5		5		1	5		3	150	2	300	5		3	700	3	350	5		5		5		2	350	5		5		
268	49	80	171	1	5		3	120	3	100	5		2	80	5		1	80	5		1	3	75	2	100	5		5		5		3	350	5		5		1	350	5		5		5		
269	35	60	165	1	5		2	240	5		5		5		5		5		5		1	3	150	5		1	50	1	350	5		2	700	5		1	700	5		5		5				
270	39	70	170	1	5		2	120	5		5		5		5		5		5		1	5		5		2	50	5		5		5		5		5		5		5		5				
273	39	60	156	1	5		2	120	2	100	5																																			

Resultados Individuales GR - Preguntas 39 - 40 y OTA

Nº	Datos personales				Preguntas				Resultado de OTA ng/ml
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		
	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	
1	36	71	165	1	3	50	1	70	0,0040
2	39	115	175	1	3	100	1	70	0
3	36	84	172	1	2	50	1	70	0,5039
4	46	70	168	1	5		1	70	0,1959
6	36	67	160	1	2	50	1	30	0,4922
7	37	67	168	1	5		1	140	5,7034
8	23	65	160	1	2	50	1	140	0
9	23	80	172	1	2	50	1	30	2,0134
12	38	70	160	1	2	200	1	140	0,1627
13	47	60	165	1	2	50	1	140	0,3460
14	44	73	170	1	1	100	1	200	0,4895
16	44	86	170	1	2	100	1	140	0
17	38	90	180	1	2	100	1	200	0
18	27	61	157	1	2	100	1	70	0,0140
19	25	67	185	1	2	100	1	140	0
20	46	68	168	1	3	100	1	70	0
21	29	61	165	1	2	100	1	140	0
22	25	70	158	1	2	100	1	200	0,7271
23	30	80	174	1	1	50	1	70	3,4668
24	31	70	163	1	2	50	1	140	0,0205
25	34	90	173	1	1	100	1	140	0,0630
26	19	79	163	1	2	100	1	140	1,0673
27	52	79	165	1	1	50	1	200	9,600
28	26	78	173	1	2	100	1	200	0
29	43	76	168	1	2	50	1	140	0
31	24	63	170	1	3	200	1	140	0
32	21	82	1,85	1	2	50	1	30	0,0832
33	27	62	173	1	2	100	1	70	0,4413
35	25	82	170	1	2	200	1	200	0,0970
36	19	100	192	1	3	50	1	70	23,6289
37	24	66	170	1	2	200	1	140	0,8085
38	22	61	170	1	2	100	1	30	1,3639
40	50	73	170	1	2	50	1	140	1,2769
41	25	63	165	1	1	50	1	140	6,0755
42	48	76	173	1	5		1	30	0,7718
43	42	74	167	1	2	100	1	200	0,5557
44	23	88	180	1	2	100	1	200	0,6384
45	24	70	170	1	5		1	200	0
46	23	64	165	1	2	100	1	30	0,4802
47	18	60	160	1	5		1	30	0,0880
48	26	82	173	1	5		1	30	0,5427
49	26	73	170	1	2	100	1	70	1,4399
50	38	60	157	1	2	50	1	200	0

Resultados Individuales GR - Preguntas 39 - 40 y OTA

51	50	80	180	1	5		1	200	0	
Datos personales				Preguntas				Resultado de OTA ng/ml		
Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40				
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr		Gr	
52	37	91	173	1		5		1	200	0,4026
53	41	72	169	1		2	100	1	200	0
54	43	75	170	1		2	100	1	30	0,1200
58	52	69	178	1		1	200	1	70	0,3564
59	41	94	199	1		2	50	1	70	0,1820
60	29	86	178	1		2	100	4	140	0,2871
63	40	57	165	1		2	100	1	200	0,1967
64	41	70	170	1		2	100	1	70	0,3720
65	23	75	155	1		2	100	1	200	0,1030
66	23	62	182	1		2	50	2	30	0,3562
67	22	80	180	1		2	100	1	30	0,2367
68	22	106	190	1		3	100	1	70	0,2038
69	18	57	166	1		1	50	1	140	2,6734
70	20	85	178	1		2	100	1	140	0,0820
71	41	60	162	1		2	50	1	70	0,1498
72	55	100	175	1		5		1	70	3,0428
73	23	90	190	1		2	200	1	200	0,3541
74	60	78	180	1		1	50	1	30	30,5932
75	19	55	160	1		2	100	1	70	0
76	42	80	180	1		2	50	1	70	0,3200
77	26	63	165	1		2	100	1	30	0
78	22	98	185	1		2	100	1	70	0,0886
79	27	96	186	1		2	50	1	200	0,1530
80	36	78	178	1		3	200	1	140	0,7800
81	45	72	170	1		2	100	1	200	0,1284
82	43	84	180	1		2	50	1	200	0,7840
83	37	68	160	1		2	100	1	200	2,6239
84	30	74	170	1		2	200	1	30	0
85	38	76	159	1		3	50	1	140	0,3269
86	51	75	171	1		5		1	200	0
87	32	76	185	1		2	100	1	30	0,3342
88	46	65	170	1		2	100	1	200	0,1762
89	60	77	165	1		2	50	1	70	74,8036
91	29	106	165	1		2	200	1	140	0
92	46	73	165	1		2	50	1	140	0
93	44	75	171	1		2	50	1	70	1,3059
94	24	95	185	1		2	100	1	30	0
95	45	90	165	1		3	50	1	200	0,4130
96	34	87	190	1		2	100	1	30	1,3355
97	54	93	168	1		5		1	200	0
98	32	92	165	1		2	100	1	200	4,2909
99	20	72	170	1		2	100	1	200	0,4301
100	21	96	185	1		5		1	140	0
101	44	82	162	1		3	100	1	140	1,4639
102	46	90	161	1		2	200	4	70	0,2688
103	31	100	170	1		2	50	1	70	0,5266
104	53	59	157	1		2	100	1	70	0

Resultados Individuales GR - Preguntas 39 - 40 y OTA

105	29	51	160	1	2	50	1	140	0,1838
106	32	70	163	1	2	200	1	70	0
Datos personales				Preguntas					
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Resultado de OTA ng/ml
107	32	75	170	1	2	50	1	200	0
108	27	80	167	1	2	100	1	30	0
109	18	67	174	1	2	100	1	30	0,7285
111	43	82	163	1	2	50	1	200	0,2148
112	35	105	180	1	3	200	1	200	0,1918
113	50	69	150	1	2	50	1	140	0,1691
114	21	60	172	1	2	100	1	200	0,6184
115	43	75	178	1	2	50	1	200	0
116	52	78	175	1	3	100	1	30	0,0280
117	30	91	178	1	2	100	1	30	0,4355
118	41	80	164	1	2	100	1	30	0
120	57	74	168	1	2	100	1	200	0,5186
121	48	75	165	1	2	100	1	140	0,4345
122	58	90	160	1	3	100	1	200	6,2864
125	21	68	173	1	1	200	1	200	0
126	20	87	192	1	2	200	1	200	0,5697
130	20	85	175	1	2	200	1	30	0,3156
131	36	92	165	1	3	100	1	70	0
133	43	90	165	1	5		1	2000	0,8752
134	54	76	160	1	1	100	1	30	0,3647
136	32	70	172	1	2	50	1	30	0
137	22	66	173	1	2	50	1	200	0
138	27	80	177	1	2	100	1	30	0,3282
139	28	90	187	1	2	100	1	70	0
140	35	85	178	1	2	100	1	30	1,1982
141	36	88	176	1	2	100	1	140	8,1358
142	19	62	175	1	2	100	1	70	0
143	42	62	162	1	2	100	1	200	0
144	41	70	157	1	3	200	1	200	0
145	28	72	174	1	2	100	1	200	0
146	35	90	187	1	1	200	1	200	0
147	38	100	182	1	2	100	1	30	0
148	42	66	162	1	1	100	1	200	0
149	44	51	155	1	1	50	1	200	0
150	37	60	165	1	2	100	1	200	9,5874
151	47	94	160	1	5		1	200	0,2723
152	26	110	180	1	2	200	1	200	0,5970
153	19	80	175	1	2	100	1	30	9,6931
155	30	74	171	1	2	200	1	200	4,2666
157	32	95	160	1	2	100	1	200	1,5205
158	46	60	155	1	2	100	1	200	1,2675
159	28	84	178	1	5		1	200	0,7085
160	32	85	174	1	2	100	1	200	2,7022
161	42	87	170	1	3	50	1	200	0
162	46	82	180	1	3	50	1	200	0,1257
163	21	67	172	1	2	100	1	200	1,7194

Resultados Individuales GR - Preguntas 39 - 40 y OTA

164	29	77	182	1	2	100	1	200	0,7870
165	20	68	160	1	2	50	1	70	0,7614
166	52	82	178	1	2	50	1	200	0
	Datos personales				Preguntas				
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Resultado de OTA ng/ml
167	29	75	178	1	3	100	1	200	1,5589
168	47	71	169	1	3	50	1	200	0,8334
169	35	90	173	1	2	100	1	200	0,6645
170	61	80	176	1	2	200	1	140	0,3100
171	30	78	168	1	2	200	1	30	5,1673
172	30	73	170	1	2	50	1	70	5,8436
173	21	60	165	1	1	200	1	140	4,2516
174	26	90	175	1	5		1	200	0,2140
175	32	93	178	1	2	200	1	140	0
176	28	75	180	1	3	200	1	200	0
177	20	104	175	1	2	100	1	30	0
178	34	75	165	1	2	200	1	200	0
179	38	67	167	1	2	50	1	200	0
180	42	80	185	1	2	100	1	200	0
181	34	71	154	1	2	100	1	200	0,1719
182	37	90	185	1	5		1	70	0
183	29	82	182	1	2	100	1	200	0,3405
185	57	80	168	1	2	100	1	200	0
186	44	98	198	1	2	200	1	140	2,6644
187	22	67	197	1	3	50	1	200	0
188	34	72	160	1	2	100	1	70	0
189	36	85	161	1	5		1	30	0,2645
190	30	63	163	1	2	100	1	30	0
191	35	65	165	1	2	200	1	140	0,5746
192	35	76	175	1	2	100	1	140	0
193	29	123	185	1	5		2	140	0
194	31	72	170	1	2	200	1	70	0,8216
196	34	71	170	1	3	100	1	140	0
197	36	98	176	1	2	100	1	70	13,6713
199	31	59	172	1	2	100	1	200	1,5716
200	38	75	168	1	3	100	1	30	0
202	31	63	163	1	2	50	1	200	0
205	37	73	168	1	2	50	1	200	0
206	20	58	158	1	2	50	1	70	8,6871
207	43	106	171	1	2	100	1	200	8,6324
208	31	61	168	1	2	200	1	200	4,3125
209	40	115	180	1	5		1	200	0,3262
210	44	87	173	1	2	50	1	140	0
211	47	72	174	1	2	100	1	200	0
212	43	75	175	1	1	100	1	70	0,2382
213	42	80	171	1	2	200	1	200	0
214	28	53	160	1	2	200	1	200	0
215	41	79	175	1	2	200	1	200	1,2138
216	20	75	180	1	2	100	1	140	0,7034
217	25	84	175	1	5		1	200	0,4465

Resultados Individuales GR - Preguntas 39 - 40 y OTA

218	28	58	165	1	2	100	1	200	0,2976
219	25	67	161	1	5		1	200	0
220	36	80	175	1	5		1	140	0,2651
	Datos personales				Preguntas				
	Edad	Peso	Talla	Cond.	39		40		
Nº	Años	Kg	cm	1 a 5	Fr	Gr	Fr	Gr	Resultado de OTA ng/ml
222	45	77	168	1	2	100	1	140	0
224	52	56	152	1	2	50	1	200	0
225	34	86	172	1	2	200	1	70	3,3125
227	31	95	156	1	2	50	1	140	0,4009
228	30	95	180	1	2	50	1	30	1,4866
229	37	95	190	1	2	100	1	200	1,3688
230	33	96	180	1	2	100	1	30	0
231	60	90	170	1	2	100	1	30	3,6426
232	18	73	175	1	4	50	1	70	0
234	24	98	170	1	2	50	1	30	0,6634
235	37	78	172	1	2	50	1	200	0,5443
236	20	62	175	1	2	200	1	140	1,3738
239	37	70	165	1	4	50	1	200	0,6097
240	33	72	168	1	2	200	1	30	0
241	30	82	167	1	2	100	1	200	3,0556
242	31	78	180	1	2	100	1	70	0
243	39	80	170	1	2	100	1	140	0
244	32	74	175	1	2	200	1	200	0,6124
245	22	75	189	1	2	200	1	170	1,8909
246	23	70	182	1	5		1	70	2,0245
247	24	93	170	1	2	100	1	140	0,3676
248	42	58	162	1	2	100	1	200	0
249	55	95	169	1	2	200	1	140	0
250	22	96	170	1	2	200	1	70	0
251	65	97	187	1	2	50	1	200	0,8197
252	42	74	168	1	2	200	1	200	0
253	47	78	165	1	3	100	1	200	0,5197
254	52	70	167	1	2	100	1	200	0
255	40	72	170	1	1	100	1	70	0
257	21	78	180	1	2	200	1	30	0
258	37	87	172	1	2	100	1	200	0
259	43	83	170	1	1	200	1	200	0
260	34	65	162	1	2	100	1	200	0
261	34	62	160	1	2	100	1	200	0,6968
262	54	80	170	1	2	100	1	200	0
263	31	95	182	1	2	200	1	200	3,4194
264	42	78	160	1	4	50	1	30	0
265	23	58	166	1	4	50	1	70	0,4215
266	44	96	169	1	1	200	1	70	0
267	39	80	167	1	2	100	1	140	0
268	49	80	171	1	2	50	1	200	1,2820
269	35	60	165	1	1	100	1	200	0,3160
270	39	70	170	1	5		1	200	0,3055
273	39	60	156	1	2	100	1	200	1,2176

Resultados Individuales GR - Preguntas 39 - 40 y OTA

274	37	100	170	3	2	100	1	140	0
275	42	85	180	1	2	200	1	140	0,0257

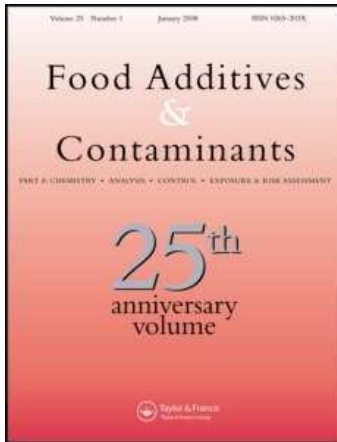
This article was downloaded by: [EBSCOHost EJS Content Distribution]

On: 8 March 2009

Access details: Access Details: [subscription number 902156990]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Food Additives & Contaminants: Part A

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713599661>

Survey of Argentinean human plasma for ochratoxin A

A. M. Pacin ^{ab}; E. V. Ciancio Bovier ^a; E. Motta ^c; S. L. Resnik ^{bd}; D. Villa ^e; M. Olsen ^f

^a Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina ^b Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina ^c Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina ^d Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina ^e Dirección Sistemas, Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina ^f National Food Administration, Microbiology Division, Uppsala, Sweden

First Published: May 2008

To cite this Article Pacin, A. M., Ciancio Bovier, E. V., Motta, E., Resnik, S. L., Villa, D. and Olsen, M. (2008) 'Survey of Argentinean human plasma for ochratoxin A', *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25:5, 635 — 641

To link to this Article: DOI: 10.1080/02652030701613709

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/02652030701613709>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Survey of Argentinean human plasma for ochratoxin A

A. M. PACIN^{1,2}, E. V. CIANCIO BOVIER¹, E. MOTTA³, S. L. RESNIK^{2,4}, D. VILLA⁵, & M. OLSEN⁶

¹Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, M. Dorronzoro 141, B6700FTA Luján, Buenos Aires, Argentina, ²Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina, ³Universidad Nacional de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, ⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, ⁵Dirección Sistemas, Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina, and ⁶National Food Administration, Microbiology Division, Uppsala, Sweden

(Received 27 July 2007; accepted 3 August 2007)

Abstract

The presence of ochratoxin A (OTA) in human blood has been reported for many countries, especially in Europe. However, so far no report exists concerning such a presence in Argentina. The aim of this study was to assess OTA concentration in human plasma in two different areas of Buenos Aires province. OTA was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) in 199 plasma samples from blood donors in Mar del Plata and 236 from General Rodríguez. Solid-phase extraction with Bakerbond[®] C-18 cartridge and a final purification with Ochraprep[®] immunoaffinity columns was employed. The limit of quantification of ochratoxin A was 0.019 ng ml⁻¹ and the confirmation of OTA was by formation of ochratoxin A methyl ester. The results showed that 63.8% of human plasma samples from Mar del Plata and 62.3% from General Rodríguez were positive for OTA, with Winsorized means of 0.15 and 0.43 ng ml⁻¹, respectively. It is important to continue the research to detect the foods responsible of the presence of OTA in plasma.

Keywords: *Ochratoxin, mycotoxin, human plasma, exposure*

Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species. It can contaminate a variety of food items such as cereals, coffee, wine, beer, etc., resulting in chronic human exposure. OTA is very toxic to several animal species, the kidney being the main target organ. Two distinct pathological conditions have been associated with exposure to OTA: Balkan endemic nephropathy (BEN), described as progressive karyomegalic interstitial nephritis resulting ultimately in complete renal failure, and urinary tract tumours (UTT) that have been reported to occur with a higher incidence in endemic areas of BEN (Fink-Gremmels 2005). Although an association between intake of OTA and BEN in humans has been postulated, causality has not yet been established (Walker and Larsen 2005).

Based on food consumption in Europe, the Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2001) estimated the mean total OTA intake to be 45 ng kg⁻¹ body weight week⁻¹, assuming a body weight of 60 kg (Walker and Larsen 2005). The wide range of food types, the sporadic occurrence, and the low levels at which OTA is found make assessment of exposure through analysis of foods particularly problematic (Gilbert et al. 2001; Thuvander et al. 2001).

The occurrence of OTA has not been studied in depth in Argentina and only a small number of food samples have been found to be positive at low levels in the country (Soleas et al. 2001; Rosa et al. 2004; Pacin et al. 2005). However, monitoring of blood or urine samples can give an indication of the overall situation on the occurrence of OTA in food in the local market.

OTA levels in plasma and urine have to be considered as typical biomarkers of exposure (Gilbert et al. 2001) and no other appropriate effect-related biomarkers have as yet been identified (Fink-Gremmels 2005). The presence of OTA in human blood has been reported in many studies (Scott 2005), but none has been performed in Argentina. There is a strong need for a risk assessment of human exposure to mycotoxins, including OTA, in the South Cone countries. The aim of this preliminary study was to monitor OTA in human blood samples in two areas of the Buenos Aires province in Argentina, with a standardized methodology for OTA determination implemented in Latin America South Cone laboratories.

Materials and methods

Mar del Plata is an Argentine city located on the coast of the Atlantic Ocean in the Buenos Aires Province, 400 km south of Buenos Aires. Mar del Plata is one of the major fishing ports whose industry concentrates on fish processing. The area is also host to other light industry, such as textile and food manufacturing, and the biggest seaside beach resort in Argentina. With a population of 541 733 (2001 census, INDEC) it is the seventh largest urban area in Argentina. Due to the fact that this is a tourist city, the population increases during the summer season, occasionally quadrupling the number of residents.

General Rodriguez is located 55 km to the west of Buenos Aires, its population being 67 931 (2001 census, INDEC). The main industry is a milk factory; secondarily the population carries out rural work.

Taking into account the last census (2001, INDEC) and keeping in mind the socio-demographic indicator, it can be inferred that the population attending Vicente López y Planes Hospital at General Rodriguez has less resources than the population attending Zonal Hospital at Mar del Plata.

Collection of blood samples

Blood samples from donors were collected in two different localities of Buenos Aires province, Argentina, in February 2004 in the Regional Hemotherapy Center of Mar del Plata and between April and July 2005 in Vicente Lopez y Planes Hospital of General Rodriguez. The first step of the blood donation procedure in the hospitals was to ask donors to fill in a questionnaire which allows a physician to set apart some of them (e.g. those with low weight, the elderly, those suffering from hepatitis). Moreover, it is compulsory in Argentina to make human immunodeficiency virus (HIV) and Chagas virus analysis on the blood before including it in the blood bank. The numbers of samples were 205 for Mar del Plata and 275 for General Rodriguez. However, after excluding samples from donors with HIV and Chagas virus, the numbers of samples were 199 plasma samples from Mar del Plata and 236 from General Rodriguez. In Argentina it is more common to receive men's blood than women's donations. Table I shows information about the blood donors in both localities.

Ochratoxin A extraction and clean-up

The blood samples were conditioned with the anticoagulant K3EDTA (Vacutainer) immediately after collection. The samples were kept frozen at -18°C until analyses. The plasma was analysed for the presence of ochratoxin A according to the method of Scott et al. (1998) with some modifications, as reported below. A total of 1 ml of plasma was mixed with 0.25 ml saturated sodium chloride solution and 5 ml methanol with a vortex mixer, for 15 s in a centrifuge tube and centrifuged at an average relative centrifugal force of 500 g for 15 min. The supernatant was transferred to another tube and mixed with 5 ml 0.015 M *o*-phosphoric before adding to a Bakerbond[®] C-18 cartridge (art. 7020), preconditioned with 10 ml MeOH followed by 6 ml methanol-(0.015 M) *o*-phosphoric acid (1:1, v/v). Solvents passed through the column by gravity at a flow rate of one to two drops s^{-1} . Following the addition of supernatant, the column

Table I. Data of blood donors in Mar del Plata and General Rodriguez.

City	Sample amount			Age (years)				Weight (kg)			
				Female		Male		Female		Male	
	Female	Male	Total	Mean	SD*	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Mar del Plata	57	142	199	40	13	37	12	70	13	80	15
General Rodriguez	43	193	236	36	9	35	11	68	11	80	12

*Standard deviation.

was washed with 5 ml 0.015 M *o*-H₃PO₄ followed by 5 ml methanol:(0.015M) *o*-phosphoric acid (1:1, v/v). MeOH (2 ml) was added to the cartridge and allowed to stand for 3 min before elution. The evaporated extract was dissolved in 3 × 2.5 ml phosphate-buffered saline solution (PBS; a mixture of 0.26 g monoacid sodium phosphate, 1.14 g diacid sodium phosphate was dissolved separately and then added to 7.02 g sodium chloride, 0.201 g potassium chloride and 0.5 g sodium azide adjusted to pH 7.4 and diluted to 1 litre with bi-distilled water)–MeOH (85:15) and added to an Ochrarep[®] column. All solvents were passed through the column by gravity flow. The column was washed with 5 ml PBS solution–MeOH (85:15) followed by 10 ml distilled water.

OTA was eluted in two back flushing steps. First, with 3 ml MeOH and, second, with 1.5 ml MeOH into a silanized vial. The eluate were pooled and evaporated to dryness under vacuum, at 30°C.

The evaporated extract was dissolved in 200 µl mobile phase. An injection of 100 µl of sample extract was analysed by HPLC as described below.

The normal process to evaluate the methodology of OTA analysis includes three spiked concentrations in the linearity range (low, mid and high). As we needed a large sample size to prepare triplicate samples at each OTA level, a diagnosis laboratory was asked to collect blood remaining in samples to perform these recovery studies. The pools obtained were always contaminated with OTA, so it was impossible to work at a low level because of errors deriving from the initial contamination. Recoveries of spiked samples with OTA standard (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) were 85% for a contamination level of 2.4 ng ml⁻¹; 95% for 1.5 ng ml⁻¹; and 96% for 0.8 ng ml⁻¹. The mean recovery rate was 89.8%. They were all

in the range between 50 and 120% (European Commission 1998, 2002). Since there is no appropriate certified reference material available, only the recovery was determined, but not the trueness. The stability of test results was tested following a spiked control sample over the period of the study. Chart control is shown in Figure 1.

The range of linearity was between 0.012 and 7.12 ng ml⁻¹ ($r^2 = 0.99978$, $n = 7$). When samples presented higher contamination, dilution of the samples was made with mobile phase and a new injection was made to quantify the OTA.

Determination of OTA by HPLC

The HPLC system used was an Agilent[®] 1100 series which included a degasser (G1322A), an autosampler (G1313A), a fluorescence detector (G1321A), a quaternary pump (G1311A) and a thermostatted column compartment (G1316A). The used column was a C18 reverse-phase (4 mm i.d. × 125 mm containing 5 µm particle size, Hypersil BDS, Hypersil[®] with a guard column of the same phase (Hypersil BDS C18 4 mm i.d. × 4 mm, 5 µm). The mobile phase was acetonitrile–water–acetic acid (49.5:67:1, v/v/v). The flow rate was 1 ml min⁻¹. Fluorescence excitation and emission wavelengths were set at 330 and 470 nm, respectively. Retention times of OTA were in the range of 2–3 min.

Detection and quantification limits (LOD and LOQ) for OTA were 0.012 and 0.019 ng ml⁻¹, respectively (signal-to-noise ratios of 3:1 and 5:1, respectively).

Confirmation of OTA by methyl ester

The confirmation of the presence of OTA was performed through the formation of ochratoxin A

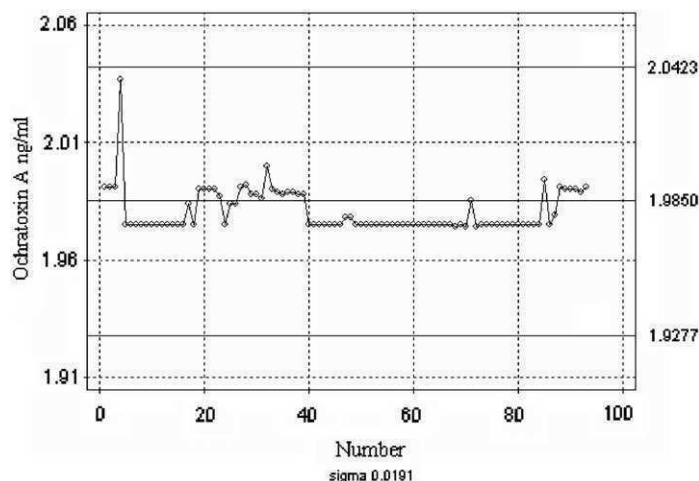


Figure 1. Control chart for ochratoxin A (OTA) (a) lower action limit (mean - 3 sigma), and (b) upper action limit (mean + 3 sigma).

methyl ester. Slight modifications of the procedure of Grosso et al. (2003) were made. Briefly, a quantitative portion of the methanolic elution phase from the immunological column was evaporated to dryness and resuspended into 200 μ l of a 12% methanolic solution of boron trifluoride (Baker C701-07). After heating for 15 min at 60°C, the derivative was analysed by HPLC with the same chromatographic conditions as for OTA. Confirmation of OTA as a methyl ester was performed on all contaminated samples. The retention time of the OTA methyl ester was approximately 16.3 min. Detection and quantification limits expressed as OTA were calculated with signal-to-noise ratios of approximately 3:1 and 5:1, respectively (0.017 and 0.028 ng ml⁻¹).

Estimation of ochratoxin A intake based on plasma levels

The mean of ochratoxin level in blood was used to estimate the continuous dietary intake according to Klaassen equations (Breitholtz et al. 1991; Thuvander et al. 2004):

$$k_0 = 0.99 \times C_p / 0.5 = 1.97 \times C_p \quad \text{and/or} \\ k_0 = 0.67 \times C_p / 0.5 = 1.34 \times C_p,$$

where k_0 is the continuous dietary intake (ng kg⁻¹ body weight day⁻¹); and C_p is the plasma concentration of OTA (ng ml⁻¹).

Statistical analysis

The alpha Winsorized mean with a percentage of substitution (or replacement) equal to 20 was used. This measure substitutes a percentage of extreme values for the last not replaced (Huber 1964; Hampel 1968; García Perez 2002). The Winsorized mean is a robust estimator of the population mean that is relatively insensitive to outlying values. Therefore, Winsorization is a method for reducing the effects of extreme values in the sample. The k -times Winsorized mean is calculated as:

$$\bar{X}_{wk} = \frac{1}{n} \left\{ (k+1)X_{(k+1)} + \sum_{i=k+2}^{n-k-1} X_{(i)} + (k+1)X_{(n-k)} \right\}.$$

Denoting $X_{(1)}, \dots, X_{(n)}$, the ordered sample, the Winsorized mean (\bar{X}_{wk}), is computed replacing the 20% smallest observations and the 20% largest observations by $X_{(k+1)}$ and $X_{(n-k)}$, respectively, where $k+1$ is the index of the order statistic that leaves 20% of the sample to its left. For a symmetrical distribution, the Winsorized mean is an unbiased estimate of the population mean. However, the Winsorized mean does not have a normal distribution even if the data are from a normal population.

The sample standard deviation (SD) is a commonly used estimator of the population scale. However, it is sensitive to outliers. With robust scale estimators the estimates remain bounded even when a portion of the data points is replaced by arbitrary numbers.

The Winsorized sum-of-squared deviations is defined as:

$$s_{wk}^2 = (k+1)(X_{(k+1)} - \bar{X}_{wk})^2 + \sum_{i=k+2}^{n-k-1} (X_{(i)} - \bar{X}_{wk})^2 \\ + (k+1)(X_{(n-k)} - \bar{X}_{wk})^2.$$

The square root of s_{wk}^2 is noted as the Winsorized SD.

To test the hypothesis that the means of the two groups from which the samples were drawn are equal, a Winsorized t -test was used (SAS Institute 1999). The statistic of this test is given by:

$$t_{wk} = \frac{\bar{X}_{wk}}{STDERR(\bar{X}_{wk})},$$

where $STDERR(\bar{X}_{wk})$ is the standard error of \bar{X}_{wk} :

$$STDERR(\bar{X}_{wk}) = \frac{n-1}{n-2k-1} \frac{s_{wk}}{\sqrt{n(n-1)}}.$$

S-Plus 7.0 software was used for the statistical analysis.

To calculate the Winsorized mean, values for non-detected samples were assigned as LOD/2 and samples with OTA contamination levels between LOD and LOQ were reported with the obtained values.

Results and discussion

Table II shows the OTA distribution of the plasma samples in both areas of the Buenos Aires province. The results reveal that 63.8% (64.1% male, 63.2% female) from Mar del Plata and 62.3% (63.2% male, 58.1% female) from General Rodríguez of human plasmas sampled were OTA-positive. The highest concentration in Mar del Plata was 47.6 ng ml⁻¹; and 74.8 ng ml⁻¹ in General Rodríguez.

Robust methods were used due to the fact that variables did not present a normal distribution (see Table II). These methods try to reduce the possible influence of the extreme data of a distribution. The median (measured of position not affected by extreme values) is one of the more used robust estimators; the OTA medians were 0.11 ng ml⁻¹ in Mar del Plata and 0.24 ng ml⁻¹ in General Rodríguez for the entire population.

Other robust estimators such as the mean alpha Winsorized, the average alpha trimmed, or the estimator of location of Huber are also used. In the

literature a criterion to select one of these estimators is proposed based on choosing the one that presents minor variance. The mean alpha Winsorized is recommended (García Perez 2002).

Table II. Frequency and level of ochratoxin A contamination in blood plasma samples from two areas of Buenos Aires province.

Ochratoxin A (ng ml ⁻¹)	General Rodriguez		Mar del Plata	
	Male	Female	Male	Female
n.d.	71	18	51	21
LOD to <LOQ	0	0	1	0
LOQ to 0.2	16	9	39	17
>0.2 to 0.4	25	3	19	7
>0.4 to 0.6	17	5	11	3
>0.6 to 0.8	14	2	5	3
>0.8 to 1.0	5	0	4	0
>1.0 to 1.2	2	0	2	1
>1.2 to 1.4	8	2	2	2
>1.4 to 1.6	5	1	0	0
>1.6 to 1.8	1	0	0	0
>1.8 to 2.0	1	0	1	0
>2.0 to 2.2	2	0	0	0
>2.2 to 2.4	0	0	1	0
>2.4 to 2.6	0	0	1	0
>2.6 to 2.8	3	1	1	0
>2.8 to 3.0	0	0	1	1
>3.0 to 3.4	3	0	2	0
>3.4 to 3.8	3	0	0	0
>3.8 to 4.2	0	0	0	0
>4.2 to 4.6	3	1	0	0
>4.6 to 5.0	0	0	0	0
>5.0 to 6.0	3	0	0	0
>6.0 to 7.0	2	0	0	0
>7.0 to 8.0	0	0	0	1
>8.0 to 9.0	2	1	1	0
>9.0 to 10.0	3	0	0	0
>10.0 to 20.0	1	0	0	0
>20.0 to 30.0	1	0	0	0
>30.0 to 40.0	1	0	0	0
>40.0 to 50.0	0	0	0	1
>50.0 to 60.0	0	0	0	0
>60.0 to 70.0	0	0	0	0
>70.0 to 80.0	1	0	0	0

n.d., not detected. Limit of detection (LOD) = 0.012 ng ml⁻¹; limit of quantitation (LOQ) = 0.019 ng ml⁻¹.

Table III. Ochratoxin A (OTA) plasma concentrations (ng ml⁻¹) of the analysed population for the different age groups and comparison between the two areas of Buenos Aires province.

Population	Mar del Plata			General Rodriguez			Mean differences	<i>p</i>	
	Mean*	SD**	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>			
All		0.1537	0.1700	199	0.4319	0.4919	236	-0.2783	<0.01
Age group	21-30	0.0940	0.1130	47	0.4640	0.5251	70	-0.3701	<0.01
	31-40	0.2506	0.2735	53	0.4231	0.4846	71	-0.1725	<0.05
	41-50	0.1627	0.1700	58	0.2675	0.3054	56	-0.1048	<0.05
	51-60	0.1201	0.1311	24	1.7420	2.6191	19	-1.6219	<0.05

*Winsorized mean.

**Winsorized standard deviation.

Because of the presence of several samples with high OTA concentration, the Winsorized measures and the *t*-test based on them were used to compare the populations. Significant differences were found between both populations (Table III).

To study in detail the differences, four age groups were compared. Table III includes the results corresponding to these comparisons. Significant differences between both cities were found in all age groups.

Considering the comparison of OTA levels between women and men in these areas of Buenos Aires province, it can be observed in Table IV that only in General Rodriguez was the difference significant.

Preliminary estimated dietary intakes of OTA were made by using the Klassen formula (Breitholtz et al. 1991; Thuvander et al. 2004) using the factor 1.97 (or 1.34) and concentration values in both areas. With the alpha Winsorized mean (Table III), the dietary intake of OTA was calculated 0.30 (0.21) and 0.84 (0.58) ng kg⁻¹ body weight day⁻¹ in Mar del Plata and General Rodriguez, respectively.

To compare the dietary intake estimation in these areas of Argentina with others it was necessary to recalculate considering the OTA median values. The results were 0.21 (0.15) and 0.47 (0.32) ng kg⁻¹ body weight day⁻¹ in Mar del Plata and General Rodriguez, respectively; and Mar del Plata had values smaller than all the countries present in SCOOP studies, where the General Rodriguez estimation is similar to the intake of Germany (Miraglia and Brera, 2002). The dietary intake estimation in these areas per week, calculated with the 95th percentile of OTA in plasma using the Klassen equations, was 32.0 (22.0) and 84.2 (57.3) ng kg⁻¹ body weight week⁻¹ in Mar del Plata and General Rodriguez, respectively; that is, below the provisional tolerable weekly intake (PTWI) of 100 ng kg⁻¹ body weight week⁻¹ established in 2001 by JECFA. In any case, it is necessary

Table IV. Ochratoxin A (OTA) plasma Winsorized mean concentrations (ng ml⁻¹): Comparison between males and females in two areas of the Buenos Aires province.

Population	Females			Males			Mean differences	<i>p</i>
	Mean*	SD**	<i>n</i>	Mean	SD	<i>n</i>		
General Rodriguez	0.2059	0.2260	43	0.4752	0.5217	193	0.2693	<0.001
Mar del Plata	0.1524	0.1595	57	0.1644	0.1707	142	-0.1198	0.64

*Winsorized mean.

**Winsorized standard deviation.

to take into consideration that some high levels of OTA in plasma could exceed the suggested PTWI.

Conclusions

Argentinean people, represented in this study as the two areas of the Buenos Aires region, are exposed to OTA with values smaller or similar to those found in various European countries. Considering that the weight, age and race of both populations is very similar, the differences found in the presence of OTA in plasma could be attributed to various factors; the fact that the samples were obtained in different periods: February 2004 from Mar del Plata and April–July 2005 from General Rodriguez. It is known that fluctuations exist, not only seasonal fluctuations, but also regional ones as well as those due to individuals. Another factor could be that the population, and therefore the donors, at the General Rodriguez Hospital presents a lower socio-economical level than those in Mar del Plata Hospital. This difference could imply the intake of lower quality foods (Goodwin et al. 2006) and consequently containing a higher level of OTA contamination.

Acknowledgements

The authors acknowledge the technical assistance provided by Ms Gabriela Cano and Daniela Taglieri, as well as the financial support from the Comisión de Investigaciones Científicas of the Province of Buenos Aires, Universidad Nacional de Luján, Universidad de Buenos Aires, CONICET, BID 1201/OC-AR PICTOR 2002-00012, Argentina, and the European Union (Contract No. ICA4-CT-2002-10043). Special thanks are also directed to Mr Simon Bevis (R-Biopharm Rhone Ltd) for the support including the Ochraprep[®] columns.

References

Breitholtz A, Olsen M, Dahlbäck Å, Hult K. 1991. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Additives and Contaminants* 8:183–192.

European Commission. 1998. Directive 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Commission* L201:93–101.

European Commission. 2002. Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Commission* L221:8–36.

Fink-Gremmels J. 2005. Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in food: Recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June–1 July 2005. *Food Additives and Contaminants* 22(Suppl. 1):1–5.

García Perez A. 2002. Métodos avanzados de estadística avanzada. Madrid: UNED: Universidad Nacional de Educación a Distancia. pp 32–36, 68–70.

Gilbert J, Brereton P, MacDonald S. 2001. Assessment of dietary exposure to Ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives and Contaminants* 18: 1088–1093.

Goodwin DK, Knol LK, Eddy JM, Fitzhugh EC, Kendrick O, Donohue RE. 2006. Sociodemographic correlates of overall quality of dietary intake of US adolescents. *Nutrition Research* 26:105–110.

Grosso F, Saïd S, Mabrouk I, Fremy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S. 2003. New data on the occurrence of Ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal disease in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 41:1133–1140.

Hampel FR. 1968. Contribution to the theory of robust estimation. Dissertation, Department of Statistics, University of California, No. 119.

Huber PJ. 1964. Robust estimation of a location parameter. *Anales de Estadística Matemática* 35:73–101.

Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. Ochratoxin A. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, prepared by the 56th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series No. 47. Geneva: World Health Organization. pp 281–387.

Miraglia M, Brera C. 2002. Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. Report of SCOOP task 3.2.7, January. Available: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7en.pdf>

Pacin A, Resnik S, Vega M, Saelzer R, Ciancio Bovier E, Ríos G, Martínez N. 2005. Occurrence of ochratoxin A in wines in the Argentinean and Chilean markets. *ARKIVOC* 12:214–223.

Rosa CAR, Magnoli CE, Fraga ME, Dalcero AM, Santana DMN. 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 21:358–364.

- SAS Institute. 1999. SAS OnlineDoc[®], Version 8. Cary, NC: SAS Institute Inc. Available: <http://www.csc.fi/csahelp/sovellukset/stat/sas/sasdoc/sashtml/insight/chap38/sect17.htm>
- Scott PM. 2005. Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 22(Suppl. 1):99–107.
- Scott PM, Kanhere SR, Lau BP, Lewis DA, Hayward S, Ryan JJ, Kuiper-Goodman T. 1998. Survey of Canadian human blood plasma for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminant* 15:555–562.
- Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. 2001. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49:2733–2740.
- Thuvander A, Möller T, Barbieri HE, Jansson A, Salomonsson A-C, Olsen M. 2001. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Additives and Contaminants* 18:696–706.
- Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Tressou J, Leblanc J-Ch, Feinberg M, Bertail P. 2004. Statistical methodology to evaluate food exposure to a contaminant and influence of sanitary limits: Application to Ochratoxin A. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 40:252–263.
- Walker R, Larsen JC. 2005. Ochratoxin A: Previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants* 22(Suppl. 1):6–9.

Fumonisin B₁, B₂ y B₃ en copos de maíz comercializados en Mar del Plata, Argentina

MOTTA, Estela.¹, PACIN Ana^{2,3}, CANO, Gabriela^{2,3} y RESNIK, Silvia L.^{3,4}
¹Departamento de Química, UNMP, Argentina. ²Centro de Investigación en Micotoxinas, UNLU, Luján., ³ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC), Argentina, ⁴Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina. Correspondencia: Centro de Investigación en Micotoxinas, UNLU, CC221, Luján 6700 e-mail: drapacin@s6.coopenet.com.ar

Introducción:

Las fumonisinas son micotoxinas producidas principalmente por el *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*, siendo el maíz hasta el momento, el sustrato en que se ha detectado con mayor frecuencia la colonización por estos hongos y la contaminación por fumonisinas. Los alimentos destinados a consumo humano, elaborados con este cereal, son susceptibles de contaminación y por esto constituyen un potencial riesgo de intoxicación. Los niveles de fumonisinas hallados en los alimentos procesados son menores a los detectados en el maíz. Los copos de maíz presentan valores menores a los detectados en harina de maíz y "grits". (Solovey y col., 1999); este dato es coincidente con lo que se observa en otras micotoxinas y para otros sustratos (Neira y col, 1997; Pacin y col., 1998). La exposición a fumonisinas a través de la ingesta de alimentos manufacturados con maíz es frecuente en todo el mundo, por esta razón JECFA sugiere una ingesta máxima admisible diaria para fumonisinas de 2 µg/kg peso corporal (JECFA, 2001).

Objetivos:

Los objetivos de este trabajo fueron estimar el nivel de fumonisinas en copos de maíz comercializados en la ciudad de Mar del Plata durante el año 2001, conjuntamente con la evaluación de dos metodologías de extracción para la determinación de estas toxinas, y calcular la contribución a la exposición de estas micotoxinas debido al consumo de copos de maíz.

Materiales:

Se muestrearon al azar establecimientos de venta de productos dietéticos y supermercados de la ciudad de Mar del Plata entre mayo y septiembre del 2001. Las muestras se conformaron mezclando el contenido de envases para obtener 500 gramos como mínimo de cada producto. Se molieron las muestras en un molinillo de café hasta lograr un tamaño de partícula que permitiera un buen contacto con los solventes de extracción (20 mesh) y una submuestra de 100 gramos se guardó hasta el momento de análisis en "freezer". Se analizaron por HPLC (Scott y col., 1996) 22 muestras de copos de maíz de diferentes partidas o marcas.



Metodología para Fumonisin B₁, B₂ y B₃ en copos de maíz: HPLC

Extracción y limpieza con columna de intercambio Aniónico

Método AOAC 995.15
First Action 1995

- Extracción**
- Muestra (50 g) +100 ml Metanol:agua 3:1.
 - Licuar 5 minutos.
 - Filtrar. Ajustar pH=5.8-6.5(HONa 1 m, 2 o 3 gotas).
 - Centrifugar 10 minutos (500 G).
- Clean up**
- 10 ml del filtrado: columna de Extracción SAX, capacidad 10 ml, prelavada con 5 ml metanol y 5 ml metanol:agua 3:1. Flujo <= 2 ml/min.
 - Lavar: 5 ml metanol: agua (3:1), 5 ml de Metanol.
 - Eluir: 10ml ácido acético:metanol(1:99)
 - Evaporar a 60 °C bajo vacío.

Extracción y limpieza con columna inmunológica

Columnas Vicam Watertown, MA.

- Extracción**
- Muestra (20g)+ 100ml CH₃CN:CH₃OH:H₂O (25+25+50).
 - 2 extracciones de 20 minutos (shaker).
 - Centrifugar 10 minutos (500 G)
 - Filtrar
- Clean up**
- Transferir 10 ml del filtrado y diluir 1:4 en PBS.
 - Filtrar con fibra de vidrio(WGF/A 9mm)
 - 10 ml de extracto: columna Vicam.
 - Elución toxinas con 1.5 ml CH₃OH.

Detección y cuantificación

Derivatización: Redisolver el residuo en 1000 µl de H₂O:CH₃CN (1:1) 25 µl + 225 µl de OPA. Inyectar 10 µl en LC antes de 1 min.

Detección y cuantificación: Excitación: 335 nm. Emisión: 440 nm.

Fase Móvil: metanol: NaH₂PO₄ (0,1 M), 77:23, pH=3.3(ác. Ortofosfórico)
 Columna: fase reversa C-18, 5 µm, 15cm x 4.6 mm di, 23° C.
 Velocidad de flujo: 1 ml/min.
 Volumen de inyección: 10 µl.
 Tiempos de retención: FB₁: 6 a 8 min; FB₂: 18 a 23 min y FB₃: 14 a 16 min.

Resultados:

En las tablas 1 y 2 se observa las concentraciones de fumonisinas B₁, B₂ y B₃ (µg/kg) en copos de maíz cuando la limpieza se realizó a través de columnas de intercambio aniónico y columnas de inmunofinidad.

Los porcentajes de contaminación en el primer caso fueron para B₁ 18,2 %, B₂ 9,1 % y B₃ 4,5 %, con un máximo de fumonisinas totales de 183 µg/kg(tabla 1). Cuando se utilizaron las columnas de inmunofinidad se detectó 45.5 % de muestras positivas, pero solamente FB₁(tabla 2).

La tabla 3 muestra la estimación de la exposición a fumonisinas, de diferentes grupos etáreos, en dos encuestas llevadas a cabo en nuestro país (Gallo y col,1992; Pacin y col, 1998) y considerando el máximo valor de contaminación hallado en los copos de maíz: 183 µg/kg.

Tabla 1

Fumonisin B₁, B₂, B₃ (µg/kg) en copos de maíz
Columnas de intercambio aniónico.

MUESTRA	FB ₁	FB ₂	FB ₃
1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND
12	155	26	2
13	ND	ND	ND
14	71	18	ND
15	ND	ND	ND
16	21	ND	ND
17	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND
21	18	ND	ND
22	ND	ND	ND

Tabla 2

Fumonisin B₁, B₂, B₃ (µg/kg) en copos de maíz
Columnas de inmunofinidad

MUESTRA	FB ₁	FB ₂	FB ₃
1	2	ND	ND
2	< LOQ	ND	ND
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND
5	7	ND	ND
6	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND
8	46	ND	ND
9	ND	ND	ND
10	20	ND	ND
11	55	ND	ND
12	74	ND	ND
13	ND	ND	ND
14	35	ND	ND
15	ND	ND	ND
16	27	ND	ND
17	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND
19	6	ND	ND
20	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND
22	ND	ND	ND

Tabla 3

Estimación de la exposición a fumonisinas a través de la ingesta de copos de maíz

Grupo (peso en kg)	Ingesta de copos de maíz (gramos)	Exposición a fumonisinas	
		µg/kg	Porcentaje p.c. día
Encuesta (promedio)			
Pacin y col., 1998			
F1 (58,9)	21,6	0,06709	3,35
F2 (62,5)	2,2	0,00644	0,32
M1 (62,5)	2,8	0,00729	0,36
M2 (70,3)	2,8	0,00693	0,35
Encuesta (consumidores)			
Gallo y col., 1992			
F1 (14)	0	0,00000	0,00
F2 (24)	40	0,29270	14,64
F3 (40)	20	0,09147	4,57
F4 (56)	60	0,19601	9,80
F5 (58)	20	0,06308	3,15
F6 (60)	0	0,00000	0,00
M1 (14)	60	0,78403	39,20
M2 (25)	0	0,00000	0,00
M3 (40)	80	0,36588	18,29
M4 (61)	50	0,14995	7,50
M5 (78)	10	0,02345	1,17
M6 (80)	90	0,20581	10,29

F: femenino
M: masculino

Conclusiones:

Las dos metodologías de extracción mostraron bajas contaminaciones en copos de maíz, sin embargo se observa una diferencia en los valores de contaminación que esta relacionado con estos bajos niveles detectados.

Con respecto a la exposición y teniendo en cuenta los datos de encuestas llevadas a cabo en nuestro país, la ingesta máxima admisible diaria (2 µg por kilogramo de peso corporal por día) sugerida por el JECFA y la máxima contaminación de fumonisinas totales detectada en este trabajo(183 µg/kg), el aporte a la ingesta de copos de maíz contaminados, oscilaría entre 0% a 39.2% según el grupo etáreo considerado. (Tabla 3).

Referencias

Gallo, Alicia; Bordignon, Fernando; Pacin, Ana; Barbieri Teresa and Resnik Silvia. Evaluation of food intake by means of 24 hour dietary recall in a town of the Province of Buenos Aires, Argentina, outline of data base on food consumption. Ecology of Food and Nutrition, 28:299-317, 1992.

JECFA Mycotoxins. Summary and Conclusions of the Fifty-six meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 6- 15 February 2001. <http://www.fao.org/VAICENT/FAOINFO/EC/ONOMIC/ESN/iecfajecfa56.pdf>

Neira M.S., Pacin A., Martinez E.J., Molto G. and Resnik S.L. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. International Journal of Food Microbiology, 37:21-25, 1997.

Pacin, A.; Martinez, E.; Portela, M.L.; y Neira M.S. Consumo de alimentos en la

población de la Universidad Nacional de Luján. Aporte energético y proteico. La Alimentación Latinoamericana 221:28-36, 1998

Pacin A., Resnik S.L., Neira M.S. and Molto G.A. Natural occurrence of deoxynivalenol in wheat, wheat flour and breadmaking products in Argentina. Food. Add. Contam. 14:327-331, 1997.

Scott P.M: Natural toxins. In: Cunniff P. (ed), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International, 16th edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Chapter 49, pp. 49 Supp. march, 1996

Solovey M.M.S., Somoza C., Cano G., Pacin A. and Resnik S. A survey of Fusarium fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone and aflatoxins contamination in corn-based food products in Argentina. Food Additives and Contaminants, 16 (8): 325-330, 1999

Effect of *in vitro* digestion on fumonisin B₁ in corn flakes

E. L. Motta¹, P. M. Scott

Bureau of Chemical Safety, Health Canada, Address Locator 2203D, Ottawa, Ontario, K1A 0K9, Canada

¹Present address: Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Mar del Plata, (7600) Funes 3350, Mar del Plata, Argentina

Abstract

Low levels of fumonisins have been found frequently in corn based breakfast cereals and can occur bound to protein and other matrix components. *In vitro* digestion of two samples of corn flakes was carried out under “fed conditions.” Fumonisins were measured as o-phthalaldehyde/mercaptoethanol derivatives by LC-fluorescence. One sample of corn flakes (FN12) had high concentrations of fumonisin B₁ (FB₁) (average 125 ng/g) and total bound FB₁ (TB FB₁) (average 92 ng/g) and the other (FN11) had a low level of free FB₁ (average 29 ng/g) and no detectable TB FB₁. After incubation of the samples with gastrointestinal tract solutions simulating saliva plus stomach and duodenal juices, chyme was analysed for FB₁, hydrolyzed FB₁ (HFB₁) and partially hydrolyzed fumonisin B₁ (PHFB₁). The bioaccessibility (percentage of FB₁ released from corn flakes into chyme) was 38-78% for incurred FB₁ in FN12, 8-54% for incurred plus spiked FB₁ in FN12, and 19-66% for incurred plus spiked FB₁ in FN11. HFB₁ and PHFB₁ were not detected. If free FB₁ was first extracted from sample FN12, no FB₁ was detected in the chyme, indicating no contribution from TB FB₁. Concentrations were corrected for method recovery of FB₁ or, for bound FB₁, partial method recovery of HFB₁.

Keywords: fumonisin B₁, bound fumonisin B₁, corn flakes, *in vitro* digestion, bioaccessibility

Introduction

The fumonisins are a group of mycotoxins produced mainly by *Fusarium verticillioides* (formerly *F. moniliforme*), a widespread fungal pathogen of corn (1, 2, 3). Fumonisin B₁ (FB₁) is carcinogenic to rats and mice and causes several mycotoxicoses in livestock, including leukoencephalomalacia in horses. The fumonisins are suspected to be a possible determinant of human esophageal cancer in some regions of South Africa and China (4, 5) as well as of infant neural tube defects in South Texas in the United States (6, 7, 8).

Heat processing (above 150-175 °C) reduces the concentration of fumonisin in heat processed food products (9), including after extrusion or nixtamalization (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). This reduction could be due to thermal decomposition (20) or binding of fumonisin to food matrix components as was

demonstrated by Shier *et al.* (21), who found that 46% of the radioactivity originating from fumonisin B₁ (FB₁) was extracted by sodium dodecyl sulphate (SDS), showing that this percentage was bound to protein. Kim *et al.* (22) showed that protein bound fumonisin B₁ (PB FB₁) is present in corn based breakfast cereals. Total bound fumonisin (TB FB₁) was analyzed using alkaline hydrolysis of corn based food; an average of up to four times more FB₁ in bound form in corn breakfast cereals and alkali-processed foods was found (23, 24). Model experiments with methyl- α -D-glucopyranoside (starch model) and protected amino acids (protein model) indicated the covalent binding of FB₁ via the propane 1,2,3-tricarboxylic acid (TCA) side chains (Figure 1) (25, 26).

FB₁ is poorly absorbed after administration to laboratory animals by gavage or injection (27, 28, 29, 30, 31, 32). The possibility that bound fumonisins could release FB₁ or hydrolyzed FB₁ (HFB₁) in the gastrointestinal tract is of great concern with respect to food safety as this situation could explain in part diseases related with the consumption of FB₁ in spite of the very low absorption (33). Models of *in vitro* digestion have been applied to study the

Presented at the XIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istanbul, Turkey, 21-25 May, 2007

Correspondence: Estela L. Motta, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Mar del Plata, (7600) Funes 3350, Mar del Plata, Argentina (emotta@mdp.edu.ar)

Received 16 April 2007, accepted 13 Aug 2007

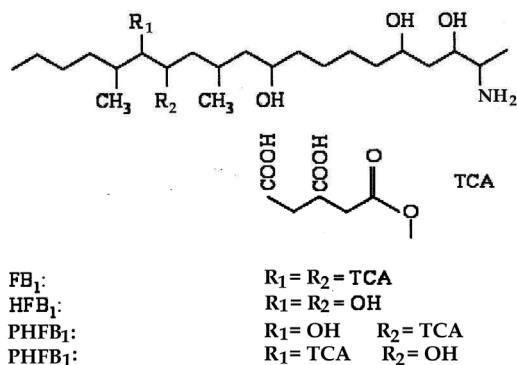


Figure 1. Chemical structures of FB_1 , PHFB_1 and HFB_1

bioaccessibility (percentage of a compound released from food or soil into chyme) of certain contaminants, including mycotoxins (34, 35). The objectives of the present study were to determine bioaccessibility of FB_1 and whether FB_1 , partially hydrolyzed FB_1 (PHFB_1) and/or HFB_1 is released from TB FB_1 in corn flakes, by applying an *in vitro* digestion model (35).

Materials and Methods

Chemicals

Methanol and acetonitrile were HPLC grade (OmniSolv® EMD). All reagents were of analytical grade. α -Amylase (A 4551) from *Bacillus licheniformis*, 500-1500 units/mg protein; pepsin (P 7000) from porcine gastric mucosa, 800-2,500 units/mg protein; pancreatin (P 8096) from porcine pancreas, meets USP specifications; lipase (L 1754) from *Candida rugosa*, 1,410 units/mg solid; mucin (M 3895) type I-S; bile bovine (B 3883), bovine serum albumin (A 0281), *o*-phthalaldehyde (P 0657) (OPA) and 2-mercaptoethanol (M6250) (MCE) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Analytical Standards

FB_1 (F-1147) was from Sigma-Aldrich; HFB_1 was a gift from R.M. Eppley, US Food and Drug administration (5100 Paint Branch Parkway, College Park, MD, 20740, USA). Stock solutions were prepared by dissolving 1 mg of the reference compound in 1 ml of acetonitrile-water (3:1, v/v) and making further dilutions as required.

PHFB_1 was prepared by hydrolysis of 1 ml of FB_1 solution (10 ng/ μl) with 1 ml of 2 M KOH at room temperature for 30 min and acidified

with 5 M HCl to pH 4.5. Two ml of this sample was cleaned up on a C-18 solid phase extraction (SPE) column, preconditioned with 3 ml of methanol and 3 ml of water, washed with 3 ml of water and eluted with 6 ml of methanol and 2 ml of methanol-8% aqueous acetic acid (75:25, v/v). This solution also contained FB_1 and HFB_1 (36, 37, 38, 39).

Reagents

OPA reagent was a solution of 40 mg of OPA in 1 ml of methanol diluted with 5 ml of 0.1 M sodium tetraborate plus 50 μl MCE; it could be stored in the dark up to 1 week. Phosphate buffered saline (PBS) contained 0.2 g potassium chloride; 0.2 g potassium dihydrogen phosphate; 1.16 g disodium hydrogen phosphate; 8 g sodium chloride and 1 g sodium azide in 1 litre distilled water, adjusted to pH 7.0 with 1 M HCl.

Samples

Two samples of corn flakes (FN11 and FN12) were purchased at the retail level in Ottawa, Ontario. Approximately 300 g of each sample were collected and ground using a commercial blender (Osterizer, Sunbeam Inc. Boca Raton, FL) for 3 min and then kept in a freezer until analysis.

Extraction of corn flakes and cleanup

For the determination or analysis of free FB_1 and PHFB_1 , 10 g ground corn flakes were extracted twice with acetonitrile-methanol-water (25:25:50, v/v/v) for 30 min in a horizontal shaker (Eberbach Corporation, model 6010) then centrifuged for 10 min at 2200 g (Hettich Rotina model 35). Forty ml of PBS were added to 10 ml of the combined extracts and 10 ml were passed through a FumonitestTM immunoaffinity column (IAC) (Vicom, Watertown, MA, USA); the column was washed with 5 ml PBS then fumonisins were eluted with 3.5 ml methanol. Eluates were evaporated under a gentle stream of nitrogen at about 55 °C in a heating block and the residue was dissolved in 300 μl of acetonitrile-water (3:1, v/v).

For the determination of HFB_1 , 5 ml of the combined extracts were passed through a Varian HF C18 (3 cc) SPE column, previously conditioned with 3 ml of water and 3 ml of methanol. The column was washed with 3 ml of water then 3 ml of methanol-water (25:75, v/v). Elution of HFB_1 was with 6 ml of meth-

anol and 3 ml methanol-8% aqueous acetic acid (75:25, v/v).

Determination of bound fumonisins

PB FB₁ and TB FB₁ were determined by the method of Kim *et al.* (22) and Park *et al.* (23), with some modifications, as follows.

For PB FB₁, 10 g corn flakes were extracted twice with acetonitrile-methanol-water (25:25:50, v/v/v) and twice with water (the extracts were discarded); the remaining solid was extracted with 25 ml of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 30 min at room temperature. Five ml of the supernatant were mixed with 5 ml 2 M KOH and 2 ml 1% methylene blue in water (w/v). This mixture was washed with 30 ml hexane-*iso*-amyl alcohol (80:20, v/v) three times and the aqueous phase was hydrolyzed at 60 °C for 1 h in a shaking water bath (Julabo model SW 22) at 190 rpm. After cooling, 3 ml of the supernatant was cleaned up on an OASIS[®] HLB 3 cc (60 mg) extraction column (Waters, Milford, MA, USA), preconditioned with 3 ml of methanol and 3 ml water; following the supernatant addition the column was washed with 3 ml water and 3 ml of methanol: water (50:50, v/v) and eluted with 2.5 ml of methanol-8% aqueous acetic acid (75:25, v/v). This eluate was evaporated to dryness under nitrogen and reconstituted in acetonitrile-water (75:25, v/v).

For TB FB₁, 10 g corn flakes were extracted twice with acetonitrile-methanol-water (25:25:50, v/v/v) and twice with water. The remaining solid was hydrolyzed with 20 ml 4 M KOH at 60 °C for 1 h at a shaking speed of 190 rpm, and the mixture cooled. The hydrolysate was extracted three times with 60 ml 0.01 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-methanol (7:3, v/v) for 30 min then centrifuged at 11,200g in a Sorvall model SS-4 centrifuge. Twelve ml of the combined extracts were added to an OASIS[®] HLB 3 cc (60 mg) column, preconditioned with 3 ml of methanol and 3 ml methanol-water (20:80, v/v). The column was washed with 3 ml methanol-water (20:80, v/v), 3 ml methanol-water (50:50, v/v) and 3 ml methanol-water (67:33, v/v). For elution of HFB₁, 1 ml of methanol-water (75:25, v/v) and 2 ml methanol-8% aqueous acetic acid (75:25, v/v) were added to the column. Solvents were passed through the column by gravity. This eluate was evaporated to dryness under nitrogen and reconstituted in acetonitrile-water (75:25, v/v).

Artificial digestion

The digestion process in the human gastrointestinal tract was simulated by adding artificial digestive fluids to the corn flakes at pH, temperature and residence time periods as described by Versantvoort *et al.* (35). Artificial saliva, gastric juice, duodenal juice and bile juice consisted of mixtures of inorganic salts with organic components (all juices included urea).

The artificial saliva was prepared by mixing saline components with organic components supplemented with α -amylase, uric acid and mucin; the inorganic and organic solutions of the gastric juice were mixed with pepsin, mucin and bovine serum albumin (BSA); the mixture of inorganic and organic components of duodenal juice were supplemented with pancreatin, lipase and BSA; the bile juice consisted of a mixture of inorganic and organic solutions with BSA, CaCl₂·2 H₂O and bile.

First, 6 ml of saliva pH 6.8 were incubated with 4.5 g ground corn flakes for 5 min in a horizontal water bath at 37 °C at 190 rpm. Then, 12 ml of gastric juice were added to the mixture, the pH adjusted to pH 2-2.5 with 1 M HCl and incubated in a shaking water bath at 37 °C. After two hours of incubation, 12 ml of duodenal juice and 6 ml of bile were added to the previous mixture and the pH adjusted to 6.5-7 with 1 M sodium bicarbonate before a further 2 h incubation. The chyme was separated by centrifugation 10 min at 2200 g (Hettich Rotina model 35) and kept in the refrigerator for analysis the following day.

Analysis of chyme

Ten ml of chyme were mixed with 10 ml methanol, shaken 15 min and then centrifuged 10 min at 2200 g (Hettich Rotina model 35). For the cleanup of free FB₁ and PHFB₁, 10 ml of a mixture of 10 ml PBS and 10 ml extract were applied to a Fumonitest[™] IAC (Vicam); the column was washed with 7 ml PBS and then eluted with 3.5 ml methanol. For the determination of HFB₁, 8 ml of the extract were mixed with 12 ml 0.05 M NaH₂PO₄, the pH was adjusted to 3.6 with 1 M HCl and 10 ml of the mixture was added to an OASIS[™] HLB extraction column (Waters, Milford, MA, USA), previously conditioned with 3 ml of methanol and 3 ml of methanol-water (20:80, v/v) OASIS[®] column. The column was washed with 3 ml methanol-water (20:80, v/v) then 3 ml of methanol-water (50:50, v/v). Elution was

with 3 ml of methanol-water (70:30, v/v). The evaporated extracts were dissolved in 300 μ l of acetonitrile-water (3:1, v/v).

Liquid chromatography (LC)

Analyses of the samples were performed by LC using an Agilent 1100 series system equipped with a degasser (G 1322A), auto-sampler (G1313A), quaternary pump (G1311 A), fluorescence detector (G1321A) with excitation at 335 nm and emission cut-off at 440 nm, a thermostated column compartment (G13116A) and HP Kayak XM600 workstation. The autosampler was programmed to mix 5 μ l OPA reagent, 5 μ l sample and 5 μ l OPA reagent in the needle 10 times and inject 10 μ l of the mixture after 0.5 min incubation (40). Separation was carried out on an Inertsil 5 μ ODS-2 150 \AA column 150x4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA) with Supelguard LC-18 guard column (Supelco, Bellefonte, PA).

The mobile phase was usually (A) methanol and (B) methanol-0.05 M NaH_2PO_4 (65:35, v/v) acidified to apparent pH 6.0 with *o*-phosphoric acid; the gradient was 100 % B (0 min) to 20 % A and 80 % B (40 min). The flow rate was 0.8 ml min^{-1} (39, 41). For the separation of FB_1 from corn flakes the mobile phase was methanol-0.05 M sodium dihydrogen phosphate (70:30, v/v) acidified to apparent pH 3.3 with *o*-phosphoric acid and run isocratically (retention time 14.4 to 15.0 min). The flow rate was 0.8 ml min^{-1} . Measurements were made by peak area. The detection limits obtained by this derivatization at a signal-to-

noise ratio of 3:1 were 5 ng/g for HFB_1 and 15 ng/g for TB FB_1 in corn flakes.

Results and Discussion

Different studies of recovery were done by spiking corn flakes extract or chyme with FB_1 , HFB_1 and PHFB_1 (Table 1). The recoveries of PHFB_1 from corn flakes and chyme were determined by spiking these samples with known volumes of the hydrolyzed solution that contained a measured area of both isomers of PHFB_1 .

Both samples of corn flakes were analyzed for free FB_1 , PHFB_1 , free HFB_1 , PB FB_1 and TB FB_1 . One sample (FN12) had a high concentration of free FB_1 (average 125 ng/g) and TB FB_1 (average 92 ng/g) and the other (FN11) had a low level of free FB_1 (average 29 ng/g) and no detectable TB FB_1 (Table 2).

After IAC cleanup of the chyme, a major peak was observed using the mobile phase pH 6.0 at a retention time close to or at the retention time of FB_1 (Figures 2-5).

The average concentration of FB_1 released in chyme was in most cases less than half the initial concentration present in corn flakes (incurred only or incurred plus spiked). HFB_1 and PHFB_1 were not detectable in chyme. When the corn flakes (FN12) were extracted with solvent to remove free FB_1 before the *in vitro* digestion (n=4), FB_1 was not detectable in the chyme, indicating no contribution from TB FB_1 (Table 3).

Table 1. Recoveries of FB_1 , PHFB_1 and HFB_1 from corn flakes extract; partial recoveries of PB FB_1 and TB FB_1 (measured as HFB_1 after spiking HFB_1 or FB_1 before the hydrolysis step); and of FB_1 , HFB_1 and PHFB_1 from chyme

Spike	Level of fortification (ng/g)	Recovery (%) \pm SD
FB_1 (before IAC)	200	86.6 \pm 10.9 n=2
PHFB_1 (before IAC)	?	58.2 \pm 18.1 n=3
HFB_1 (before C_{18} column)	40	122 \pm 0 n=2
PB FB_1 (HFB_1 added before hydrolysis step)	100	71.3 \pm 13.0 n=2
TB FB_1 (FB_1 added before hydrolysis step)	120	68.5 \pm 22.7 n=8
FB_1 added to chyme	226	86.0 \pm 5.6 n=2
PHFB_1 added to chyme	?	12 % n=2
HFB_1 added to chyme	444	86.0 \pm 10.6 n=3

Table 2. Free FB₁, PB FB₁ and TB FB₁ in corn flakes

Sample	Incurred free FB ₁ (ng/g)		HFB ₁	PHFB ₁	PB FB ₁ ⁽¹⁾ (ng/g)	TB FB ₁ ⁽¹⁾ (ng/g)	
	Average	range				Average	range
FN11	29 (n=2)	26-32	nd ⁽²⁾	nd	13 (n=1)	23 (n=3)	nd ⁽³⁾ -24
FN12	125 (n=3)	92-158	nd	nd	25 (n=1)	92 (n=3)	57-124

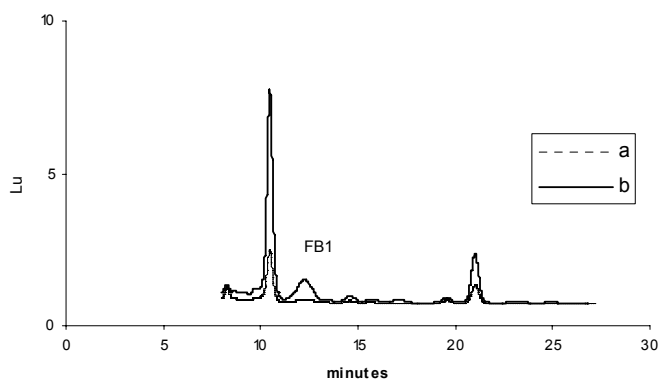
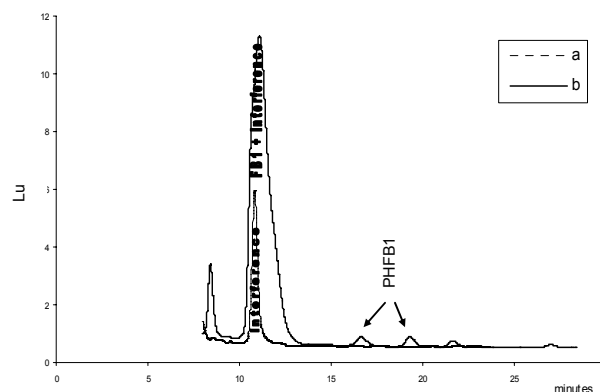
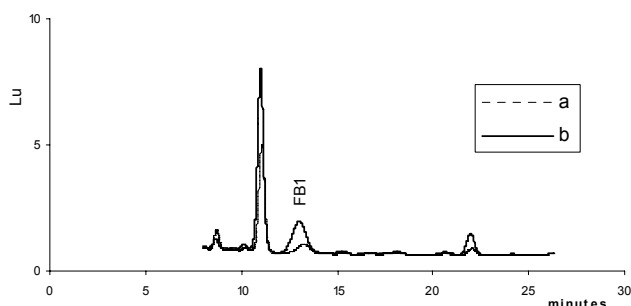
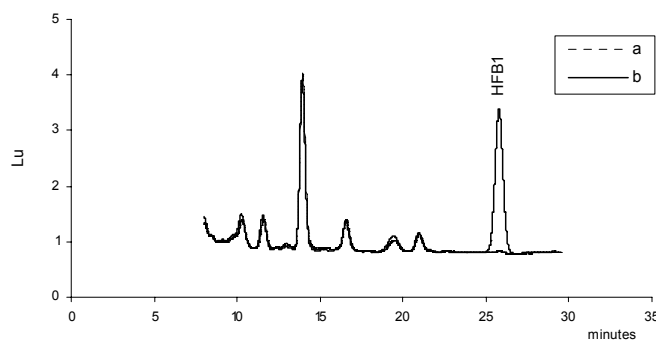
(1) Levels reported as FB₁ equivalents

(2) Not detected (below the detection limit of 5 ng/g)

(3) Not detected (below the detection limit of 15 ng/g)

Table 3. Release of free FB₁ from corn flakes into chyme after *in vitro* digestion, expressed as the amount released into chyme and bioaccessibility (%)

Sample	FB ₁ (ng/g)				FB ₁ released in chyme (ng/g)*		Bioaccessibility (%)	
	Incurred	Mean Spike	Total	Total range	Mean	Range	Mean	Range
FN11	29	196	225	167-363	102 n=5	32-239	42 n=5	19-66
FN12	125	0	125	92-158	67±20 n=7	47-98	53±16 n=7	38-78
FN12	125	199	324	221-420	103 n=7	18-226	32 n=7	8-54

**Figure 2.** LC chromatograms after IAC cleanup of (a) extract of chyme obtained by digestion of unspiked corn flakes (FN11); (b) FB₁ in chyme recovered from the same corn flakes spiked with 138 ng/g of FB₁ before digestion**Figure 4.** LC chromatograms after IAC cleanup of (a) extract of unspiked chyme obtained by digestion of corn flakes FN11; (b) PHFB₁ recovered from the same chyme spiked with PHFB₁**Figure 3.** LC chromatograms after IAC cleanup of (a) FB₁ from unspiked chyme obtained by digestion of corn flakes FN12; (b) FB₁ recovered from the same chyme spiked with 290 ng/g of FB₁**Figure 5.** LC chromatograms after OASIS® cleanup of (a) extract of unspiked chyme obtained by digestion of corn flakes FN12; (b) HFB₁ recovered from the same chyme spiked with 444 ng/g of HFB₁

The low bioaccessibility obtained for FB₁ plus the observation that TB FB₁ was not hydrolyzed to FB₁ under the conditions of the *in vitro* digestion model are in agreement with literature results *in vivo* which showed very low bioavailability of FB₁ in monkeys and rats when administered by gavage or injection (27, 28, 29, 30, 31, 32). That FB₁ might cause agriculturally significant animal diseases, in spite of the very low bioavailability, was called the “fumonisin paradox” (33). More experiments should be done to see if TB FB₁ in corn flakes could be released as TB FB₁ in chyme, transported across the intestinal epithelium into the *vena portae*, and then be metabolized or accumulated. Then the fumonisin paradox might be explained. We recognize that this *in vitro* study does not take into account any degradation of FB₁ or bound FB₁ by digestive tract microflora. Some work has been done which shows fumonisin degradation by bacteria isolated from pig intestines, bovine rumen and environmental sources (42, 43, 44).

References

- 1 Marasas WFO (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ Health Perspect* 109 (suppl. 2): 239-243
- 2 Jackson L, Jablonski J (2004) Fumonisin. In: Nagan M, Olsen M (eds) *Mycotoxins in Food. Detection and Control*. Woodhead, Cambridge, 367-405
- 3 Soriano JM, Dragacci S (2004) Occurrence of fumonisins in foods. *Food Res Int* 37: 985-1000
- 4 Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PF, Sydenham EW, Shephard GS, van Schalkwyk DJ (1992) *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82: 353-357
- 5 Chu FS, Li GY (1994) Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol* 60: 847-852
- 6 Sadler TW, Merrill AH, Stevens VL, Sullards MC, Wang E, Wang P (2002) Prevention of fumonisin B₁-induced neural tube defects by folic acid. *Teratology* 66: 169-176
- 7 Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martínez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH Jr (2004) Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr* 134: 711-716
- 8 Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill AH Jr, Rothman KJ, Hendricks KA (2006) Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ Health Perspect* 114: 237-241
- 9 Humpf H-U, Voss KA (2004) Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 48: 255-269
- 10 Castelo MM, Katta SK, Sumner SS, Hanna MA, Bullerman LB (1998) Extrusion cooking reduces recoverability of fumonisin B₁ from extruded corn grits. *J Food Sci* 63: 696-698
- 11 Abd Alla El-Sayed AM, Aly Soher E, Sahab AF (2003) Occurrence of certain mycotoxins in corn and corn-based products and the thermostability of fumonisin B₁ during processing. *Nahrung* 47: 222-225
- 12 Jackson LS, Katta SK, Fingerhut DD, De Vries JW, Bullerman LB (1997) Effects of baking and frying on the fumonisin B₁ content of corn-based foods. *J Agric Food Chem* 45: 4800-4805
- 13 Meister U, Springer M (2004) Mycotoxins in cereal products – occurrence and changes during processing. *J Appl Bot Food Qual* 78: 168-173
- 14 Katta SK, Jackson LS, Sumner SS, Hanna MA, Bullerman LB (1999) Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B₁ in extrusion-cooked corn grits. *Cereal Chem* 76: 16-20
- 15 Dombrink-Kurtzman MA, Dvorak TJ, Barron ME, Rooney LW (2000) Effect of nixtamalization (alkaline cooking) on fumonisin-contaminated corn for production of masa and tortillas. *J Agric Food Chem* 48: 5781-5786
- 16 Cassaniga D, Basilico JC, Gonzalez RJ, Torres RL, de Greef DM (2001) Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Lett Appl Microbiol* 33: 144-147
- 17 Saunders DS, Meredith FI, Voss KA (2001) Control of fumonisin: Effects of processing. *Environ Health Perspect* 109, Suppl 2: 333-336
- 18 Castells M, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ (2005) Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. *Food Addit Contam* 22: 150-157
- 19 De Girolamo A, Solfrizzo M, Visconti A (2001) Effect of processing on fumonisin concentration in corn flakes. *J Food Protect* 64: 701-705
- 20 Jackson LS, Hlywka JJ, Senthil KR, Bullerman LB, Musser SM (1996) Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B₁ in an aqueous model system. *J Agric Food Chem* 44: 906-912

- 21 Shier WT, Abbas HK, Badria FA (1997) Structure-activity relationships of the corn fungal toxin fumonisin B₁: Implications for food safety. *J Nat Toxins* 6: 225-242
- 22 Kim E-K, Scott PM, Lau BP-Y (2003) Hidden fumonisin in corn flakes. *Food Addit Contam* 20: 161-169
- 23 Park JW, Scott PM, Lau BP-Y, Lewis DA (2004) Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. *Food Addit Contam* 21: 1168-1178
- 24 Meister U (2001) Investigations on the change of fumonisin content of maize during hydrothermal treatment of maize. Analysis by means of HPLC methods and ELISA. *Eur Food Res Technol* 213: 187-193
- 25 Seefelder W, Humpf H-U (2001) Formation of fumonisin artefacts in thermal treated food. *Mycotoxin Research* 17A: 116-119
- 26 Seefelder W, Knecht A, Humpf, H-U (2003) Bound fumonisin B₁: Analysis of fumonisin-B₁ glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51: 5567-5573
- 27 Marasas WFO, Miller JD, Riley RT, Visconti A (2000) Fumonisin. *Environmental Health Criteria* 219. World Health Organization, Geneva
- 28 Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Savard ME (1995) Fate of a single dose of ¹⁴C-labelled fumonisin B₁ in vervet monkeys. *Nat Toxins* 3: 145-150
- 29 Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Alberts JF, Cawood ME (1994) Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B₁ in a non-human primate. *Toxicon* 32: 735-741
- 30 Norred WP, Plattner RD, Chamberlain WJ (1993) Distribution and excretion of [¹⁴C] fumonisin B₁ in male Sprague-Dawley rats. *Nat Toxins* 1: 341-346
- 31 Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Alberts JF, Gelderblom WCA (1992) Fate of a single dose of the ¹⁴C-labelled mycotoxin, fumonisin B₁, in rats. *Toxicon* 30: 768-770.
- 32 Hopmans EC, Hauck CC, Hendrich S, Murphy PA (1997) Excretion of fumonisin B₁, hydrolyzed fumonisin B₁, and the fumonisin B₁-fructose adduct in rats. *J Agric Food Chem* 45: 2618-2625
- 33 Shier WT (2000) The fumonisin paradox: a review of research on oral bioavailability of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *J Toxicol Toxin Rev* 19: 161-187
- 34 Oomen AG, Rompelberg JM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM (2003) Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam* 44: 281-287
- 35 Versantvoort CHM, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJM, Sips AJAM (2005) Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol* 43: 31-40
- 36 Rice LG, Ross PF (1994) Methods for detection and quantitation of fumonisins in corn, cereal products and animal excreta. *J Food Protect* 57: 536-540
- 37 Thakur RA, Smith JS (1996). Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed and meat, using HPLC. *J Agric Food Chem* 44: 1047-1052
- 38 Xie W, Mirocha CJ, Chen J (1997) Detection of two naturally occurring structural isomers of partially hydrolyzed fumonisin B₁ in corn by on-line capillary liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 45: 1251-1255
- 39 Sydenham EW, Thiel GP, Shephard GS, Koch KR, Hutton T (1995) Preparation and isolation of partially hydrolyzed moiety of fumonisin B₁. *J Agric Food Chem* 43: 2400-2405
- 40 Scott PM, Lawrence GA (1996) Determination of hydrolyzed fumonisin B₁ in alkali-processed corn foods. *Food Addit Contam* 13: 823-832
- 41 Shephard GS, Thiel PG, Sydenham EW, Vleggaar R, Alberts JF (1994) Determination of the mycotoxin fumonisin B₁ and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. *Food Chem Toxicol* 32: 23-29
- 42 Täubel M, Moll, WD, Vekiru E, Frank A, Loibner AP, Braun R, Schatzmayr G (2006) Biological detoxification of fumonisins by new bacterial isolates. *Mycoglobe International Conference, Monopoli (Bari), Italy, 26-29 September, 2006, poster 15*
- 43 Karlovsky P (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat Toxins* 7: 1-23
- 44 Benedetti R, Nazzi F, Locci R, Firrao G (2006) Degradation of fumonisin B₁ by a bacterial strain isolated from soil. *Biodegradation* 17: 31-38

ESTIMACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTOS EN 210 DONANTES DE SANGRE EN LA CIUDAD DE MAR DEL PLATA

MOTTA, Estela ⁽¹⁾, CIANCIO BOVIER, Emilia ⁽²⁾, PACIN, Ana ^(2,3), RESNIK, Silvia ^(3,4)
VILLA, Daniel ⁽⁵⁾

Universidad de Mar del Plata ⁽¹⁾, CIM-UNLu ⁽²⁾, CIC de la Provincia de Bs.As ⁽³⁾
FCEyN-UBA ⁽⁴⁾ · Dirección Sistemas UNLu ⁽⁵⁾

Centro de Investigación en Micotoxinas, Universidad Nacional de Luján, Buenos Aires, Argentina CP 6700 Teléfono-FAX: 02323 436940; anaxto@speedy.com.ar

RESUMEN

Ocratoxina A (OTA), es una micotoxina hallada con frecuencia en alimentos. El objetivo del trabajo es identificar y cuantificar la ingesta de alimentos que con frecuencia presentan contaminación por OTA, y asociar el consumo de los mismos con la presencia de esta micotoxina en plasma. Se realizó una encuesta alimenticia a 210 donantes de sangre que concurrieron al Centro Regional de Hemoterapia de Mar del Plata, para recoger información sobre la frecuencia de consumo y las cantidades ingeridas. Se determinaron los valores medios, mediana y desviaciones estándar de los alimentos consumidos. Considerando aquellos capaces de aportar OTA, los resultados de la encuesta muestran que diariamente la población consume 84 % de alimentos panificados, 65 % de galletas, 26 % café y 20.6 % de vino. Semanalmente consumen 83 % de fideos, 73 % de aves de corral, 45 % y 46 % fiambres crudos y cocidos respectivamente y 17 % de café.

ABSTRACT

Ocratoxina A (OTA), is a mycotoxin often founded in foods. The purpose of this work is to identify and to quantify those foods that usually present contamination for OTA at worldwide, and associate their consumption by people, with the presence of OTA in plasma. It was accomplished a poll about foods consumption

to 210 blood's donors, who had concurred to the Regional Hemotherapy Center of Mar del Plata, to collect information on foods frequency and the ingested quantities. It was determined the mean and medium values, and the standard deviations of foods consumption. Taking into account those foods which could supply OTA, the results of the survey showed that population daily consumption was 84% of breadstuffs, 65% of cookies, 26% coffee and 20.6% of wine. Weekly they consume 83% of noodles, 73% of poultry, 45% and 46% raw cold cuts and cooked respectively and 17% of coffee.

Palabras claves: ocratoxina A, encuesta alimenticia, estimación de exposición

INTRODUCCION

La ocratoxina A (OTA), micotoxina carcinogénica en ratones, posee actividad nefrotóxica, inmunotóxica y teratogénica [1]. La OTA ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer en el grupo 2 B, posible sustancia carcinogénica en humanos.

OTA fue hallada como contaminante de cereales: trigo, centeno, maíz, cebada y avena [2] [3]; otros alimentos, como diversas especies de habas y legumbres, café, cacao y frutas secas han sido también halladas contaminadas por OTA. La contaminación secundaria ocurre, como consecuencia de la acumulación de metabolitos tóxicos, en carne, vísceras y subproductos (salchichas, huevos) de animales alimentados con cereales contaminados por OTA, y que son ingeridos por la población, ya que los mecanismos habituales de cocción no la degradan totalmente [4] [5].

Por esta razón, si bien muchas de las operaciones relacionadas con el procesamiento de alimentos disminuyen el grado de contaminación por ocratoxina A, no la destruyen completamente y por eso es posible hallar OTA en café, productos derivados del cacao, especias, vino y cerveza [6] [7] [8].

La estimación de la exposición se basa, entre otros conocimientos, en la medición de fuentes conocidas de ocratoxina A en la dieta. En la Argentina, los niveles hallados de contaminación de vino por OTA fueron nulos o muy bajos [9] [10],

esporádicamente se detectó OTA con bajos niveles en alimentos balanceados en Córdoba. Un estudio del “Joint Food Safety and Standards Group” realizado en muestras de maíz que ingresaron al puerto de Gran Bretaña entre 1998 y 1999 indica que de las 37 muestras provenientes de la Argentina solamente una muestra presentaba niveles de contaminación entre 0.1 – 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [11]. La baja o nula ocurrencia puede estar relacionada con una reducción durante la elaboración de ciertos alimentos o con la escasa presencia de hongos productores en esta región. El objetivo del trabajo es identificar y cuantificar aquellos alimentos que a nivel mundial presentan contaminación por OA para asociar posteriormente el consumo de los mismos, con la presencia de OTA en plasma de dadores de sangre.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó una encuesta alimenticia a 210 donantes de sangre (150 hombres y 60 mujeres) que concurren durante el mes de febrero al Centro Regional de Hemoterapia de la ciudad de Mar del Plata, por medio de un formulario que permite recoger información sobre la frecuencia de consumo y las cantidades ingeridas. En la encuesta se consignó la edad, peso, talla y estado sanitario. Se encuestó sobre 43 tipos de alimentos, de éstos se incluyeron 18 alimentos que se consideraron importantes como fuente de contaminación por OTA. Entre ellos cerveza, vino, café, polenta, mezcla de cereales, carne de ave, otras carnes, avena, legumbres, frutas secas, pasta de maní, fiambres crudos, fiambres cocidos, panificados, galletas, fideos secos, chocolate, riñón de cerdo. El tamaño de la porción de los diferentes alimentos fue convertido a peso teniendo en cuenta las porciones estándares.

Análisis estadístico: Se determinaron los valores medios, mediana y desviaciones estándar (DS) de los alimentos consumidos. Para el análisis de las cantidades, se consideró la ingesta mensual para cada ítem, convirtiendo las frecuencias de consumo: diaria=30, semanal=4.25, mensual=1, esporádico=0.25 y nunca=0.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

El peso medio de los encuestados fue de 77.4 Kg. (DS: 15.38), altura media 170.3 cm. (DS: 8.68) y edad media 38.1 años (DS: 11.99). Teniendo en cuenta aquellos

alimentos que son considerados a nivel mundial como fuente de contaminación de OTA, los resultados de la encuesta muestran que el 84 % de la población consume diariamente alimentos panificados, el 65 % galletas, el 26 % café y el 20.6 % vino. Y semanalmente el 83% consume fideos, el 73% aves de corral, el 45% y el 46 % fiambres crudos y fiambres cocidos respectivamente y el 17% consume café (tablas 1-3). Las cantidades mensuales ingeridas de alimentos capaces de estar contaminados por OTA, podrían agruparse en productos manufacturados con cereales: panificados 7,35 kg (DS: 4,24) y galletas 2,51 kg (DS: 2,04), y vino cuyo consumo es de 2,64 lt (DS: 4,5 l); seguidos carne de aves de corral (1,3 kg DS: 1,98), fideos (969.88 g DS:1007.5), soja (397,97 g DS:788,2), carne de cerdo (365.19 g, DS: 783.4), fiambres ya sea crudos (330.99 g DS: 559.8) o cocidos (362.9 g DS: 641.8), harina de maíz (264.62 g DS: 532.9) que no tuvo un consumo importante, probablemente debido a que la encuesta se realizó en verano y café (206.68 g DS: 490.6). La cantidad de otros alimentos es escasa como para ser tenida en cuenta, como vía de exposición.

CONCLUSIONES

Basados en la información sobre alimentos que son considerados a nivel mundial como fuente de contaminación de OTA, la exposición de la población encuestada podría ocurrir debido al consumo de productos panificados, vino, galletas, y en menor cantidad carne de aves, fideos; otros alimentos como fiambres, carne de cerdo, café, no se consideran relevantes en su aporte a la exposición, y el consumo de riñón de cerdo es nulo por lo que tampoco contribuiría a la exposición de OTA.

La importancia de continuar llevando a cabo encuestas de este tipo radica en la posibilidad de estimar la exposición de la población a intoxicaciones a través de consumo de alimentos contaminados, así como identificar aquellos alimentos sobre los que se debería analizar la presencia de OTA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero de la CIC, UBA, UNLu, UNMdelp, INTA, Comunidad europea a través del Project Contract Number ICA4-CT-2002-10043; Pictor BID 1201/OC-AR PICTOR 2002-00012

REFERENCIAS

1. Kuiper-Goodman, T., Scott, P. 1989. Risk assessment of mycotoxins Ochratoxin A. *Biomedical and environmental. Sciences*, 2. 179-248.
2. Trucksess, M.W., Giler, J., Young, K., White, K.D. & Page, S.W. 1999 Determination and survey of Ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. 1997 *J. AOAC Int.*, 82, 85-89.
3. Jorgensen, K., Rasmussen, G. & Thorup, I. 1996 Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Addit. Contam.*, 13. 95-104.
4. Hult, K., Hokby, E., Sellyey, G., Rutqvist, L. & Gatenbeck, S. 1992 Ochratoxin A occurrence in slaughter-pigs in Sweden and its use as a tool for feed screening programs. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11, 39-40.
5. Patel, S., Hazel, C.M., Winterton, A.G.M. & Gleande, A.E. 1997 Survey of Ochratoxin A in UK retail coffee. *Food Addit. Contam.*, 14, 217-222.
6. Krogh, P., 1987, Ochratoxin in food. *Mycotoxins in Food*, edited by Krogh, P. London: Academic Press, pp. 97-121.
7. JECFA, 2001, Safety evaluation of certain mycotoxins in food, prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Series 47 pp. 410-413.
8. Boudra, H., Le Bars, P. & Le Bars, J. 1995 Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *App. Environ. Microbiol.* 61, 1156-1158.
9. Pacin A., Resnik S., Vega M., Saelzer R., Ciancio Bovier E., Ríos G., and Martinez N. 2004. Occurrence of Ochratoxin A in wines in the Argentinean and Chilean markets. Enviado a publicar.

10. Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M. E., Dalcerro, A. M., and Santana, D. M. N., 2004, Occurrence of Ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 21, 358-364.

11. Food surveillance, information sheets 1998-1999.
<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/survlist/1998surv.htm#nat>

Tabla I: Frecuencia de consumo de alimentos en 210 donantes de sangre

ALIMENTO	DIARIO		SEMANAL		MENSUAL		ALGUNAS VECES		NUNCA	
	*N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Te	192	94.1	5	2.5	0	0.0	0	0.0	7	3.4
Productos panificados	174	84.5	25	12.1	2	1.0	4	1.9	1	0.5
Azúcar	160	78	3	1.5	0	0.0	4	2.0	38	18.5
Vegetales crudos	135	65.9	57	27.8	3	1.5	1	0.5	9	4.4
Galletas	134	65.0	35	17.0	2	1.0	15	7.3	20	9.7
Frutas Frescas	129	62.9	55	26.8	7	3.4	5	2.4	9	4.4
Frutas enlatadas	107	52.2	49	23.9	10	4.9	19	9.3	20	9.8
Jugos	105	51.2	42	20.5	7	3.4	11	5.4	40	19.5
Carne de vaca	96	47.6	97	47.1	7	3.4	2	1.0	2	1.0
Leche y subproductos	82	39.8	62	30.1	23	11.2	13	6.3	26	12.6
Vegetales cocidos	74	35.4	86	41.7	14	6.8	2	1.0	30	14.6
Mermelada	71	34.6	53	25.9	6	2.9	19	9.3	56	27.3

* N°= Número de personas

Tabla II: Frecuencia de consumo de alimentos en los 210 donantes de sangre

ALIMENTO	DIARIO		SEMANAL		MENSUAL		A VECES		NUNCA	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Jugo de frutas	67	33,3	29	14,4	5	2,5	12	6,0	88	43,8
Todo tipo de quesos	58	28,2	120	58,3	8	3,9	11	5,3	9	4,4
Café	53	26,2	35	17,3	9	4,5	34	16,8	71	35,1
Dulces	43	21,1	49	24,0	10	4,9	46	22,5	56	27,5
Vinos	42	20,6	40	19,6	4	2,0	11	5,4	107	52,5
Soja	32	15,6	38	18,5	19	9,3	14	6,8	102	49,8
Dulce de Leche	29	14,2	45	22,1	21	10,3	38	18,6	71	34,8
Edulcorantes	27	13,2	4	2,0	0	0,0	0	0,0	173	84,8
Cereales	24	11,8	29	14,2	11	5,4	21	10,3	119	58,3
Cerveza	20	9,8	72	35,1	10	4,9	21	10,2	82	40,0
Fiambre cocido	19	9,2	95	46,1	38	18,4	32	15,5	22	10,7
Fiambre crudo	17	8,3	92	45,1	34	16,7	27	13,2	34	16,7
Aves de corral	17	8,3	150	72,8	18	8,7	8	3,9	13	6,3
Snack salados	16	7,9	76	37,6	30	14,9	40	19,8	40	19,8
Tallarines	15	7,3	170	82,5	7	3,4	4	1,9	10	4,9

* N°= Número de personas

Tabla III: Frecuencia de consumo de alimentos en los 210 donantes de sangre

Alimento	Diario		Semanal		Mensual		A veces		Nunca	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Chocolate	12	5,9	53	25,9	16	7,8	28	13,7	96	46,8
Huevos	11	5,4	157	77,3	10	4,9	16	7,9	9	4,4
Arroz y derivados	10	4,9	151	73,3	16	7,8	13	6,3	16	7,8
Pastelería	8	3,9	51	25,1	48	23,6	63	31,0	33	16,3
Frutas desecadas	7	3,4	18	8,8	11	5,4	15	7,3	154	75,1
Frutas secas	6	3,0	10	5,0	10	5,0	43	21,4	132	65,7
Bebidas dietéticas	5	2,4	3	1,5	1	0,5	5	2,4	191	93,2
Avena y derivados	5	2,4	8	3,9	10	4,9	8	3,9	175	85,0
Porotos, lentejas, garbanzos	4	2,0	41	20,2	32	15,8	41	20,2	85	41,9
Sopas	4	1,9	14	6,8	11	5,8	11	5,3	165	80,1
Pasta de maní	1	0,5	19	9,4	25	12,4	32	15,8	125	61,9
Bebidas alcohólicas	1	0,5	6	3,0	0	0,0	1	0,5	195	96,1
Polenta y productos derivados del maíz	1	0,5	57	27,8	36	17,6	44	21,5	67	32,7
Otras carnes	1	0,5	64	31,1	66	32,0	37	18	38	18,4
Carne de cerdo	0	0,0	21	10,2	37	18,0	67	32,5	81	39,3
Riñón de cerdo	0	0,0	0	0,0	3	1,5	16	8,0	181	90,5

* N°= Número de personas