



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**

**“*Aspergillus* SECCIÓN *Flavi* Y AFLATOXINAS  
EN MANÍ EN EL MOMENTO DE INGRESO A  
LA PLANTA PROCESADORA”**

**TESIS DE GRADO  
VANESA J. PIUSSI**

**DIRECTOR: Dra. ADRIANA M. TORRES  
CO-DIRECTOR: Ing. ALEJANDRO RIVEROS**

**2009**

El presente trabajo fue realizado en la Empresa OLAM a través de una pasantía y en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales. Se presenta como requerimiento para optar el título de grado en Microbiología en la UNRC.

Director: Dra. Adriana M. Torres

Co-director: Ing. Alejandro Riveros

APROBADO POR EL JURADO:

Dra. Adriana M. Torres

Dra. Cecilia Frigerio

Dra. Cecilia Farnochi

Río Cuarto, Marzo 2009

Gracias a todos aquellos que estuvieron a mi lado e hicieron posible este triunfo...  
Especialmente gracias a la Dra. Adriana Torres por brindarme permanentemente todo su apoyo y guiarme en este trabajo para mi formación profesional.

A la empresa OLAM por abrirme las puertas para la realización de esta pasantía.

A la Facultad de Ciencias Exactas y al Departamento de Microbiología e inmunología por haberme brindado la oportunidad de elaborar la presente tesis.

A todos los chicos del laboratorio de Micología que siempre me sacaron de una duda y también gracias a aquellos chicos de otros laboratorios con quien compartí momentos inolvidables!!!  
Especialmente un gracias muy infinito a toda mi familia, a mamá y papá, por toda su confianza en mí, por ser mi sostén, por estar a mi lado en cada instante de mi vida y por sobre todo gracias a su lucha... YO ESTOY AQUÍ!!! A Jesica, mi hermana, quien me aconsejó y me apoyó en todo lo emprendido...

Gracias a Dios por estar a mi lado y por guiarme siempre...

Gracias de todo corazón a todas aquellas personas que me enseñaron algo en la vida...

ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1. I. El maní	1
1.I.A. Origen, morfología, fisiología y otras generalidades	1
1.I.B. Importancia en Córdoba, Argentina y el mundo	3
1.I.C. Arrancado, descapotado y almacenamiento	7
1.I.D. Funcionamiento de una planta de maní confitería	10
1.I.E. Factores que influyen en la calidad del maní	11
1.I.F. Planta de acopio OLAM	16
1.I.G. Recepción de la materia prima en la planta acopiadora OLAM	18
1.II. género <i>Aspergillus</i>	19
1.II.A. Características generales	19
1.II.B. Morfología de <i>Aspergillus</i>	20
1.II.C. Taxonomía del género <i>Aspergillus</i> y la sección <i>Flavi</i>	26
1.II.D. Reproducción asexual	28
1.II.E. Reproducción sexual	28
1.II.F. Ciclo parasexual	29
1.III. Aflatoxinas	30
1.III.A. Características generales	30
1.III.B. Síntesis de aflatoxinas	34
1.III.C. Factores que favorecen el crecimiento de estos hongos y la producción de la toxina	34
1.III.D. Niveles de aflatoxinas permitidos	37
1.III.E. Buenas prácticas de manejo para disminuir el riesgo de aflatoxinas en el cultivo de maní	37
1.III.E.1. Buenas prácticas de manejo durante el desarrollo del cultivo	37
1.III.E.2. Buenas prácticas de manejo durante la cosecha	38
1.III.E.3. Buenas prácticas de manejo durante la postcosecha	39
1.III.E.4. Buenas prácticas de fabricación	41
<b>2. Hipótesis</b>	<b>44</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>45</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>46</b>
4.I. Determinación de análisis de calidad en las muestras de maní realizadas en la planta de acopio	46
4.I.1. Muestreo	46
4.I.2. Preparación de la muestra de laboratorio, contramuestra y aflatoxina	47
4.I.3. Análisis comercial de ingreso	48
4.II. Determinación de la frecuencia de aislamiento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en las muestras de maní	51
4.II.A. Procedimiento	51
4.II.B. Composición de los medios de cultivo	52

---

4.II.C. Fundamentos de los medios de cultivo	53
4.II.D. Análisis estadísticos	53
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>54</b>
5.I. Análisis de los distintos tipos de daños que pueden afectar a la planta de maní	54
5.II. Análisis de otros parámetros (tierra, cuerpos extraños, cáscaras, granos sueltos, granos descascarados)	58
5.III. Análisis del contenido de humedad en los granos de maní	62
5.IV. Contaminación con aflatoxinas	63
5.V. Análisis de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en las muestras de maní	65
5.VI. Correlación entre diversos factores que podrían afectar al maní	69
<b>6. Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>72</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>79</b>



# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1. I. EL MANÍ

#### 1.I.A. ORIGEN, MORFOLOGÍA, FISIOLOGÍA Y OTRAS GENERALIDADES

El **maní** o **cacahuete** es un cultivo de origen sudamericano y comprende entre 40-50 especies diferentes (*Figura N° 1*). Apareció hace por lo menos 4000 años en el actual noroeste de Argentina y sur de Bolivia. En el siglo XVI entró a África donde se desarrolló un segundo centro genético, y desde allí se extendió hacia todo el continente asiático. Hoy en día se cultiva en todos los países tropicales y subtropicales (Gregory y col., 1980).

<i>FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO</i>
<b>Nombre vulgar:</b> maní, cacahuete.
<b>Familia:</b> <i>Leguminosae</i> .
<b>Subfamilia:</b> <i>Papilionoideae</i> .
<b>Género:</b> <i>Arachis</i> .
<b>Subgénero:</b> <i>hypogaea, fastigiata</i> .
<b>Variedades:</b> virginia, española, valencia, runner.
<b>Origen:</b> Sudamérica.
<b>Botánica:</b> herbácea anual.
<b>Altura:</b> 20-60 cm.
<b>Brote principal:</b> recto.
<b>Brotes laterales:</b> rectos, extendidos, rastreros.
<b>Peculiaridad:</b> fruto madura dentro de la tierra, raíces con rizobios nitrificantes.
<b>Climatología:</b> tropical-subtropical, árido.
<b>Suelo:</b> fértil, drenado, suelto, liviano, profundo, libre de sales, pH>7.
<b>Hongos:</b> <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> (productores de aflatoxinas).

Fuente: USDA



*Figura N° 1: Planta de maní y su fruto*

El maní es una planta anual, herbácea, de porte erecto o rastrero, existiendo formas intermedias. Los cultivares erectos alcanzan alturas de 35 a 45 cm, mientras que los rastreros 120 cm de longitud (Bragachini, 1994).

Este cultivo es una de las principales oleaginosas del mundo, es una importante fuente de proteínas de origen vegetal para el consumo humano como animal, además de proporcionar lípidos (*Tabla N° 1*).

Las semillas se comen crudas, cocidas o tostadas, se las procesa para producir mantequilla de maní, dulces y bocadillos o se las utiliza para sopas o salsas; además como pellet e incluso como forraje (Bragachini, 1994).

***Tabla N° 1: Composición de la semilla de maní***

SUSTANCIA	CANTIDAD (%)
Agua	5
Proteína	30
Grasa	48
Carbohidratos	15.5
Fibra cruda	3
Ceniza	2

(Abdel Rahman, 1982; Rodriguez y col., 1989; Salazar y Young, 1984; Savage y Keenegan, 1994; Wallerstein y col., 1989)

El sistema radicular está formado por un pivote central que puede profundizarse en el suelo más de 1.70 m y por raíces laterales que nacen a distintas alturas del pivote, con pelos absorbentes y con nódulos producidos por rizobios, que fijan el nitrógeno atmosférico.

El eje central de la planta es siempre erecto y puede o no tener inflorescencias. Las ramas secundarias son erectas, rastreras o intermedias.

Las hojas son estipuladas, formadas por cuatro folíolos, algunos cultivares poseen más.

El maní florece continuamente y forma vainas. En condiciones óptimas de crecimiento, la floración comienza a los 40 días, cuando la planta es pequeña, produciendo pocas flores por día. Si persisten las condiciones favorables, la floración continúa hasta completar la carga de vainas e inicia el llenado de granos. Durante este período se forman entre 400-600 flores por planta, pero sólo 30-50 forman vainas que llegan a la madurez de la cosecha.

El período de floración y formación de vainas es de 50-60 días; durante períodos de déficit hídrico, la floración se detiene y se reinicia después de una lluvia; esto produce lo que se llama “camada de vainas” con un grado de madurez no muy uniforme. Esta diferencia de madurez entre las vainas antes y después de la sequía, puede ser de 4 a 6 semanas. Cada vaina se desarrolla a distinta velocidad dependiendo de: **actividad acuosa (aw), sanidad de la planta y temperatura.**

Las inflorescencias se presentan como “espigas” con 3 a 5 flores, tienen la corola amarilla. El androceo posee ocho anteras, cuatro redondeadas y cuatro alargadas. El ovario, después de la



fecundación, se desarrolla formando el ginecóforo (clavo) en cuyo extremo lleva el óvulo fecundado.

La vaina es inherente, oblonga, constituida por una cubierta, pudiendo contener de 1 a 4 granos. La cubierta o pericarpio puede ser reticulada o más o menos lisa, esponjosa, con restricciones a veces muy pronunciadas que separan los granos. La madurez del contenido de la vaina está dada por el ennegrecimiento de la cara interna del pericarpio.

Las semillas son alargadas o redondeada, a veces con extremos achatados. Se encuentran cubiertas por un tegumento seminal muy delgado que puede ser colorado, rosado pálido, violáceo, negro, overo. El peso de la semilla es de 0.3 a 1.50 g (Bragachini, 1994).

El cultivo de maní se divide en dos estadios:

1. **Crecimiento vegetativo** (tallos y hojas): incluye un alargamiento de tallos y el área foliar se completa a los 110 días después del sembrado.
2. **Crecimiento reproductivo** (flores, clavos y vainas): las flores se presentan en espigas, desarrollándose el ovario luego de la fecundación para originar el ginecóforo o clavo, en cuyo extremo lleva los óvulos fecundados. Como tiene crecimiento geotrópicamente positivo, se entierra en el suelo donde desarrolla el fruto y la vaina, quien adquiere posición horizontal (Giandana, 1994).

Este cultivo requiere de abundante radiación solar, estación vegetativa cálida de 120 a 140 días y precipitaciones moderadas (Bragachini, 1994).

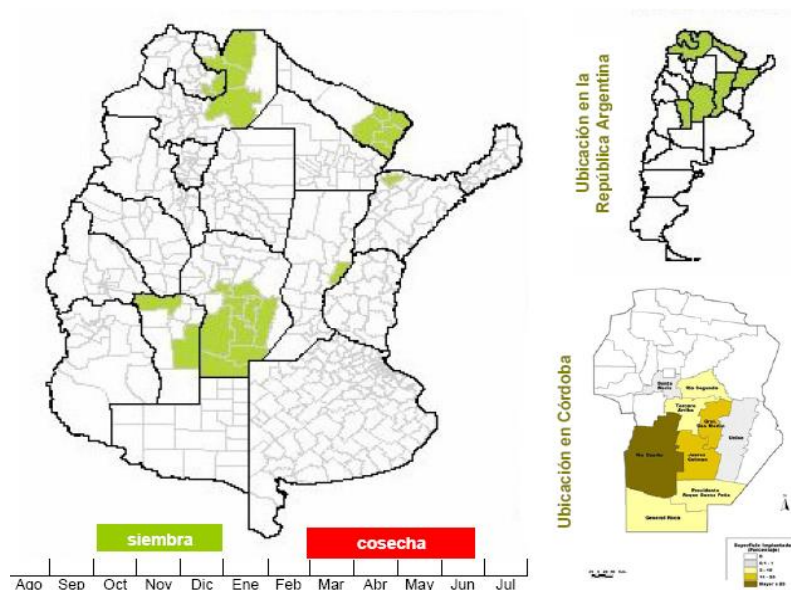
### **1.I.B. IMPORTANCIA EN CÓRDOBA, ARGENTINA Y EL MUNDO**

El maní de procedencia argentina es considerado uno de los productos de mayor calidad en el mercado mundial. Ocupa el segundo lugar según el volumen de exportación debido al potencial productivo actual y a la baja demanda interna.

La Argentina ha consolidado durante décadas un prestigio internacional que lo distingue del resto de los países productores, y actualmente exporta más del 90 % de la producción nacional con un mercado doméstico escasamente desarrollado.

La industria manisera argentina es sin duda una de las economías regionales más importantes y se desarrolla principalmente en la zona centro-sur de la provincia de Córdoba (92% de la producción), destacándose los departamentos de Río Cuarto, Juárez Celman y Gral. San Martín, que en conjunto reúnen el 68% de la superficie provincial. En tanto que el porcentaje restante se divide entre las provincias de Salta, Formosa, Corrientes, San Luis y a partir del año 2004, Santa Fé (SAGPyA, 2007) (*Figura N° 2 y 4*).

Como puede observarse en la *Figura N° 4*, más del 90% de la producción se concentra en la provincia de Córdoba (SAGPyA, 2007).



***Figura N° 2: Zonas de producción de maní en la Argentina y Córdoba***

La actividad manisera produce una influencia muy importante en el aspecto socioeconómico y cultural de la región, generándose millones de pesos de ingreso al país que aseguran nuevas inversiones. Muchas de ellas están orientadas a crear nuevos cultivares de maní que por la calidad, tamaño de sus semillas y contenido graso adecuado tengan una mayor demanda y valor comercial (AGRISCIENTIA, 2004. Vol.XXI (2): 85-88).

La notable participación de la provincia de Córdoba ha ido reduciéndose hasta alcanzar el 90% en la campaña 2005/2006, según Cámara Argentina de Maní. En consecuencia, otras provincias incrementaron su participación como los casos de Formosa, San Luis y Salta, debido a la actividad desarrollada por grandes empresas industriales, cuyas casas centrales se encuentran en la zona tradicional manisera de esta provincia. También se observa la siembra de este cultivo en forma marginal en Santa Fé y Santiago del Estero, correspondiente a emprendimientos aislados de algunos productores que ocupan algún nicho de mercado regional (Tabla N° 2) (SAGPyA, 2007).

***Tabla N° 2: Distribución de la producción de maní por provincias***

Provincia	1987/1988		1994/1995		2003/2004		2004/2005	
	ha.	%	ha.	%	ha.	%	ha.	%
<b>Córdoba</b>	193.000	99,8	154.790	99,7	156.880	92,16	197.850	93,73
<b>Corrientes</b>	90	0	190	0,1	540	0,32	540	0,26
<b>Formosa</b>	20	0	0	0	1.003	0,59	1.400	0,66
<b>Salta</b>	0	0	230	0,1	8.800	5,17	700	3,32
<b>San Luis</b>	0	0	0	0	2.600	1,53	2.600	1,23
<b>Jujuy</b>	0	0	0	0	0	0	1.000	0,47
<b>Santa Fé</b>	0	0	0	0	400	0,23	700	0,33
<b>Misiones</b>	290	0,1	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>193.400</b>	<b>100</b>	<b>155.210</b>	<b>100</b>	<b>170.223</b>	<b>100</b>	<b>211.090</b>	<b>100</b>

Es importante destacar que años atrás, cientos de agricultores maniseros abandonaron el cultivo por diversos factores, tales como altos costos de producción, problemas agronómicos y mercados inestables. Esto obligó a la industria a encarar en forma casi exclusiva la siembra, para asegurar una adecuada provisión de materia prima.

En la actualidad, más del 80 por ciento del maní es sembrado por las empresas procesadoras. Este desequilibrio, entre otros factores, motivó que el sector privado, los municipios de la cuenca manisera y el gobierno de la provincia de Córdoba acordaran trabajar en conjunto para garantizar la sustentabilidad de la cadena (INTA, 2005).

La industria manisera argentina exporta casi la totalidad de su producción y sus productos (maní confitería y blanchado, maníes preparados, pasta y manteca de maní), por su calidad y sanidad, gozan de prestigio y demanda en todo el mundo. Actualmente Argentina se ubica en segundo lugar, después de China y precediendo a EEUU, como exportador mundial; siendo el destino más importante la Unión Europea (principal comprador de maní y el mercado en el cual se exige la legislación alimentaria más rigurosa del planeta) con más del 70% de la exportación, siguiendo EEUU, Canadá, México, Indonesia y Japón (INTA, 2005).

El 95% del maní sembrado en Argentina es de tipo Virginia runner, del total del maní producido, aproximadamente el 70% se destina a maní confitería -que se exporta para consumo humano-, el 10% (maní partido) se exporta como grano -para cobertura en repostería- o se utiliza para pasta -para la elaboración de manteca-, y el 20% restante se destina para aceite.

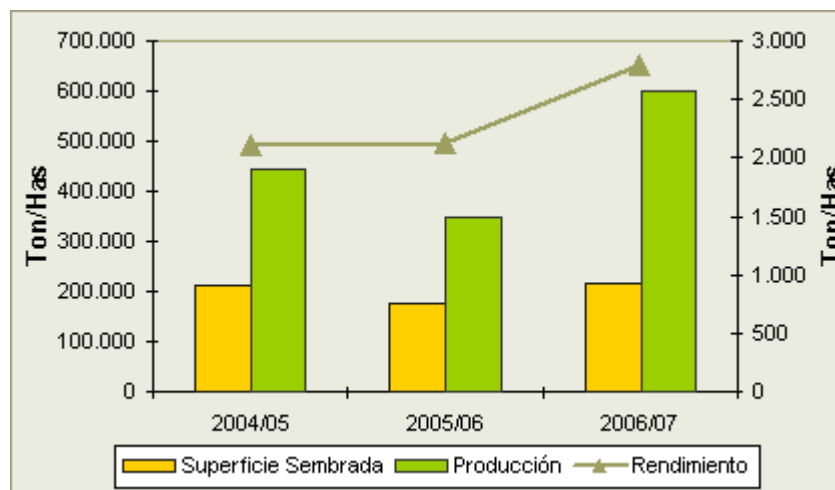
La superficie sembrada y el volumen cosechado de maní muestran una significativa variación anual, debido a la inestable rentabilidad del cultivo frente a otros cultivos alternativos y a la elevada incidencia del clima en el rendimiento (SAGPyA, 2007).

En la *Tabla N° 3* y *Figura N° 3* se puede apreciar la evolución del área sembrada, la producción y el rendimiento de tres campañas:

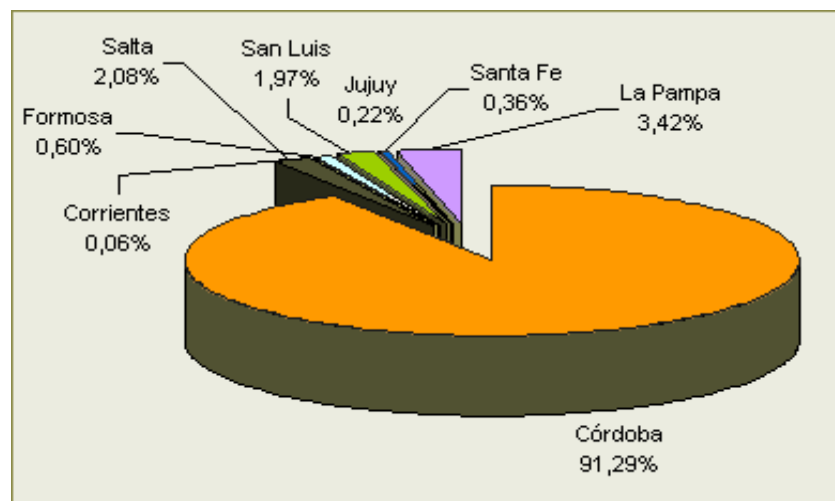
***Tabla N° 3: Superficie y Producción***

<b>Total país</b>	<b>2004/05</b>	<b>2005/06</b>	<b>2006/07</b>
<b>Superficie Sembrada</b>	211.090	174.037	215.660
<b>Superficie Cosechada</b>	210.820	163.677	215.060
<b>Producción</b>	444.800	347.323	600.035
<b>Rendimiento</b>	2.110	2.122	2.790

(SAGPyA, 2007)



***Figura N° 3: Superficie Sembrada, Producción y Rendimiento***



***Figura N° 4: Distribución de la Producción del Maní por Provincia***

Según la Dirección de Estimaciones Agrícolas de la SAGPyA, la producción para la presente campaña se estima en 700 mil toneladas, un 16% superior a la campaña anterior, lo cual posiciona a la Argentina como el sexto productor mundial. La superficie sembrada para la campaña 2007/08 fue de 233 mil hectáreas en todo el país, de las cuales más del 90% están en la provincia de Córdoba.

El producto argentino es apreciado en el Viejo Continente por su sabor y por ser una interesante opción para la obtención de maní fresco en contraestación con China y EE.UU., puesto que mientras Argentina cosecha en mayo, los demás lo hacen en noviembre.

## 1. I.C. ARRANCADO, DESCAPOTADO Y ALMACENAMIENTO DEL MANÍ

### 1. El momento oportuno del arrancado

El hecho de que los frutos estén por debajo de la tierra, dificultan la toma de decisión al momento oportuno del arrancado. El adelantamiento del arrancado impide lograr el máximo rendimiento, aumentando el porcentaje de granos chuzos, dificultando el almacenaje e incrementando la susceptibilidad a la invasión de *A. flavus* y la consiguiente formación de aflatoxinas.

La demora en el arrancado, una vez que se alcanzó la madurez óptima, provoca pérdidas considerables por el debilitamiento de los clavos, con el consiguiente desprendimiento de las vainas.

La sanidad del cultivo, el nivel nutricional, las condiciones climáticas y otros factores como la relación de vainas inmaduras-maduras, condiciones físicas de las plantas, clavos y vainas, variedad, disponibilidad de arrancadoras determinan el momento justo de arrancado, con una arrancadora invertidora (Bragachini, 1994) (*Figura N° 5*).



***Figura N° 5: Arrancadora de maní de 12 x 3, de origen nacional. Fuente: INTA PRECOP, 2008***

En general, el momento de arrancado se presenta inmediatamente luego de ocurrida la madurez fisiológica de la vaina, ya que ahí adquiere el máximo desarrollo en peso seco de los granos. Esto se manifiesta en la vaina cuando, en el interior de su cáscara, comienza a formarse un color marrón oscuro y el maní tiene alrededor de 50-55% de humedad en el grano.

Otro método es raspar la corteza exterior en la zona de constricción, teniendo la vaina con el pico hacia arriba. Esta área es la que tiene madurez más avanzada y como indicadora de madurez debe presentar color marrón oscuro.

El número de días transcurridos desde la siembra hasta la madurez es el tercer método, pero este período es variable dependiendo del clima y fecha de siembra (Bragachini, 1994).

Influencia del clima en el arrancado:

- Maní: 3 noches seguidas por debajo de 10°C, se detiene el proceso de madurez y se debe arrancar inmediatamente, si esta dentro de los días de madurez.
- Si se produce la helada: plantas muertas, se debe arrancar inmediatamente.
- Helada de andana recién arrancado: el maní pierde calidad.
- Pronóstico de heladas: parar el arrancado y retomar cuando la temperatura aumente.
- El grano bajo tierra soporta mejor la helada (INTA, 2005).

Las condiciones del cultivo a tener en cuenta para un buen arrancado, son:

1. Cultivo sano y vigoroso.
2. Rotaciones (Maní cada 4 años).
3. Uso de semilla de alta calidad.
4. Siembra uniforme en la línea y entre hileras (en un futuro piloto automático).
5. Control de malezas.
6. Control de enfermedades foliares.
7. Control de enfermedades del suelo.
8. Adecuada madurez del cultivo.
9. Buenas condiciones del suelo.
10. Condiciones climáticas favorables.
11. Superficie para arrancar por maquina arrancadora (INTA, 2005).

El sistema de arrancado e invertido es el más adecuado para lograr la calidad total, ya que ofrece las siguientes ventajas:

- Expone todas las vainas al aire libre y permite un secado y oreado más rápido y uniforme, disminuyendo el desarrollo del hongo y la producción de toxinas.
- La humedad del maní en la hilera es uniforme, lo que facilita una buena regulación de la descapotadora evitando el daño mecánico y la excesiva cantidad de impurezas.
- Disminuye la cantidad de la tierra que se adhiere a las vainas porque están distantes del suelo.
- Evita las pérdidas durante el arrancado (Bragachini, 1994).

## 2. **El descapotado**

Es la operación mecánica que consiste en separar las vainas del resto de la planta. Se realiza cuando el maní acordonado en hileras desciende del 40-45% de humedad (al momento de arrancado) hasta el 20-24% de humedad después de 4-10 días de oreado.

Durante el arrancado y descapotado de maní se obtienen pérdidas. En el maní al igual que en otros cultivos, cosechar, almacenar y transportar con pérdidas cero es imposible, pero Argentina dispone de tecnología, de arrancadoras y descapotadoras de última generación capaz de trabajar

con valores promedios de pérdidas un 45% por debajo de los promedios de la campaña pasada (SAGPyA, 2007).

### **3. Almacenaje a campo**

El mejor envase del grano de maní es su propia vaina y para proteger un producto de calidad es indispensable mantener las vainas libres de todo daño durante las etapas que comprende la cosecha.

Si no se cuenta con un sistema de secado artificial, se puede recurrir al secado natural a campo, en bolsones de rejilla de plástico. El secado artificial se practica en pequeñas porciones en nuestro país.

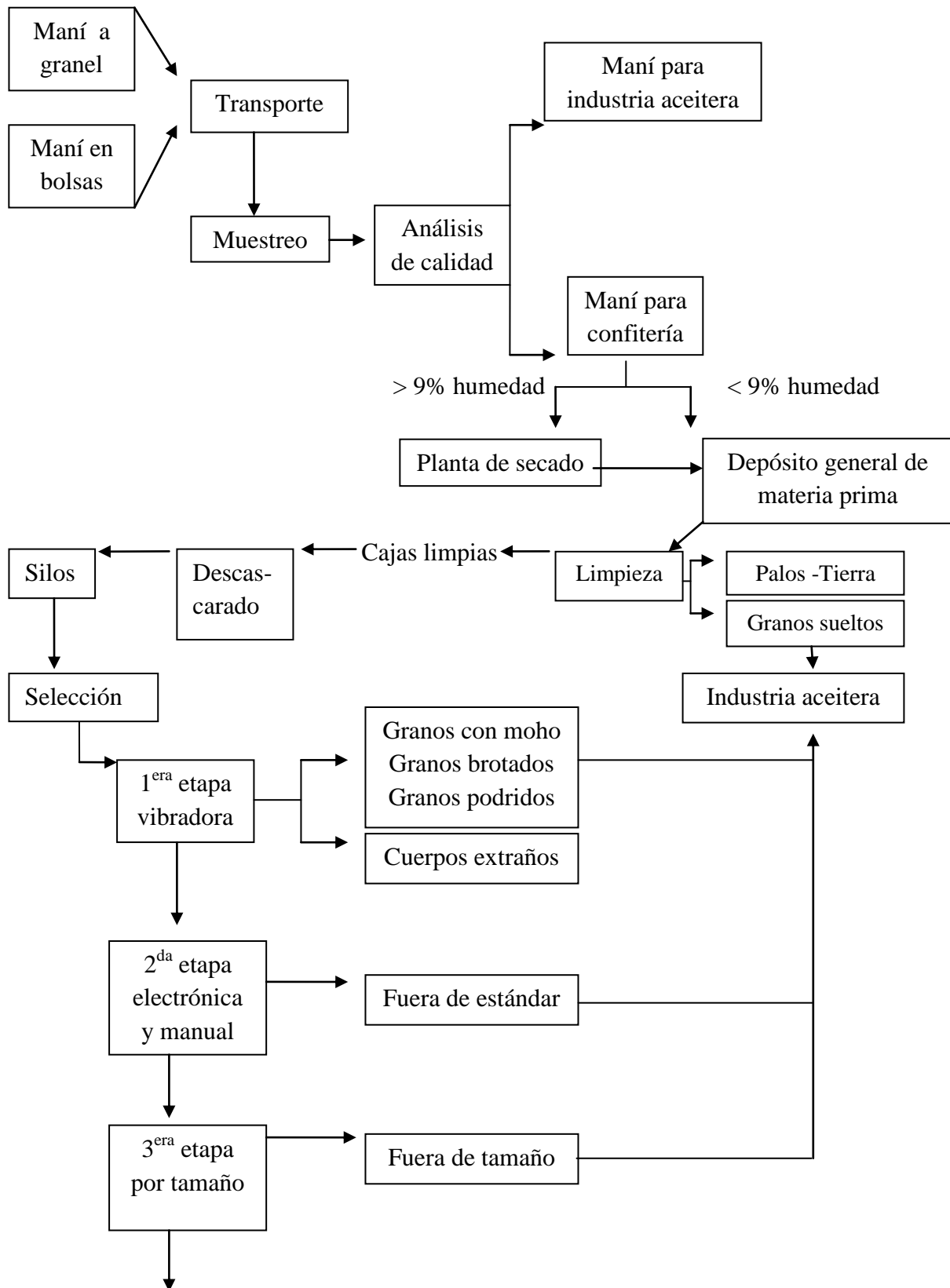
Existe otra práctica para mejorar la conservación de maní en caja y a granel, que consiste en la aplicación de productos químicos sobre el maní. Esto suprime la actividad antimicrobiana y disminuye el riesgo de deterioro.

El oreado natural puede practicarse descapotando el maní en vainas y almacenándolo en bolsones de rejillas de plástico. Estos bolsones se dejan a campo para que continúen el secado hasta reducir la humedad al 13%, aproximadamente. Luego, los bolsones se colocan debajo de tinglados con buena ventilación donde se termina el oreado. Este sistema permite lograr una gran calidad, pero es muy costoso y presenta un alto riesgo por efecto de las condiciones climáticas adversas.

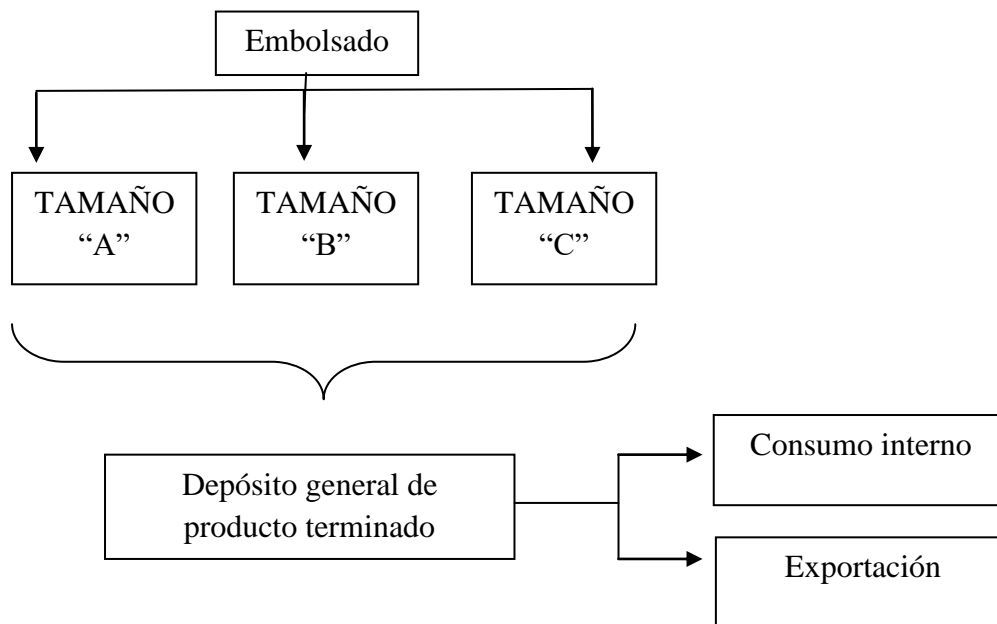
El oreado natural también se puede lograr cosechando vainas a granel y depositando la producción en silos de malla de alambre. Se debe tener cuidado de no almacenar el maní con más del 17% de humedad. Estos silos se pueden equiparar con un sistema de aireación con tubos cribosos y también se puede agregar un ventilador, facilitando el oreado y el manejo de la producción con un poco más de humedad.

El secado es una operación que debe realizarse lentamente y a bajas temperaturas, siendo el caudal de aire el principal factor durante este proceso. Para preservar el sabor natural, la temperatura del maní no debe ser mayor a 30°C (Bragachini, 1994).

### 1. I.D. FUNCIONAMIENTO DE UNA PLANTA DE MANÍ PARA CONFITERÍA







***Figura N° 6: Esquema de funcionamiento de planta de maní confitería***

El maní se comercializa en vaina, ya sea a granel o en bolsones y es transportado desde el campo en camiones.

Al ingresar a la planta, los camiones son pesados en una báscula y se extrae una muestra representativa para hacer el análisis de calidad. Si reúne los requisitos para maní confitería y la humedad es menor al 9%, se lo envía al depósito general de materias primas. En caso que la humedad sea mayor al 9%, se somete al proceso de secado en la planta. Si no reúne los requisitos para maní confitería, se destina para industria aceitera.

Según la demanda del mercado, es almacenado en el depósito general del producto terminado o bien es llevado hasta el contenedor para su exportación o consumo interno (Bragachini, 1994) (*Figura N° 6*).

## **1. I.E. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL MANÍ**

⊛ **MUESTREO:** la muestra a tomar debe ser representativa, teniendo un peso de 10kg. El **muestreo con sonda** o el **muestreo de flujo** son dos buenos métodos. El primero involucra el uso de una sonda dividida en compartimentos que se inserta en el recipiente para tomar muestras en al menos cinco lugares distintos. El muestreo de flujo se hace cuando el grano se vierte en forma de flujo durante la cosecha. Se pasa una taza debajo de la corriente del grano que cae a intervalos periódicos. Cualquiera que sea el método usado, las muestras deben ser de 300 g o 10 onzas (Bragachini, 1994).

⇒ **Entrega a granel:** para muestrear en el camión se necesitan caladores manuales o neumáticos, calando el camión en distintos puntos y a distintas profundidades de la carga.

⇒ **Entrega en bolsones:** se deben separar y abrir un número representativo de

bolsones en distintos lugares de la carga. La muestra se toma con el sacamuestra “cucharín” en el flujo de granos, al momento de abrir el bolsón (Bragachini, 1994).

✪ **CONTROL DE CALIDAD:** en el laboratorio de la planta, se procede a la homogeneización y división de la muestra original proveniente del camión, a fin de obtener muestras representativas del lote, con un peso mínimo de 1Kg cada una. Una vez descascarada la muestra, es sometida a todos los análisis de calidad y clasificadas por tamaño de acuerdo a su granometría.

Esta operación es muy importante, ya que el precio final a pagar por el maní comercializado se determinará de acuerdo al porcentaje de cada tamaño de grano que haya en la muestra (Bragachini, 1994).

✪ **HUMEDAD:** una vez finalizado el análisis de calidad, se determina el contenido de humedad. Si es menor al 9% se envía el maní al depósito de materia prima (celda); en cambio si es mayor al 9% se somete a secado y una vez seco se lo lleva a celda.

Si el maní analizado para industria de selección cumple con las tolerancias del recibo, se procede a analizarlo de acuerdo a las normas de calidad del maní tipo confitería. En el caso de no responder a los valores de calidad, es destinado a la industria aceitera.

La humedad del aire durante el secado no debe ser menor al 40%. Es importante saber que se debe detener el secado cuando la humedad del maní es del 10-11%, ya que la cáscara se seca más rápido que el grano. Después del secado, los granos continúan perdiendo humedad hasta el 9% requerido (dejándolo reposar al maní durante 24-48hs) (Bragachini, 1994) (*Tabla N° 4*).

Existen dos sistemas de secado: **secado estacionario** y **secado continuo**. En el primero, el maní se seca en tandas (lotes) ya sea en silos, acoplados o vagones. El principio de este secado se basa en que la regulación de la humedad final debe hacerse teniendo en cuenta la humedad relativa del aire, que no debe ser menor a la del equilibrio. La temperatura del aire de secado es igual a la temperatura del maní y no debe sobrepasar los 30°C.

En los acoplados secadores se produce un frente de secado, que se desplaza desde abajo hacia arriba a medida que se va secando el maní. Al final del secado, debe haber una diferencia no mayor al 2% entre la parte superior e inferior. Para este sistema, los ventiladores deben proporcionar una corriente de aire de por lo menos 0.25 m<sup>3</sup>/s por cada m<sup>2</sup> de superficie del piso del carro, a una presión estática de 1.9 cm de agua.

También es posible este secado, realizarlo en silos secadores con base cónica y un tubo central cribado que se distribuye el aire a través de las vainas de maní.

En la actualidad se está difundiendo el sistema en contenedores. Estos contenedores de doble fondo, con una capacidad de 20 TN, se trasladan a campo sobre camiones. Se llenan directamente de la cosechadora y luego van a la planta donde se colocan en las líneas de secado sin trasvasar el maní.

El secado continuo se caracteriza porque el material a secar está permanentemente en movimiento. Aquí, el maní húmedo entra a la secadora por la parte superior y sale seco por la parte inferior. El movimiento de las vainas se produce por gravedad, con mínima velocidad de circulación.

El secado se efectúa por medio de la circulación de aire caliente de flujo en contracorriente respecto al movimiento del maní. Este sistema permite usar temperatura mayor del aire, sin que el maní adquiera una temperatura mayor a los 30°C (Bragachini, 1994).

***Tabla N° 4: Índice de humedad óptima del maní para una correcta conservación***

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humedad de la semilla en vaina en madurez fisiológica.</li> </ul>	50-55%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humedad de la semilla en vaina al arrancado. (Dejar orear en el cordón 4-5 días hasta el descapotado).</li> </ul>	40-45%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humedad de la semilla para el descapotado. (Si se dispone de facilidades para el secado artificial se lo puede secar con esa humedad del 20%. Si se lo almacena en silos de malla de alambre con aireado natural, la humedad no debe ser mayor al 17% con un maní limpio y maduro. Si se lo almacena en bolsones de rejillas de plástico, se lo debe orear en el campo hasta un 13% y luego guardarlo bajo tinglado. Almacenar hasta el descascarado con buena aireación y lugar fresco).</li> </ul>	20-25%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humedad de la semilla para el descascarado (La humedad no debe ser menor al 7% porque aumentan los daños mecánicos, ni mayor al 9% porque comienza el desarrollo de hongos).</li> </ul>	8-9%
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humedad de la semilla para conservarla hasta la siembra. (La humedad ambiente relativa no debe ser mayor al 60% y la temperatura no mayor a 20°C para conservar el maní con buen poder germinativo y vigor hasta la siembra).</li> </ul>	7-8%

(Bragachini, 1994)

✪ **ANÁLISIS DE AFLATOXINAS:** la muestra de maní para laboratorio (5 kg) se transforma en una pasta homogénea o molida a malla 14, en su totalidad, homogeneizada y posteriormente dividida en un mínimo de tres partes. Podrá tomarse una cuarta submuestra para análisis de rutina. Las muestras y submuestras de maní recogidas se almacenan en envases de papel, algodón u otro material a humedad relativa máxima de 60% y temperatura máxima de 25°C.

✪ **GRANOMETRÍA:** el maní tipo confitería es clasificado en distintas categorías de acuerdo a su tamaño. Esta clasificación se hace en primer lugar sobre la muestra y posteriormente todo el maní es separado por tamaño en el proceso final de la planta.

Las categorías mencionadas se identifican en función del número de granos de maní entero, contenidos en 28.35 g (1 onza) de muestra.

La clasificación granométrica se realiza a través de zarandas cambiables, que separan los granos de distintos calibres. Por lo general, están divididas en las categorías 38-42, 40-50, 50-60 y 60-70. Es decir, que al tomar una bolsa rotulada 38-42 y pesar 28.35 g de ese material, tiene que haber entre 38 y 42 granos (Bragachini, 1994).

✪ **LIMPIEZA:** este maní, ingresado para confitería, es trasladado desde el depósito de materia prima a la sección de limpieza, donde trabaja la máquina limpiadora; la cual posee un motor de velocidad variable para modificar el flujo de alimentación; luego de pasar por el alimentador, el maní sufre una primera aspiración para evitar la formación de polvillo. Más adelante pasa a una segunda aspiración donde quita más polvillo, ramas, hojas, cajas rotas y prepara el material para la clasificación, que consiste en dividir por peso el flujo de maní en dos concentraciones: el más pesado, contiene cascotes, cuerpos extraños mezclados con granos sueltos y con granos con cáscara más pesado. Este concentrado va a una prelimpieza cerrada donde se eliminan los cascotes y cuerpos extraños; luego, el maní con cáscara y los granos van hacia el compartimento de granos sueltos, aquí los granos sueltos son separados del maní sin descascarar.

Un tercer proceso de aspiración prepara el maní para que las cribas ajustables permitan que pase a través de aberturas y que los palos largos retenidos sean arrastrados hacia afuera por una cinta plana que gira por arriba y en el sentido de avance del material, permitiendo el colado de las vainas e impidiendo el pasaje de los palos por las cribas (Bragachini, 1994).

✪ **DESCASCARADO:** es la operación que separa el grano de la vaina. La humedad óptima para el descascarado es de 9%; niveles inferiores, aumentan el porcentaje de partidos.

Las cajas limpias que salieron de la máquina de limpieza pasan a la descascaradora, que cuenta con tres cilindros primarios donde se descascara la mayor parte. A medida que el maní es descascarado, el sistema de aspiración remueve el polvillo y los fragmentos de vainas. Antes de abandonar el cilindro, el material recibe una segunda aspiración para asegurar la remoción de todas las vainas abiertas. Para evitar que se pierdan granos conjuntamente con las vainas aspiradas, existe una con una trampa para granos antes de la salida. Después de la aspiración, comienza la clasificación por tamaño (Bragachini, 1994).

- ❖ **SELECCIÓN:** consta de tres etapas, según el grado de precisión:
- 1) **Selección por vibradoras:** las máquinas vibradoras separan por diferencia de peso específico los granos sueltos y enteros de los granos con mohos, brotados, podridos y los cuerpos extraños.
  - 2) **Selección electrónica y manual:** las máquinas electrónicas policromáticas separan los granos fuera de estándar, destinándolos a la industria aceitera; hacen pasar un flujo continuo de granos a través de un “ojo electrónico”, quien emite distintos mensajes según el color del tegumento y una central electrónica hace desviar el grano que no responde al color para el cual se ha calibrado la máquina, a través de un chorro de aire instantáneo. En la selección manual, el maní es llevado por cintas transportadoras a las “mesas de picoteo”, en donde personal especializado quita los granos de rechazo que hayan escapado de procesos previos.
  - 3) **Selección por tamañadoras:** donde separan los granos de distintos calibres. Posteriormente el maní es envasado en bolsas de arpillera de 50 kg, correspondientes a su tamaño y llevado por una cinta transportadora al depósito del producto terminado, o bien hasta en contenedor para su exportación o consumo interno. Si el maní va a permanecer un tiempo prolongado en depósito, conviene mantenerlo en una temperatura de 4°C (Bragachini, 1994).

## 1. I.F. PLANTA DE ACOPIO OLAM



La empresa **OLAM Argentina S.A** se encuentra instalada en la localidad de Las Acequias, Provincia de Córdoba, a 3 Km del acceso principal al pueblo. La misma es una empresa multinacional que se encarga de la recepción, acondicionamiento

y almacenamiento de maní para luego ser comercializado en su totalidad al exterior de nuestro país. Entre sus principales compradores se encuentran: **Unión Europea, China, Rusia y EE.UU.**

El proceso y la manipulación del maní en esta empresa se realiza siguiendo las normas de calidad y comercialización de SENASA, principalmente la norma XIII.

La campaña del maní comienza entre los meses de marzo y abril y culmina entre los meses de julio y agosto aproximadamente. En este período el maní se acondiciona, se almacena, y luego al finalizar el ciclo, la producción en las condiciones de calidad correspondiente, es enviada a distintas plantas de proceso de acuerdo al tipo de mercadería que se trate, para que la misma pueda ser tratada para su posterior comercialización.

Entre las principales empresas que reciben la mercadería procesada en OLAM Argentina S.A se encuentran:

- **Cooperativa Arroyo Cabral** (Arroyo Cabral, Provincia de Córdoba): Producción de Maní Confitería.
- **Ángel Riga CIA S.A** (Despeñaderos, Provincia de Córdoba): en donde se procesa el maní tipo semilla.
- **Prodeman S.A**: Se obtiene maní blanchado.
- **Golden Peanuts** (Alejandro Roca, Provincia de Córdoba): Producción de Maní Confitería.
- **Q Peanut** (Río Segundo, Provincia de Córdoba): Se obtiene maní blanchado.

El terreno con el que se cuenta para el procesamiento es de 25 has aproximadamente, donde se realiza la recepción, acondicionamiento y almacenamiento del producto.

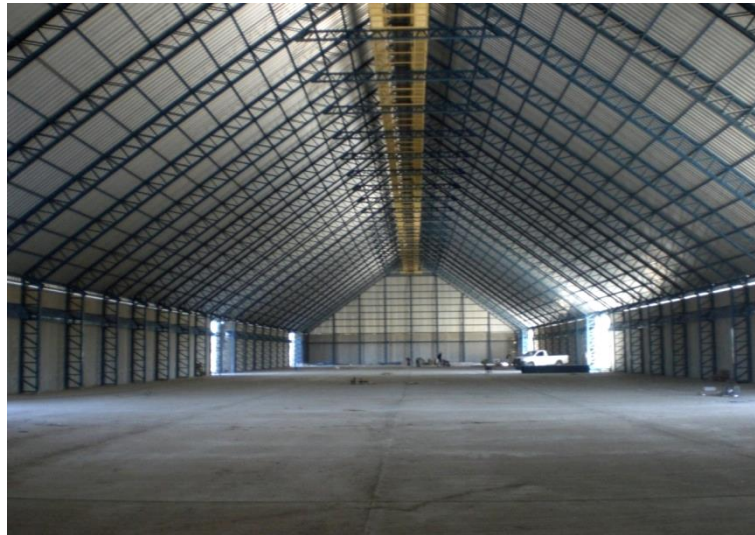
En lo que respecta a la recepción del maní, la planta cuenta con una playa de estacionamiento para los camiones que llegan cargados con la mercadería donde esperan su correspondiente turno antes de ser analizados, el personal de guardia solicita al transportista la carta de porte, asentando los datos de la misma y de la materia prima, luego pasan por un calador neumático que se encarga de tomar las muestras a analizar.

Los análisis de estas muestras para el control de calidad de materia prima se realizan en tres laboratorios montados en la planta. Los dos primeros se encargan del análisis físico de la muestra para poder calificar su calidad. El tercer laboratorio en cuestión, es el encargado de realizar el análisis de aflatoxinas.

Con estos datos se informa el rechazo o no del lote. Si el lote es aceptado, se informa el tipo de materia prima y las condiciones generales de la misma. De acuerdo a esto, se decide si necesita previo acondicionamiento (ya sea secado o prelimpieza) o si es directamente almacenada (*Figura N° 8*).

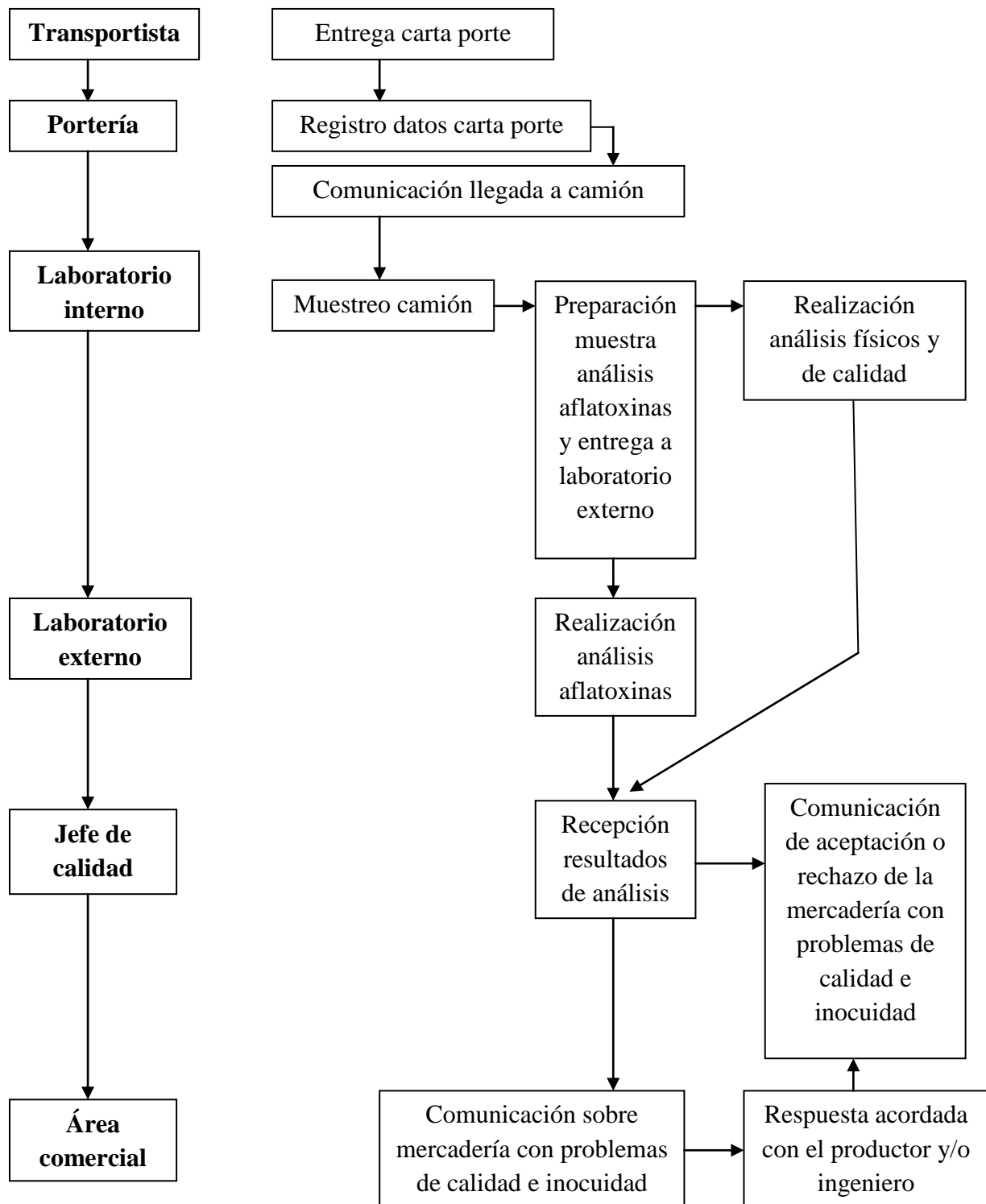
Para el almacenamiento de la producción se cuenta con una celda de 150 m x 30 m cuya capacidad es de 12.000 toneladas (*Figura N° 7*) y 15 silos australianos de 120 m x 9 m cuya capacidad es de 1000 toneladas cada uno aproximadamente, en ellos hay tanto mercadería tipo Producción así como también maní helado, maní tipo semilla pura, semilla primera multiplicación y maní con aflatoxinas.

La capacidad total de la planta es de aproximadamente 27.000 toneladas de maní en caja.



*Figura N° 7: Vista interior celda*

# 1. I.G. RECEPCIÓN DE MATERIA PRIMA EN LA PLANTA ACOPIADORA OLAM



***Figura N° 8: Esquema recepción de la materia prima en OLAM***



## 1. II. género *Aspergillus*

### 1.II.A. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El género *Aspergillus* fue descrito en 1729 por Micheli, representando una enorme familia de las especies fúngicas, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "**aspergillum**" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita) (Klich, 2002).

Los miembros de este género pertenecen a los **Hyphomycetes** (hongos imperfectos) y se caracterizan por la producción de conidióforos no septados con estipes largas de paredes gruesas y ápices hinchados llamados vesículas, las cuales son rugosas y esféricas (Pitt y Hocking, 1997). Estos conidióforos, son bien diferentes de la hifa vegetativa (Kozakiewics, 1989). A partir de la vesícula, nacen las células conidiógenas (métulas y fiálides). Las fiálides producen conidios en cadenas largas. También pueden producir esclerocios y células Hülle (Samson, 1979). Los conidios llamados esclerocios que tienen función de espora, dan resistencia en la diversidad de climas como desecación o congelamiento, o bajo condiciones de carencia de nutrientes.

*Aspergillus* es un hongo filamentoso, hialino, ubicuo y saprófito; se encuentran en cualquier parte del mundo, pudiendo crecer en una gran variedad de condiciones ambientales y sobre una gran cantidad de alimentos. Por eso, la mayoría de los productos pueden ser susceptibles de contaminación (Peterson, 2000).

El mayor impacto económico positivo de las especies del género es a nivel de la producción industrial de enzimas (amilasas) y ácidos orgánicos (ácido cítrico) producido por un número variado de ellas, así como también la producción de terapéuticos (Hara y col., 1992; van del Hondel y col., 1992; Ward y col., 1992).

Además tienen efectos beneficiosos desde el punto de vista ecológico, ya que degradan desechos de cosechas y pueden jugar distintos roles en la solubilización y reciclaje de los nutrientes del suelo (Griffin y Garren, 1976). Como patógenos de insectos, estos hongos pueden ser utilizados para limitar las poblaciones de los mismos (Wadhvani y Srivastava, 1985) y han sido considerados agentes potenciales para reemplazar insecticidas químicos (Roberts y Yendol, 1971).

Desafortunadamente el impacto benéfico de este género se encuentra balanceado por aspectos negativos. El mayor impacto en agricultura es en la degradación saprofítica de distintos cultivos antes y después de la cosecha y en la producción de metabolitos tóxicos (micotoxinas) que pueden afectar al hombre y a los animales (Rinaldi, 1983).

El hongo puede crecer desde 4 a 45°C, mientras que la toxina puede ser producida desde 11 hasta 35°C, con una temperatura óptima de 22°C y una humedad relativa de 80-90%. En general, el crecimiento fúngico ocurre en un rango más amplio de aw (1,0 a 0,80) que la producción de micotoxinas (1,0 a 0,95) (Northolt y col., 1979). La cepa más relacionada con la producción de aflatoxina es *A.flavus*, de ahí el nombre de **aflatoxina**, siguiendo en importancia *A. parasiticus*. Aunque los *Aspergillus* crecen saprofíticamente, los productos alimenticios pueden servir como sustrato, favoreciendo la presencia de este género (Etzel, 2002). *A. flavus* parece ser más agresivo que *A. parasiticus*, y es la especie dominante en distintos cultivos (Horn y col., 1994). Debido a su gran producción de enzimas extracelulares, aumenta su capacidad para usar una amplia variedad de sustratos orgánicos y mostrar una falta de especialización de huésped que le permite un

mantenimiento de sus poblaciones a través de diferentes cultivos (van den Hondel y col, 1992; st. Leger y col., 2000).

*A. flavus* puede dividirse en dos tipos de cepas: **S y L**. Las primeras se caracterizan por producir numerosos esclerocios con dimensiones menores a 400  $\mu\text{m}$  y baja tasa de esporulación; las segundas están compuestas por los llamados aislados “**típicos**” productores de esclerocios mayores a 400  $\mu\text{m}$  y un gran número de conidios (Saito y col., 1986; Cotty, 1989).

La capacidad aflatoxigénica se encuentra conservada en las cepas S de *A. flavus* y *A. parasiticus*, cepas asociadas al medio ambiente del suelo (Davis y Diener, 1983) y la producción reducida o nula están asociadas con las cepas L de *A. flavus* asociadas a partes aéreas de cultivos (Bilgrami y Sinha, 1992).

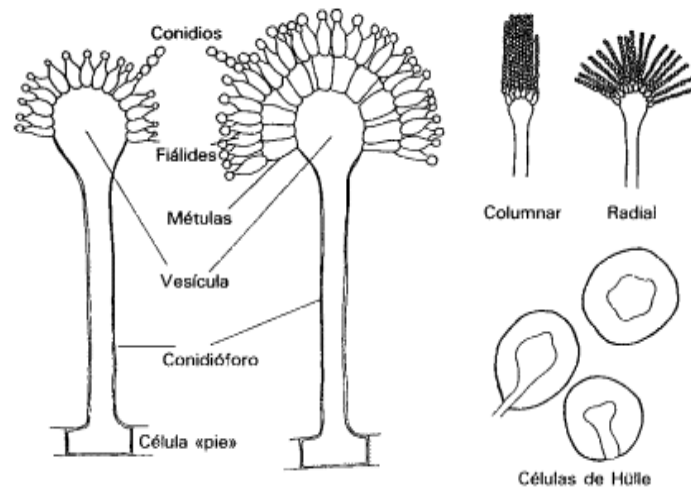
### **1.II.B. MORFOLOGÍA DE *Aspergillus***

Las especies del género *Aspergillus* se caracterizan por sus conidióforos distintivos. La base de éste, forma una “T” o “L” conectándolo con la célula vegetativa llamada célula pie. El pie se extiende desde la célula hasta expandirse en el ápice en una vesícula que puede tener distintas formas. En algunas especies, los conidios nacen de las fiálides unidas directamente a la vesícula y forman cabezas aspergilaes uniseriadas. En otras especies, hay una segunda capa de células entre la vesícula y las fiálides, llamadas métulas que forman cabezas aspergilaes biseriadas (Pitt y Hocking, 1997; Klich, 2002b).

Sus hifas están bien desarrolladas, profusamente ramificadas, son hialinas y septadas; sus células son plurinucleadas (Alexopoulos Constantine J., 1985). Todas las especies de este género tienen una característica taxonómica común: la disposición de conidios en cabezas aspergilaes y presencia de célula pie en el origen del conidióforo.

La ornamentación de los conidios resultó ser el criterio morfológico más efectivo para distinguir *A. flavus* y *A. parasiticus*, los conidios del primero son lisos a delicadamente rugosos, mientras que los del segundo son consistentemente rugosos. El perfil aflatoxicogénico es otro criterio para distinguir estas dos especies (Klich y Pitt, 1988).

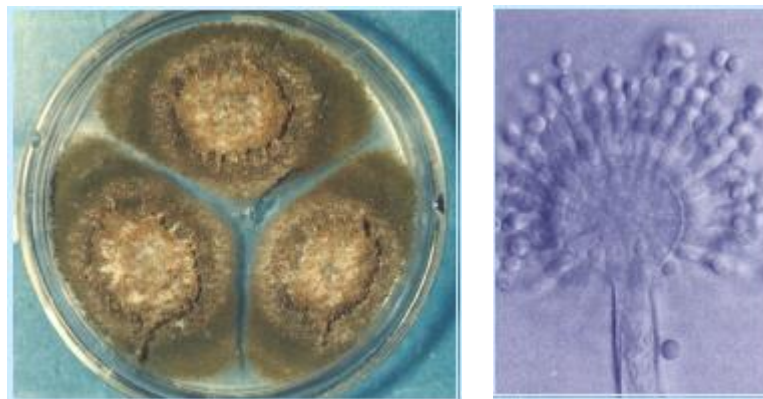
En las *Figuras N° 9, 10, 11 y 12* se observan las principales estructuras morfológicas del género *Aspergillus* y en la *Tabla N° 5* se destacan las características morfológicas más importantes.



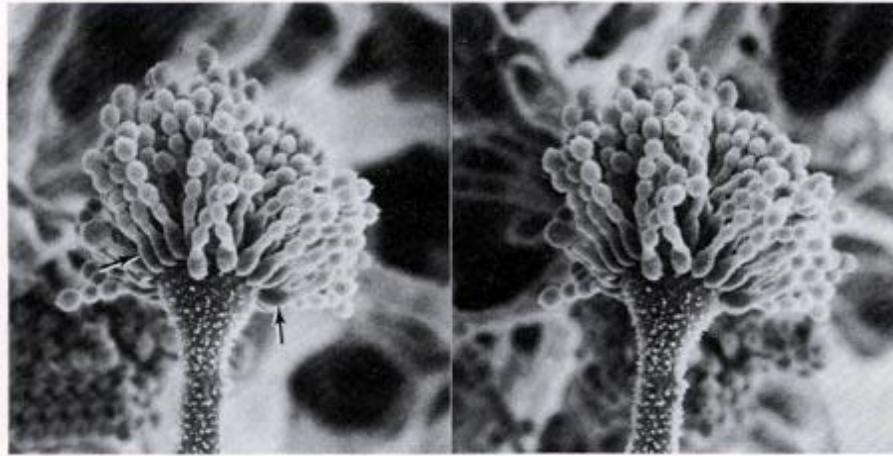
***Figura N° 9: Morfología de Aspergillus***



***Figura N° 10: Aspergillus flavus***



***Figura N° 11: Aspergillus parasiticus***



**Figura N° 12: Imágenes tomadas con microscopio electrónico de barrido, de la porción terminal de un conidióforo de *Aspergillus flavus***

**Tabla N° 5: Características morfológicas más importantes de las especies de *Aspergillus* que afectan a la especie humana**

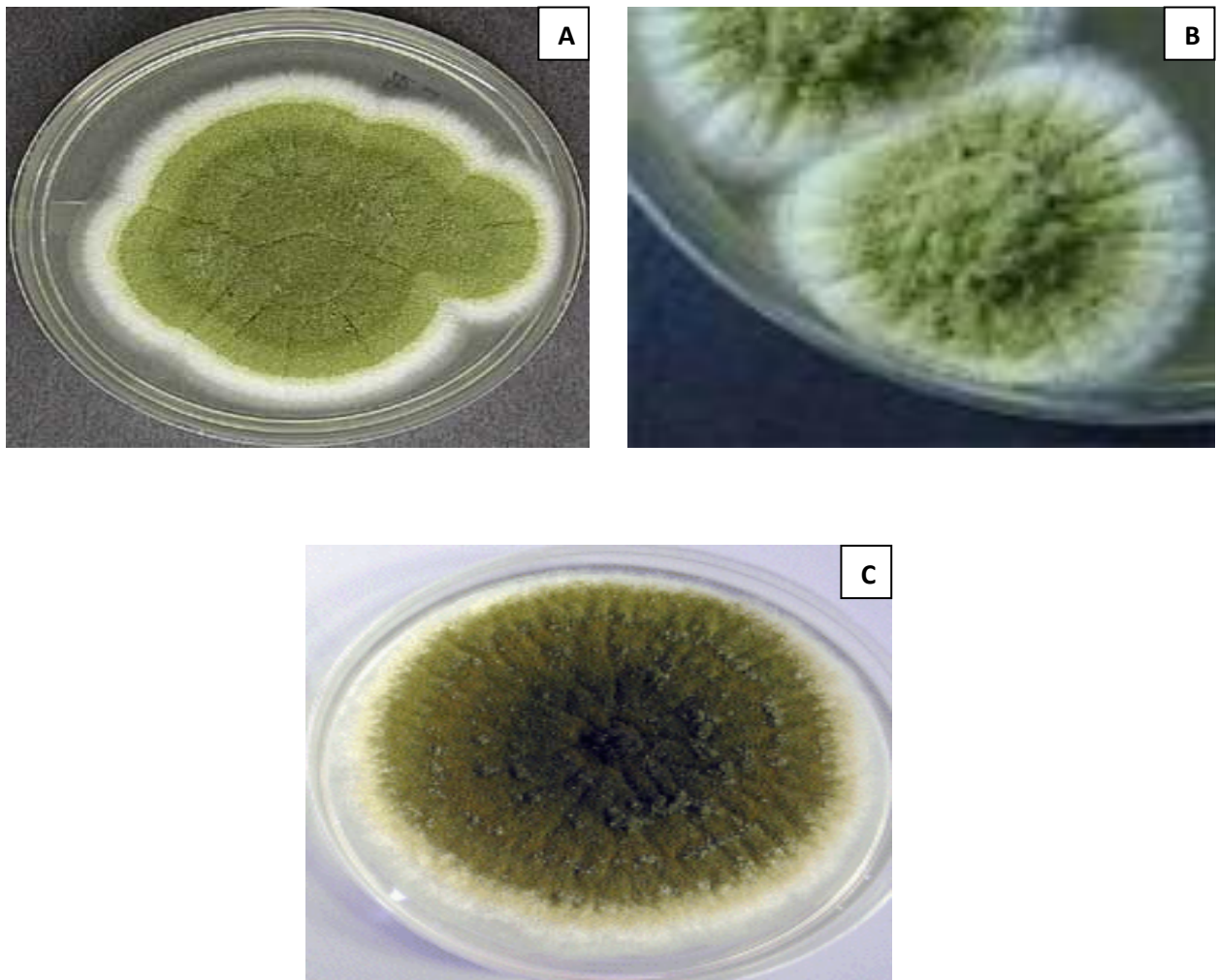
Especie	Aspecto macroscópico		Aspecto microscópico		Comentarios
	Micelio	Reverso	Conidióforo	Fiálides	
<i>A. fumigatus</i>	Aterciopelado o aspecto de polvo. Color blanquecino que cambia a verde oscuro o gris	Blanco a marrón-rojizo	Cortos (<300µm) y lisos	Uniseriadas sobre el tercio superior de la vesícula, paralelos al eje del conidióforo	
<i>A. flavus</i>	Aterciopelado. Color amarillo verdoso o marrón	Dorado a marrón-rojizo	Longitud variable y rugosos	Uniseriadas o biseriadas que cubren completamente la vesícula	
<i>A. niger</i>	Lanoso. Color blanco-amarillento que cambia a negro	Blanco amarillento	Largos y lisos	Biseriadas que cubren completamente la vesícula	
<i>A. terreus</i>	Aterciopelado. Color canela	Blanco a marrón	Cortos (<250m) y lisos	Biseriadas agrupándose en forma tubular	Aparecen células hialinas redondas en el micelio sumergido en el agar
<i>A. versicolor</i>	Aterciopelado	Color blanco que cambia a amarillo, naranja, marrón-rojizo, verde o rosa, blanco, amarillo, naranja o rojo	Largos y lisos	Biseriadas y vagamente radiadas cubriendo la mayoría de las vesículas	En ocasiones se visualizan células de Hülle
<i>A. nidulans</i>	Aterciopelado. Color verde	Púrpura oscuro	Cortos (<250µm), lisos y marrones	Biseriadas	Cleistotecios con ascosporas de color rojizo. Habitualmente se observan células de Hülle
<i>A. glaucus</i>	Color verde con zonas amarillentas	Amarillo a marrón	Longitud variable y lisos	Uniseriadas que cubren toda la vesícula	Cleistotecios frecuentemente presentes
<i>A. clavatus</i>	Color verde-azulado	Blanco que suele cambiar a marrón	Largo y liso	Uniseriadas	Gran tamaño de la vesícula (200x40 µm) y de forma alargada

Los criterios diagnósticos usados para clasificar a las secciones de *Aspergillus* se basan en características macro y microscópicas de las colonias desarrolladas en distintos medios de cultivo, como lo son:

1. Agar Extracto de Malta (AEM)
2. Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA)
3. Agar Nitrato Glicerol 25% (G25N)
4. Agar Czapek Extracto de Levadura Sacarosa 20% (CY20S)

Estos medios son incubados a 28 y/o 37°C por 7 días (Klich y Pitt, 1988; Pitt y Hocking, 1997; Klich 2002b).

Sus colonias son generalmente amarillas, verde-amarillas, amarillas-marrones, o verdes, granulares, aterciopeladas o algodonosas y tienen un satélite periférico blanco y un margen distintivo. Los colores de las colonias de *Aspergillus* dependen del color de la especie y del medio en el que el hongo crece (Alexopoulos Constantine J., 1985) (*Figuras N°13 A, B, C*).



***Figura N° 13 A, B, C: Colonias características de Aspergillus***

La producción de pigmentos en *Aspergillus* está influida por la presencia o ausencia de cantidades diminutas de los elementos traza (Alexopoulos Constantine J., 1985).

Dentro de las características macroscópicas más destacadas se encuentran:

- ⇒ **Color de la colonia:** determinado por el color de los conidios, constituye una característica en la clasificación de los subgéneros.
- ⇒ **Diámetro de las colonias:** consiste en medir el diámetro de la misma luego de los 7 días de sembrado el hongo.
- ⇒ **Color del micelio:** el micelio está compuesto por células vegetativas a partir de las cuales nacen los conidióforos. El micelio generalmente es blanco pero algunas especies producen micelios coloreados.
- ⇒ **Formación de esclerocios:** no todas las especies los producen. Son estructuras formadas por masas compactas de hifas que no tienen conidios. Poseen distintos tamaños, formas y colores; funcionan como estructuras de supervivencia que el hongo necesita para mantenerse en el suelo y contienen una gran cantidad de metabolitos tóxicos (Wicklow, 1990), los cuales son encontrados únicamente en los esclerocios, y en combinación con las aflatoxinas forman un sistema de defensa químico para la protección de los esclerocios de la predación de los insectos (Dowd, 1992; Willets y Bullock, 1992).
- ⇒ **Formación de cleistotecios:** son cuerpos fructíferos que no poseen apertura natural, se forman en las especies con estadio sexual (teleomorfo) y contienen ascos con ascosporas.

Dentro de las características microscópicas se encuentran:

- ⇒ **Conidióforos:** están compuestos por célula pie, pie y vesícula. Usualmente no son ramificados ni septados.
- ⇒ **Vesícula:** es el ápice engrosado del conidióforo. Su forma puede variar.
- ⇒ **Esterigmas:** son células conidiógenas especializadas, se desarrollan sobre el área fértil de la vesícula; pueden ser uni o biseriadas, dependiendo si tiene una o dos capas de células. Los esterigmas primarios son llamados métulas, mientras que los secundarios son llamados fiálides. En las especies uniseriadas, las fiálides son producidas de las vesículas; mientras que en las biseriadas, las fiálides surgen de las métulas.
- ⇒ **Cabeza conidial:** su color, forma y tamaño son importantes para el diagnóstico. La disposición de las fiálides sobre las vesículas determina la forma de la cabeza conidial (de columnar a radiadas).
- ⇒ **Conidios (esporas asexuales):** son estructuras reproductoras asexuales que sirven fundamentalmente para la dispersión. Pueden ser uni o multinucleadas en *Aspergillus*. Su tamaño, forma y textura son características diagnósticas.
- ⇒ **Células Hülle:** son células de paredes gruesas asociadas con los cleistotecios en algunas especies.
- ⇒ **Paredes de los cleistotecios y las ascosporas:** la textura de la pared de los cleistotecios, el color, la forma y la ornamentación de las ascosporas son las características más importantes en la determinación de las especies teleomórficas (Klich, 2002b).

### 1.II.C. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Aspergillus* Y LA SECCIÓN *Flavi*

Este género es el mejor descrito desde el punto de vista taxonómico dentro de los hongos filamentosos, debido a su importancia económica. Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*.

Antonio Micheli en 1929 dió el nombre de *Aspergillus* al estado imperfecto (anamorfo) del hongo. Luego, el estado perfecto (teleomorfo) fue descubierto para algunas especies del género, lo cual creó confusión en la taxonomía.

En 1965, Raper y Fennell subdividieron al género dentro de “grupos” basados en características morfológicas y culturales. Debido a ellos, al género se lo dividió en 18 grupos y 132 especies con 18 variedades. De estos grupos, sólo 12 se relacionan con enfermedad humana: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*.

En la nomenclatura fúngica, los micólogos han seguido el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (CINB), en donde la taxonomía anterior no se encontraba contemplada.

En 1986, Gams y col. reemplazaron al grupo dentro del género por subgrupos y secciones. Recientemente se han dividido al género en 7 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Circumdati* y *Stilbothamnium*) cada uno con una o más secciones, y se consideran más de 200 especies, algunas con estado teleomórfico conocido (Pitt y Hocking, 1997; Samson y col., 2000; Klich 2002b).

Dentro del subgénero *Circumdati* se ubica la sección *Flavi* donde históricamente están incluidas especies con cabezas conidiales de tonalidad amarilla-verdosa o marrón y esclerocios oscuros; varias de las cuales presentan importancia en la producción de micotoxinas.

Actualmente la sección *Flavi* está formada por 23 especies (Varga y col., 2004). En la *Tabla N° 6* se muestran las características morfológicas y fisiológicas que diferencian las especies más importantes.

Antes que Frisvad y Samson en el año 2000 informaron la producción de aflatoxinas por *A. ochraceoroseus* y *Emericella* SRRC 2520, todas las especies de *Aspergillus* que eran capaces de producir aflatoxinas se encontraban dentro de la sección *Flavi*. A partir del aislamiento, análisis de características morfológicas y filogenéticas y perfil toxicogénico de otras especies de *Aspergillus*, se encontraron otras especies fuera de esta sección productoras de estas toxinas (Klich y col., 2003; Frisvad y col., 2004).



**Tabla N° 6: Especies de *Aspergillus* y sus características distintivas más importantes dentro de la sección *Flavi***

<b>ESPECIES</b>							
	<i>A.flavus</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>A.nomius</i>	<i>A.tamarii</i>	<i>A.pseudotamarii</i>	<i>A.caelatus</i>	<i>A.bombycis</i>
<b>AFB</b>	+	+	+	-	+	-	+
<b>AFG</b>	+/-	+	+	-	-	-	+
<b>ACP</b>	+	-	-	+	+	-	-
<b>Color colonia</b>	Verde claro	Verde oscuro	Verde claro	Marrón oscuro	Marrón-naranja	Oliva	Verde claro
<b>Cabeza asperglar</b>	Mayormente biseriada	Mayormente uniseriada	Biseriada	Uni o biseriada	Biseriada	Uni o biseriada	Biseriada
<b>Estipes</b>	Finamente rugosas	Rugosas	Rugosas	Rugosas	Finamente rugosas	Finamente rugosas	
<b>Conidios</b>	Lisos o finamente rugosos	Rugosos	Rugosos	Rugosos	Rugosos doble pared	Rugoso	Rugosos
<b>Esclerocios</b>	+	+/-	+	-	+	+/-	-
<b>Crecimiento a 37/42°C</b>	+/escaso	+/escaso	+/escaso	+/+	+/-	+/-	+/-
<b>Hábitat</b>	Suelo, cereales, oleaginosas, especies, insectos	Suelo, maní, cereal	Suelo de soja, algodón, té	Suelo, algodón, maní, maíz	Suelo de té	Suelo de maní y té, maní	Insectos

(Horn, 1997; Samson y col., 2000; Ito y col., 2001; Peterson y col., 2001)

AFB: aflatoxina B

AFG: aflatoxina G

ACP: ácido ciclopiazónico

#### **1.II.D. REPRODUCCIÓN ASEXUAL**

Cuando es todavía joven y vigoroso, el micelio produce conidióforos en abundancia. La célula hifal que se ramifica para dar lugar al conidióforo se denomina **célula pédea** o **basal**. Los conidióforos son hifas largas y erectas, terminando cada una de ellas en una cabeza bulbosa, la **vesícula** (*Figura N° 9*).

A medida que se desarrolla la vesícula plurinucleada, se produce un gran número de células conidiógenas sobre toda su superficie, a la que recubren por completo (Alexopoulos Constantine J., 1985).

En 1945, Thom y Raper designaron los esterigmas de la primera capa como primarios y los de la capa superior como secundarios. Cuando se producen dos capas de esterigmas, los conidios surgen de los esterigmas secundarios. Las células conidiógenas, sean primarias o secundarias, son las fiálides típicos. Cuando éstos alcanzan la madurez, empiezan a formar conidios en sus ápices, uno tras otro, en cadena. Si bien, al principio son uninucleados, en muchas especies pronto se vuelven plurinucleados, por divisiones nucleares sucesivas (Alexopoulos Constantine J., 1985).

Los conidios de *Aspergillus* se forman dentro del ápice de la fiálide. Una porción del protoplasma con un núcleo existente en el ápice del esterigma queda delimitada por un septo. El protoplasto se redondea, segrega una pared dentro del fiálide tubular y se forma en un conidio. Mientras tanto, un segundo protoplasto situado debajo del primero se transforma en una espora y empuja hacia fuera la primera espora, sin que se separen, formando una cadena de esporas a medida que el protoplasma de la fiálide continúa creciendo y produce más conidios, uno debajo del otro (Alexopoulos Constantine J., 1985).

#### **1.II.E. REPRODUCCIÓN SEXUAL**

Las fases perfectas de la mayoría de las especies de *Aspergillus* no han sido descubiertas y es probable que estas especies hayan perdido su capacidad de reproducirse sexualmente.

El comportamiento sexual de distintas especies de *Aspergillus* varía de modo considerable, desde una plasmogamia aparentemente normal entre dos gametangios funcionales, hasta una ausencia completa del anteridio y el desarrollo de los ascos sólo a partir del ascogonio.

Esta reproducción tiene lugar de varias maneras y origina como mínimo cinco tipos distintos de ascocarpos (Alexopoulos Constantine J., 1985).

### 1.II.F. CICLO PARASEXUAL

Los hongos imperfectos son aquellos que no tienen un estadio sexual conocido. El género *Aspergillus* es considerado un género dentro de los hongos imperfectos.

Los organismos que se reproducen exclusivamente de manera asexual obtienen variabilidad únicamente por adaptación evolucionaría por mutación.

Pontecorvo y col. (1956) demostraron la existencia de recombinación parasexual, recombinación somática o mitótica; que consiste en:

- a) Anastomosis hifal de homocariones de distintos genotipos que resulta el micelio heterocariótico.
- b) Fusión de núcleos haploides que genera un diploide heterocigota.
- c) Entrecruzamiento mitótico ocasional durante la multiplicación de núcleos diploides.
- d) Ocasionalmente no hay disyunción, que lleva sucesivos estados aneuploides a un haploide recombinante.

Como en la recombinación meiótica, hay recombinación intracromosomal (entrecruzamiento) e intercromosomal (no disyunción); pero a diferencia de la meiosis no hay una precisa coordinación entre los procesos de fusión nuclear, entrecruzamiento y reducción del número de cromosomas (Debets, 1998).

El ciclo parasexual se ha demostrado en distintas especies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*).

### 1. III. AFLATOXINAS

#### 1.III.A. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las micotoxinas, son metabolitos fúngicos secundarios producidos por ciertas cepas de hongos. Al tratarse de metabolitos secundarios, no tienen una función directa en el metabolismo vital fisiológico del moho sino parecen ser un factor de defensa para un medio hostil; su producción está asociada con un estado de estrés o un cambio morfogénico en el crecimiento del hongo (Moss y Ramanatha, 1995). El metabolismo secundario involucra procesos biosintéticos cuyos productos finales no son esenciales para el organismo productor; y están restringidos a especies particulares; mientras que el metabolismo primario es la suma de reacciones químicas que proveen al organismo energía, productos intermediarios y macromoléculas claves, como proteínas y ADN (Moss, 1996).

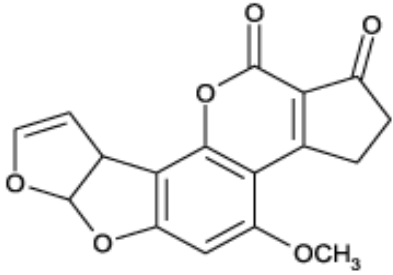
Una gran variedad de hongos filamentosos son capaces de producir micotoxinas, sin embargo los tres géneros más importantes son: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Sidhu, 2002).

En altas concentraciones, las micotoxinas pueden producir síndromes agudos de enfermedad, en tanto que a niveles bajos son carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos. Afectan, entre otros órganos y sistemas blanco: al hígado, el riñón, el sistema nervioso, endocrino e inmune.

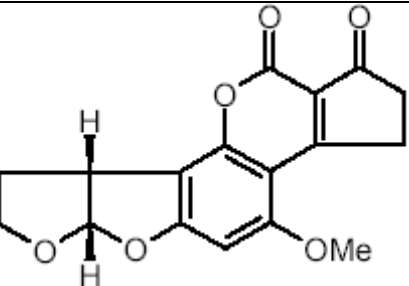
Las aflatoxinas son conocidas desde 1960 cuando en Inglaterra se presentó una epidemia que mató alrededor de 100.000 pavos. Murieron de una enfermedad “enfermedad X del pavo”; las aves estaban letárgicas, con poco apetito y morían en una semana. El examen de las aves muertas reveló un agrandamiento de los riñones y tejido necrótico (muerto) del hígado. Se descubrió que la causa de esta enfermedad eran toxinas en un cargamento mohoso de harina de maní de Brasil, siendo el hongo de interés *A. flavus* (Lancaster y col, 1961; Sargeant y col., 1961).

Las aflatoxinas más comunes en maní son: **B1, B2, G1, G2** (*Figura N° 14 A, B, C, D*), su importancia radica en los efectos tóxicos, causando toxicidad por ingestión de productos contaminados. La AFB1 es la más común y la de mayor toxicidad (Bragachini, 1994). La correlación positiva entre el consumo de alimentos contaminados con AFB1 y el aumento de la incidencia del cáncer de hígado, ha llevado a la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer a clasificar a la AFB1 como carcinógeno del grupo 1 A (IARC, 1993).

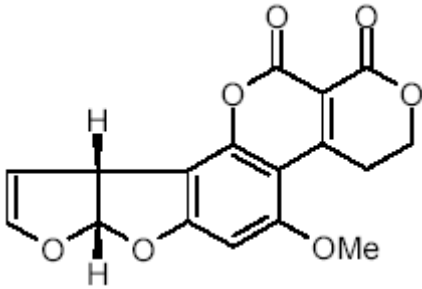
## A) AFLATOXINA B1

<b>Abreviatura</b>	AFB1
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
<b>Estructura</b>	 The chemical structure of Aflatoxin B1 consists of a central benzene ring with a methoxy group (-OCH <sub>3</sub> ) at the 10-position. It is substituted at the 2-position with a difuran ring system and at the 3-position with a difuran ring system that includes a lactone ring fused to a five-membered ring with a ketone group.
<b>Fuente</b>	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>
<b>Descripción</b>	AFB1 es una potente micotoxina hepatotóxica y hepatocarcinogénica, además es mutagénica, teratogénica y causa inmunosupresión en animales
<b>Peso molecular</b>	312.3
<b>Solubilidad</b>	DCM, DMSO o Metanol
<b>Advertencia</b>	Tóxica, cancerígena
<b>Almacenamiento</b>	+4°C
<b>Pureza</b>	Menor al 97% por TLC

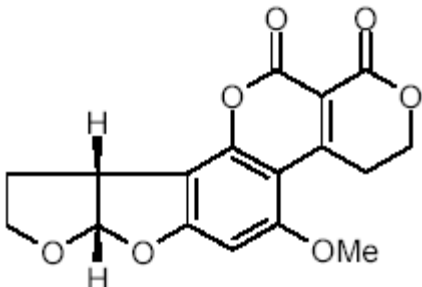
## B) AFLATOXINA B2

<b>Abreviatura</b>	AFB2
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
<b>Estructura</b>	 The chemical structure of Aflatoxin B2 is similar to Aflatoxin B1 but features a dihydrofuran ring system at the 8,9-positions instead of a difuran system. It has a methoxy group (-OMe) at the 10-position and a difuran ring system with a lactone ring at the 3-position.
<b>Fuente</b>	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus parasiticus</i>
<b>Descripción</b>	8,9-dihidroderivado de la AFB1. Una potente micotoxina hepatotóxica y hepatocarcinogénica
<b>Peso molecular</b>	312.3
<b>Solubilidad</b>	DMSO o MeOH
<b>Advertencia</b>	Tóxica, cancerígena
<b>Almacenamiento</b>	-20°C
<b>Pureza</b>	Menor al 98% por TLC

## C) AFLATOXINA G1

<b>Abreviatura</b>	AFG1
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{17}H_{12}O_7$
<b>Estructura</b>	
<b>Fuente</b>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<b>Descripción</b>	Una potente micotoxina hepatotóxica y hepatocarcinogénica
<b>Peso molecular</b>	328.3
<b>Solubilidad</b>	DMSO O Metanol
<b>Advertencia</b>	Tóxica
<b>Almacenamiento</b>	+4°C
<b>Pureza</b>	Menor al 98% por TLC

## D) AFLATOXINA G2

<b>Abreviatura</b>	AFG2
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{17}H_{14}O_7$
<b>Estructura</b>	
<b>Fuente</b>	<i>Aspergillus parasiticus</i>
<b>Descripción</b>	9,10-dihidro derivado de la AFG1. Una potente micotoxina hepatotóxica y hepatocarcinogénica
<b>Peso molecular</b>	330.3
<b>Solubilidad</b>	DMSO o Metanol
<b>Advertencia</b>	Tóxica, cancerígena
<b>Almacenamiento</b>	+4°C
<b>Pureza</b>	Menor al 98% por TLC

(Buchi y Rae, 1969)

Figura N° 14: Tipos de aflatoxinas

Las aflatoxinas B y G emiten luz ultravioleta de longitud de onda larga, con la cual pueden ser observadas con una lámpara fluorescente, produciendo la luz azul o verde, de donde toman el nombre de B (blue) y G (green) según el caso.

Los subíndices 1 y 2 se refieren a los patrones de movilidad (Rf) de los compuestos sobre cromatografía de capa delgada (TLC). Estos tóxicos son inestables a la luz y al aire; son solubles en solventes polares (cloroformo, metanol, acetona) e insolubles en agua y en solventes no polares como hexano y éter de petróleo (Frobish y col., 1986).

Las aflatoxinas B1 y B2 son producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus*. La G1 y G2 son producidas por *A. parasiticus* (Egel y col., 1994).

Otros miembros del grupo, son derivados de las cuatro aflatoxinas mayores y se producen como consecuencia de la actividad metabólica de sistemas enzimáticos animales o microbianos; entre los cuales se encuentran **aflatoxicol, aflatoxina P1 y Q1** (Dutton y Heathcote, 1966).

La estructura química de las aflatoxinas son difuranocumarinas, las del grupo B son difuranocumarinas fusionadas a una ciclopentona y las G están unidas a la lactona. Las aflatoxinas B1 y B2 difieren entre ellas por la presencia de un doble enlace más en la primera. Las G1 y G2 difieren entre sí en el mismo detalle estructural. Las aflatoxinas B difieren de las G porque el anillo de furano de las primeras se convierte en un anillo de lactona en las segundas. Esta transformación es fácil de realizar en el laboratorio, por tratamiento con ácido.

Las vacas que se alimentan con pienso contaminado por aflatoxinas B son capaces de metabolizar las aflatoxinas, hidroxilándolas en una posición determinada. Así, a partir de la aflatoxina B1 se forma la aflatoxina M1, y a partir de la aflatoxina B2, se forma la M2 (Cathey y col., 1994).

El grado de toxicidad y carcinogenicidad de las aflatoxinas sigue el orden siguiente:

<b>B1&gt;G1&gt;B2&gt;G2</b>
-----------------------------

Las aflatoxinas resisten los tratamientos habituales de los alimentos. Solamente el tostado de los frutos secos las destruye en una pequeña parte. Para eliminarlas son necesarios tratamientos muy drásticos, con amonio o hipoclorito, no utilizables en alimentos para uso humano e incluso ni con materiales para piensos (INTA, 2004).

La función que cumplen las aflatoxinas es tema de debate (Demain y Fang, 2000). Las principales hipótesis son:

1. Su producción es un mecanismo de remoción del exceso de acetato cuando el hongo crece sobre fuentes ricas de Carbono (Bu Lock, 1965).
2. Es un mecanismo de protección fúngica contra otros microorganismos del suelo o contra insectos predadores (Drummond y Pinnock, 1990).
3. Tiene efecto en la promoción del desarrollo de conidios y esclerocios (Chang y col., 2001).

A diferencia de las micotoxinas, las aflatoxinas no son fitopatógenas y no actúan como factor de virulencia (Hasan, 2001).

### 1.III.B. SÍNTESIS DE LAS AFLATOXINAS

La síntesis de aflatoxinas se relaciona con la condensación de un Acetil CoA que reacciona con tres o más grupos malonatos produciendo malonil CoA, que junto con más Acetil CoA van a formar un compuesto policetónico, luego sufriendo ciclización y aromatización para formar antrona y su compuesto oxidado que es el ácido norsolorínico; después de otras series de reacciones puede dar formación a las aflatoxinas (Bennett y col. 1979).

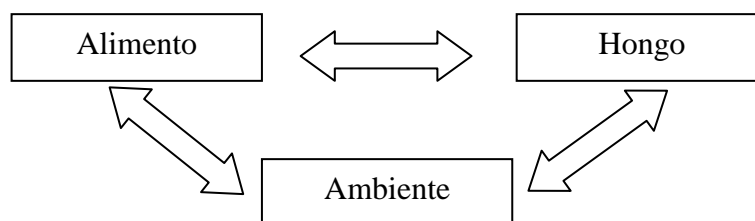
Es una vía que involucra varias reacciones enzimáticas con varios intermediarios estructuralmente bien definidos (Townsend, 1997; Payne y Brown, 1998; Bratnagar y col., 2003). El esquema general para dicha biosíntesis es el siguiente: **1- precursor policétido, 2- ácido norsolorínico, 3- averantina, 4- hidroxiaverantina, 5- averufanina, 6- averufina, 7- hidroxiversicolorona, 8- versicoloron hemiacetal, acetato, 9- versicolorin B, 10- versicolorin A, 11- dimetilesterigmatocistina, 12- esterigmatocistina, 13- O-metilesterigmatocistina, 14- aflatoxina B1**. Se ha establecido un punto de ramificación en la vía desde versicolorin B, originando las formas estructurales B1 y B2 (Bhatnagar y col., 1992; Yu y col., 2004).

El análisis genético de la biosíntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus*, ha llevado al clonado de 25 genes responsables de dicha producción que se encuentran agrupados dentro de una región de 70 Kb de ADN (Bhatnagar y col., 1992; Yu y col., 1995).

Se conocen dos genes involucrados en la regulación de la biosíntesis: el gen **afl R** que es un activador transcripcional (gen regulatorio +) que codifica para una proteína de unión al ADN (**afl R**) necesaria para la transcripción de todos los genes estructurales de la vía (Ehrlich y col., 1999); y el gen **afl S** que se encuentra adyacente al gen anterior. El mecanismo exacto por el cual **afl S** modula la transcripción junto a **afl R** no se conoce con exactitud. Se sabe que la mutación de dicho gen conduce a la reducción de 5 a 20 veces la expresión de al menos 4 genes de la vía y la pérdida de la capacidad de sintetizar varios intermediarios de las aflatoxinas (Meyers y col., 1998; Yu y col., 2004).

### 1.III.C. FACTORES QUE FAVORECEN EL CRECIMIENTO DE ESTOS HONGOS Y LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS

La producción de las micotoxinas depende de la interacción de tres agentes:



Los factores que afectan la producción son de tipos: físicos, nutricionales y biológicos. Los primeros involucran: temperatura, pH, humedad, luz, aireación, niveles de gases atmosféricos (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>). La temperatura óptima para la producción de aflatoxinas depende del sustrato, pero en general se encuentra entre 25-30°C (Maggon y col., 1977). El período de incubación para la



máxima producción es de 15 días a 20°C, u 11 días a 30°C (Diener y Davis, 1966). Su capacidad de crecer a 37°C, le confiere capacidad para afectar al humano. En cuanto a los gases atmosféricos, el oxígeno es necesario debido a que el crecimiento del hongo y la síntesis de micotoxinas ocurren en aerobiosis. Por el contrario, el aumento de la tensión de CO<sub>2</sub> inhibe la producción (Landers y col., 1967). En cuanto al pH: mayores niveles de aflatoxinas son obtenidos en medios ácidos.

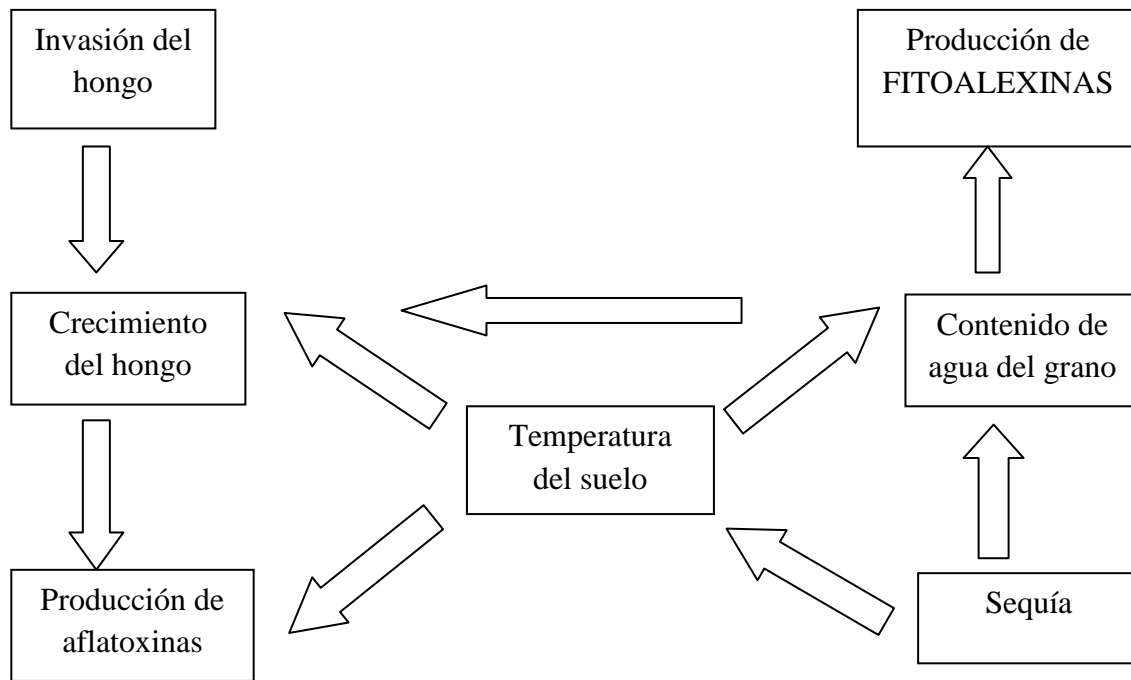
En 1975, Buchanan y Ayres manifestaron que a pH menor a 6 se favorece la producción de AFB1 y AFB2; mientras que a pH mayor a 6 se favorece la producción de AFG1 y AFG2.

Con respecto a los factores nutricionales, los sustratos naturales o medios de cultivo ejercen un fuerte efecto sobre la producción de aflatoxinas. Los sustratos ricos en hidratos de carbono como los cereales son más susceptibles a la contaminación (Jarvis, 1971).

En cuanto a los factores biológicos como las interacciones microbianas, pueden influenciar ya que los niveles de toxinas producidos son diferentes en cultivos puros y mixtos. La microflora competente (*A.niger*, *Rizhopus oligosporus* y *Neurospora spp.*) pueden inhibir la producción de aflatoxinas (Gourama y Bullerman, 1995). Además existen interacciones entre las especies productoras de aflatoxinas principalmente entre *A. flavus* y *A. parasiticus* cuando ambos ocurren en la naturaleza. El cultivo puro de *A. parasiticus* típicamente produce cantidades similares de AFB1 y AFG1, pero la presencia de *A. flavus* decrece la producción de AFG1 y AFG2 por *A. parasiticus* (Wilson, 1995).

En 1991, Pitt y col. demostraron que las plantas jóvenes eran más frecuentemente invadidas en las partes debajo o inmediatamente adyacentes al suelo. (ej. vaina, raíz, tallos) que en las partes distales (ej. flores, pecíolos, hojas).

Actualmente se considera que la contaminación previa al arrancado es la fuente más importante de contaminación y no durante el hilerado ya que estos dos hongos no compiten bien en el campo en condiciones de baja temperaturas y elevada humedad (Bragachini, 1994).



**Figura N° 15: Interacción de los factores que influyen la contaminación Precosecha del maní con aflatoxinas**

El mecanismo natural de resistencia de los granos de maní a la contaminación con aflatoxinas es la producción de **fitoalexinas**, la cual decae en condiciones de sequía (Bragachini, 1994) (Figura N° 15).

Si el grano se encuentra en un ambiente de alta humedad produce suficiente cantidad de fitoalexinas para inhibir el crecimiento del hongo y en consecuencia la contaminación. Cuando el cultivo de maní está sufriendo una sequía, aumenta la temperatura del suelo debido a la menor área foliar de las plantas y al impacto del sol directamente sobre el suelo. Como resultado, disminuye la aw en los granos favoreciendo el crecimiento de *A. flavus* y la producción de aflatoxinas.

Las fitoalexinas proporcionan al suelo donde crece maní un grado de resistencia a la contaminación con la toxina, inhibiendo el crecimiento del hongo. Bajo condiciones para la contaminación con aflatoxinas, con sequías prolongadas al final del ciclo del cultivo, la biosíntesis de fitoalexinas se interrumpe por la deshidratación de la semilla. Sin embargo la humedad de la semilla es suficiente como para permitir el crecimiento de *A. flavus* y la formación de aflatoxinas.

La resistencia al deterioro causado varía de una variedad a otra. El origen de estos mecanismos de resistencia puede ser de acción química-fisiológica o física. Los de naturaleza química-fisiológica son las fitoalexinas; el otro mecanismo de resistencia es la contextura física de la vaina y/o del grano. En el caso de las vainas está relacionada con la concentración de ligninas y otros compuestos que le dan mayor resistencia mecánica e impiden la penetración del hongo y sufren en menor proporción el daño mecánico y climático. Estos dos sistemas de resistencia son los de origen genético y no todas las variedades lo poseen (Bragachini, 1994).

### **1.III.D. NIVELES DE AFLATOXINAS PERMITIDOS**

Diferentes entidades han tratado de regular la máxima cantidad de aflatoxina permitida en los alimentos, donde cada país ha regulado su propia normalización. El establecimiento de límites regulatorios varía de un país a otro, dependiendo de la exposición, factores políticos, sociales y económicos. Debido al incremento en la exportación de productos alimenticios se hace necesario establecer límites regulatorios nacionales e internacionales. Actualmente, 90 países poseen regulación o propuestas sobre límites de micotoxinas en sus alimentos, 77 países tienen algunas regulaciones, mientras que 132 no poseen ninguna reglamentación vigente (FAO, 1997).

Los lotes rechazados se consideran aquellos que tienen más de 2 ppb de AFB1 y 4 ppb de aflatoxinas totales (Commission of the European Communities, 2006).

### **1.III.E. BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO PARA DISMINUIR EL RIESGO DE AFLATOXINAS EN EL CULTIVO DE MANÍ**

El objetivo es obtener un maní seco, sano, limpio, sin contaminantes químicos, libre de aflatoxinas y por sobre todas las cosas con el destacado sabor que lo caracteriza, para que los consumidores de todo el mundo lo prefieran sobre otros en el mercado internacional.

La presencia de aflatoxinas es el parámetro de calidad más importante y que mayor problema ha tenido últimamente.

En Córdoba y en otoño normalmente no se dan las condiciones ambientales naturales favorables para el crecimiento de los hongos y producción de toxinas. Es decir, que cuando se encuentran las aflatoxinas en maní, generalmente, éstas son el resultado de un mal manejo de alguna técnica durante el ciclo de producción. Además, este problema también puede estar asociado a condiciones climáticas desfavorables.

Las malas prácticas que ocurren durante el desarrollo del cultivo, cosecha y postcosecha debilitan al grano de maní y pueden crear artificialmente un microclima óptimo para la reproducción del hongo y la formación de micotoxinas (Griffin y Garren, 1976).

#### **❖ 1.III.E.1 BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO DURANTE EL DESARROLLO DEL CULTIVO**

- ✓ Una adecuada rotación y una labranza reducida favorecen el aprovechamiento del agua de lluvia que, sumado al uso de semillas de alta calidad, permite obtener un cultivo sano y vigoroso. Una rotación de un año de maní cada tres años de gramíneas o pasturas en el mismo lote, reduce la proliferación de estos hongos.
- ✓ El riego es muy útil ya que aumentan los rendimientos, tamaño y la uniformidad de los granos y disminuye la susceptibilidad al ataque de *A. flavus*.
- ✓ Preparar la cama de siembra para el nuevo cultivo destruyendo o eliminando las cabezas o frutos de semillas de cultivos susceptibles de acumular aflatoxinas.

- ✓ Realizar en lo posible el análisis del terreno para determinar el grado de fertilización que se requiere y aplicar fertilizantes y acondicionadores del terreno para asegurar que el suelo tenga un pH y nutrientes de plantas adecuados para evitar situaciones de carencia a las plantas.
- ✓ Utilizar variedades de semillas producidas para resistir a la contaminación fúngica.
- ✓ En la medida que sea posible, sembrar y recoger los cultivos en épocas en que pueda evitarse toda situación de elevadas temperaturas y sequía durante el período de formación/maduración de la semilla.
- ✓ Aplicar buenas prácticas agronómicas (Bragachini, 1994).
- ✓ Un buen control de viruela y malezas disminuye el riesgo de estrés. Además es muy importante el control de insectos de suelos ya que las vainas perforadas permiten la fácil penetración del hongo. El manejo integrado de plagas contribuye a producir frutos de buena sanidad y madurez (Lynch y Wilson, 1991).
- ✓ Resistencia genética: la solución más deseable para la contaminación podría ser el desarrollo de cultivos resistentes; sin embargo la resistencia es dificultosa ya que los hongos involucrados no son patógenos verdaderos sino saprófitos o parásitos facultativos (Diener y col., 1982).
- ✓ Control biológico: esta tecnología utiliza el concepto de exclusión competitiva por la adición de cepas no toxicogénicas al suelo para que compitan con su contraparte toxicogénica. El mejor agente biocompetitivo son las cepas no toxicogénicas de *A. flavus* por distintos motivos:
  - ⇒ *A. flavus* aparece como más agresivo que *A. parasiticus*.
  - ⇒ Pueden adaptarse a idénticas condiciones medioambientales inductivas que las cepas productoras de aflatoxinas (Cotty, 1992).
  - ⇒ Son biológicamente activas en el mismo momento que las toxicogénicas compitiendo por el sitio de infección (Cotty y col., 1994).
  - ⇒ Compiten con la microflora residente por los recursos asociados al cultivo (Cole y Cotty, 1990; Cotty y col., 1990).

Cuando durante la etapa de llenado de grano el cultivo sufre algún tipo de estrés hídrico, por más de 20 días y con una temperatura del suelo de 25-30°C, se predispone al maní al ataque de *A. flavus* (Sanders y col., 1985). En estas condiciones el nivel de hidratación de los granos disminuye significativamente provocando el debilitamiento y permitiendo que el hongo los infecte con la posterior producción de aflatoxinas. El período crítico es de 3 a 4 semanas previas al arrancado (Bragachini, 1994).

### ❖ 1.III.E.2 BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO DURANTE LA COSECHA

#### • ARRANCADO

- ✓ El control de malezas antes del arrancado es muy importante ya que al entremezclarse con el cordón de maní, se dificulta la limpieza y oreado, favoreciendo el crecimiento de los hongos sobre las vinas.

- ✓ Los granos inmaduros o pasados de madurez son más susceptibles al ataque de estos hongos, por esto es necesario arrancar el maní en el momento adecuado de madurez.
- ✓ Se debe arrancar con la humedad correcta del suelo y regular adecuadamente la arrancadora invertidora para no arrastrar tierra al cordón de maní. El arrancado-invertido es la técnica que ha permitido prácticamente eliminar la ocurrencia de aflatoxinas en la hilera, ya que las vainas quedan expuestas al aire libre. De esta forma, el cordón de maní se orea rápidamente y uniformemente, evitando la proliferación de *Aspergillus* (Bragachini, 1994).

- **DESCAPOTADO**

- ✓ Es necesario retirar el maní cuanto antes del campo. El oreado inicial del maní en la hilera debe hacerse lo más rápido posible ya que el hongo crece rápidamente y necesita sólo unas pocas horas para producir la toxina, especialmente cuando el grano tiene un alto contenido de humedad y la temperatura es superior a los 25°C. El descapotado óptimo se logra cuando el maní tiene entre el 18 y 22% de humedad, para lo cual se necesita el complemento del secado artificial. Durante la cosecha, a medida que se seca el grano de maní por debajo del 16% de humedad, se aumenta el riesgo de producir daño mecánico sobre las vainas. El uso de cosechadoras equipadas con el sistema multicilíndrico de dientes flexibles permite un descapotado progresivo y operándolas correctamente evitan el daño mecánico sobre las vainas.
- ✓ Una buena regulación de las máquinas cosechadoras evita la recolección excesiva de impurezas que favorecen el desarrollo del hongo y de sus toxinas.
- ✓ Es importante limpiar bien las cosechadoras y equipos antes y después de operarlos para eliminar los restos de cosechas porque constituyen una fuente de contaminación de aflatoxinas (Bragachini, 1994).

### ❖ 1.III.E.3 BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO DURANTE LA POSTCOSECHA

- **SECADO ARTIFICIAL.**

- ✓ El maní se arranca aproximadamente con un 45% de humedad. Luego, se lo deja orear hasta lograr un 18-22% de humedad. Como se lo debe retirar cuanto antes del campo, es necesario secarlo artificialmente. El secado artificial se puede realizar mediante carros secadores, silos secadores y secadoras de sistemas continuos. Es necesario efectuar un secado adecuado, no calentándolo por encima de los 30°C, no secar a una velocidad de extracción de humedad superior al 0.5% por hora y terminar la operación obteniendo un maní con una humedad no superior al 9%. Cualquier alteración en estos valores, deteriora los granos en su sabor y textura física.
- ✓ Antes de secar el maní, se debe practicar una prelimpieza para eliminar tierra, palos, restos de hojas y granos sueltos. Además de disminuir los costos, esta operación

permite mejorar las condiciones de maní para la toma de muestra y disminuye la variabilidad de los análisis.

- ✓ Se deben limpiar los camiones que se usan para transportar al maní en granel y tener cuidado en las bocas de descarga que quedan sucias y se constituyen en importantes focos de contaminación de aflatoxinas (Bragachini, 1994).

## • ALMACENAMIENTO DEL MANÍ

- ✓ Los principios de almacenamiento requieren sanidad y limpieza de las instalaciones y un buen control de la ventilación. Además la base de una buena conservación es almacenar el maní sin daño mecánico, seco, sano, limpio, libre de insectos y otros contaminantes. Durante esta etapa de almacenamiento primario, hasta su entrega o procesado, puede ocurrir el deterioro del maní en vainas y el desarrollo de aflatoxinas si no se cumplen ciertos requisitos. El primer requisito radica en limpiar el maní que se almacena, el segundo es almacenar el maní sin daño mecánico y seco, con un máximo de humedad del 9% del grano y por último, controlar el ambiente donde se coloca el maní durante ese almacenamiento temporario (*Tabla N° 7*).

Además de la prelimpieza a campo, se debe practicar otra prelimpieza de recibo en planta antes de secarlo artificialmente o de guardarlo a granel en celdas o galpones.

Actualmente estas impurezas constituyen el mayor riesgo para el desarrollo de aflatoxinas y para la generación de incendio, ya que en ellas se concentra la mayor cantidad de humedad y además, por mayor peso, se acumulan en la base de la celda.

La contaminación se puede producir por la falta de limpieza y/o por el almacenamiento de maní húmedo, pero también puede ser efecto de la condensación de la humedad en los estratos superiores de las estibas, silos cuando son tapados herméticamente con lonas impermeables.

Esta condensación ocurre porque el maní húmedo, aún con el 9%, y expuesto durante algunos días de sol en el invierno alcanza a evaporar algo de humedad que se concentra en la parte superior de la lona. Luego, durante la noche, la temperatura disminuye y esa pequeña cantidad de vapor de agua se condensa y precipita sobre las bolsas superiores, dando el ambiente adecuado para el desarrollo de aflatoxinas. Para esto es muy importante ventilar las estibas quitando las lonas periódicamente o montar algún sistema de ventilación.

- ✓ Impedir la infestación por insectos mediante el uso de apropiados insecticidas aprobados.
- ✓ Asegurarse de que las instalaciones estén exentas de insectos y mohos, mediante un buen mantenimiento o el uso de apropiados fumigantes aprobados.
- ✓ Impedir el acceso de roedores y aves.
- ✓ Existen productos que suprimen la actividad microbiana y en consecuencia reducen el riesgo de aflatoxinas. Sustancias como el amoníaco en una concentración del 5% suprime totalmente la flora fúngica, de la misma forma actúan los productos formulados a base de ácido propiónico (Bragachini, 1994).

***Tabla N° 7: Humedad para una adecuada conservación***

	<b>Para una conservación a corto plazo (valores máximos)</b>	<b>Para una conservación a mediano plazo (valores máximos)</b>
<b>Humedad del grano</b>	8%	8%
<b>Humedad relativa del ambiente</b>	70%	60%
<b>Temperatura ambiente</b>	20°C	5°C

#### ❖ 1.III.E.4 **BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN (BPF)**

##### • **RECEPCIÓN Y DESCASCARADO**

- ✓ El comprador de maní para una planta de descascarado, ya sea que realice la compra desde la planta o desde un punto de compra exterior, debe inspeccionar la calidad del maní que se le ofrece y asesorar a los proveedores sobre la forma de suprimir las prácticas inadecuadas. Los compradores deben alentar a los proveedores de existencias de maní del agricultor a que apliquen las siguientes buenas prácticas de producción.
- ✓ Las existencias de maní del agricultor que se reciben en la planta de descascarado deben inspeccionarse a su llegada. Es aconsejable conocer el origen e historial de cada lote de maní. Hay que examinar el vehículo de transporte; si no es completamente cerrado, debe disponer de una cubierta, como una lona alquitranada, para proteger el producto de la lluvia o de otras fuentes de humedad. Durante la descarga, debe observarse el aspecto general del maní. Si se puede percibir la humedad del maní al tacto, NO debe mezclarse con el maní almacenado sin envasar. El vehículo que contiene el maní debe quedar estacionado a la espera de que se tome una decisión sobre la evacuación del producto. Si es posible, debe tomarse una muestra de cada lote, deben separarse los granos y debe descascararse el resto para observar la calidad del maní antes de tomar una decisión relativa a la aceptación del producto.
- ✓ Las especificaciones relativas a la compra de maní destinado a elaboración posterior adicional, no deben sobrepasar un nivel máximo de aflatoxinas basado en métodos de análisis adecuados y en un plan de muestreo correcto.
- ✓ Deben tomarse precauciones especiales para rechazar el maní que presente signos de daños por insectos o proliferación de mohos, debido al peligro de que contengan aflatoxinas. Deben conocerse los resultados de los análisis de aflatoxinas del maní empleado como materia prima antes de permitir su elaboración. Cualquier lote de maní con un nivel inaceptable de aflatoxinas, que no pueda reducirse a niveles permitidos mediante los equipos de selección disponibles, debe rechazarse.

- ✓ La industria de elaboración de maní debe asegurarse de que el proveedor de maní descascarado, sea capaz de controlar adecuadamente sus propias operaciones para garantizar que el producto acabado no sobrepase el límite máximo de aflatoxinas.
- ✓ Debe examinarse la posible presencia de moho en todos los granos con cáscara suelta, dañados y de tamaño inferior al normal. Si no hay moho externo visible, los granos deben partirse para descubrir la posible proliferación oculta de moho. La proliferación excesiva de moho o la presencia de moho que se asemeje a *A. flavus* es motivo para realizar un análisis químico de la presencia de aflatoxinas o para rechazar el lote (Bragachini, 1994).

## • SELECCIÓN

- ✓ La selección es la etapa final para eliminar los granos defectuosos. Las cintas de selección deben estar bien iluminadas; no deben transportar más de una capa de maní y su velocidad debe ser tal que permita garantizar que los trabajadores que realizan la selección a mano eliminen eficazmente la materia extraña y los granos defectuosos. La maquinaria de selección debe ajustarse, con patrones de referencia, con la mayor frecuencia posible, para asegurar que se retiren todos los granos defectuosos. El ajuste debe comprobarse frecuentemente y de forma periódica.
- ✓ Para eliminar de forma eficaz los granos contaminados por moho, se debe realizar una selección antes y después del escaldado y tostado. Si la elaboración incluye el partido, los granos que no se abren deben eliminarse. Se ha de comprobar la eficacia de las técnicas de selección, mediante análisis periódicos del contenido de aflatoxinas de la corriente de maní seleccionado o del producto acabado, o de ambos. Dichos análisis deben realizarse con la frecuencia suficiente para asegurarse de que el producto sea plenamente aceptable.
- ✓ Los granos defectuosos (enmohecidos, con alteraciones del color, rancios, marchitos, arrugados, dañados por insectos o que presenten otros daños) deben sacarse por separado y deben etiquetarse como no aptos para el consumo humano. Los contenedores de maní defectuoso deben retirarse de la zona de elaboración lo antes posible. Los materiales contaminados o que presenten peligro de contaminación por aflatoxinas deben desviarse a usos no alimentarios.  
El maní rechazado en el proceso de selección se debe destruir o separar de los productos comestibles. Si se va a destinar a la trituration, se debe secar por separado y se debe etiquetar como no apto para el consumo humano directo en su estado actual (Bragachini, 1994).

## • ESCALDADO

- ✓ El escaldado, utilizado junto con mesas de gravedad y con la selección manual o electrónica, permite eliminar de forma muy eficiente los granos contaminados con aflatoxinas. Se ha comprobado que la selección por color, combinada con el



escaldado, puede reducir la contaminación por aflatoxinas hasta en un 90% (Bragachini, 1994).

- **ENVASADO Y ALMACENAMIENTO DEL PRODUCTO FINAL**

- ✓ Los maníes deben envasarse en sacos de yute claros, cajas de cartón o sacos de polipropileno. Si se utilizan sacos de yute, debe velarse por que los sacos no se hayan tratado con aceites minerales a base de hidrocarburos. Todos los sacos o cajas deben llevar indicado el lote del producto, para facilitar su rastreabilidad antes de su traslado a instalaciones de almacenamiento controlado o su transporte.
- ✓ El maní elaborado debe almacenarse y transportarse en condiciones que permitan mantener la integridad del contenedor y de su contenido. Los medios de transporte deben estar limpios, secos, protegidos de la intemperie, exentos de infestación y sellados para impedir que el agua, los roedores o los insectos alcancen el producto. El maní se debe cargar, mantener y descargar protegido de daños y de la humedad. Se recomienda el transporte en vehículos bien aislados o refrigerados cuando las condiciones climáticas lo hagan necesario. Cuando se descarga maní de un vehículo refrigerado, o tras el almacenamiento en frío, deben extremarse las precauciones para impedir la condensación.
- ✓ En condiciones climáticas, calurosas y húmedas, hay que dejar que los maníes alcancen la temperatura ambiente antes de exponerlos a las condiciones externas; este acondicionamiento puede requerir uno o dos días. El maní que haya caído al suelo es vulnerable a la contaminación y no debe utilizarse para productos comestibles (Bragachini, 1994).



## **HIPÓTESIS**

## 2. HIPÓTESIS

La contaminación de maní con aflatoxinas está relacionada con el daño de los frutos, la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* de la sección *Flavi* y el porcentajes de humedad en el momento de la recepción en la planta procesadora.



## **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Evaluar la relación entre los niveles de contaminación con aflatoxinas, la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* de la sección *Flavi*, el daño de los frutos y el porcentaje de humedad en maní en el momento de la recepción en la planta procesadora.

#### **Objetivos Específicos**

1. Determinar el contenido de humedad de las muestras de maní de la cosecha 2007/2008 en el momento de recepción en la planta.
2. Determinar los diferentes tipos de daños de los frutos.
3. Determinar los niveles de aflatoxinas en las muestras de maní.
4. Determinar la presencia de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de maní.
5. Evaluar la correlación estadística entre los datos de porcentaje de humedad, daño de los frutos, contenido de aflatoxinas y frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* en el momento de la recepción en la planta procesadora.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4. I. Análisis de calidad en las muestras de maní realizadas en la planta de acopio**

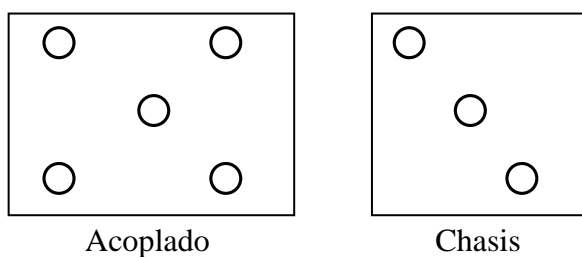
#### **4.I.1 Muestreo**

Para realizar los análisis necesarios en la recepción de la materia prima, se procedió al muestreo de los camiones. Este se realizó a través de un calador neumático (como se observa en la *Figura N°16*).



***Figura N° 16: Calador neumático***

El muestreo se realizó según la *Figura N° 17*.



***Figura N° 17: Esquema de muestreo***

En el chasis, se realizó un número mínimo de tres extracciones, una en el centro y otra en dos de los cuatro ángulos, a una distancia aproximada de 40 cm de la pared.

En el acoplado, se realizó un mínimo de cinco extracciones, en cada uno de los ángulos y una en el centro, equidistantes de las otros.

Una vez tomada la muestra, representativa de la campaña 2007/2008 se identificó la bolsa y se entregó para el análisis.

Terminado este proceso se finaliza la operación de calado de un transporte. La documentación más importante es el número de turno del transporte, porque con ese número se identifica la muestra que se tomó, y sin la identificación la muestra pierde el valor.

#### **4.I.2 Preparación de la muestra de laboratorio, contramuestra y aflatoxina**

Se separó la muestra tomada por el calador en tres partes diferentes que fueron perfectamente identificadas.

- Se tomó la bolsa con la muestra realizada por el calador y se llevó al cuarteador del laboratorio.
- Se completó un registro para poder identificar la muestra; este registro tiene tres ticket los cuales se utilizaron para identificar cada muestra.
- De la salida del cuarteador se tomó la mitad de la misma y se la guardó como contramuestra. Con la otra mitad, se volvió a cuartear para preparar las muestras para análisis físico y de calidad y análisis de aflatoxina (*Figura N° 18*).
  - ⇒ Mitad A: contramuestra de laboratorio
  - ⇒ Mitad B: muestra de laboratorio + muestra de aflatoxina
    - ✓ Mitad B1: muestra de laboratorio
    - ✓ Mitad B2: muestra para aflatoxina
- El operador debe colocar la mitad B1 en la bolsa designada, identificarla y entregarla al laboratorio. Esta muestra debe pesar como mínimo 1 kg.
- La mitad B2, debe ser de 1 kg de maní descascarado y se debe enviar para el análisis de aflatoxina:
  - Se colocó la muestra en la prelimpieza, para separar cuerpos extraños, tierra y granos sueltos del maní en caja.
  - El maní en caja se colocó en la descascaradora y se esperó a que termine de procesar todo el maní que ingresó.
  - Se pesó 1 kg del maní obtenido.
  - Se colocó la etiqueta identificado en la muestra.
  - Se selló la bolsa que contiene la muestra.
  - Se llevó a analizar a laboratorio externo el contenido de aflatoxinas.

Para este último ítem se determinó la concentración de *Aflatoxinas* en las muestras obtenidas durante la campaña 2007/2008, utilizándose la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994). Las muestras fueron extraídas con acetonitrilo:agua y el extracto filtrado se purificó mediante el uso de columnas Romer 224. La separación final, detección y cuantificación de las *Aflatoxinas* se realizó por HPLC, en columnas de fase reversa de C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm, 5 µm; Varian). El sistema HPLC consistió de una bomba Varian conectado a un detector fluorescente programable Varian.





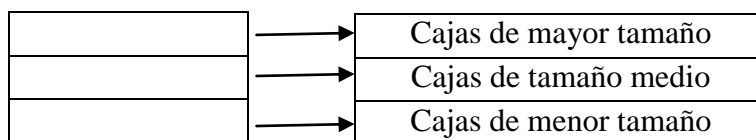
***Figura N°18: Laboratorio de análisis físicos y de calidad***

#### **4.I.3 Análisis comercial de ingreso**

Para este punto:

- ✓ Se pesó la muestra.
- ✓ Se colocó la misma en la prelimpieza.
- ✓ Se tomó la muestra del recipiente maní en caja y se la pasó por la tamañadora de cajas, para separar las cajas grandes, medianas y chicas.
- ✓ Luego se colocaron las muestras de cajas tamañadas en la descascaradora, de acuerdo al tamaño de cajas, para evitar partir los granos, según como lo indica la

*Figura N° 19:*



***Figura N° 19: Descascaradora de maní***

✓ De los granos descascarados se utilizó 205 g para determinar la humedad del maní y se regresó nuevamente a la muestra originaria.  
Para determinar la humedad se utilizó el **Humedímetro Tesma A-79 PLUS** (*Figura N° 20*), que se conectó a una PC a los efectos de transmitir en forma automática los datos de humedad medidos.



***Figura N° 20: Humedímetro TESMA A-79 PLUS***

La técnica consta de diversos pasos:

⇒ Preparación del instrumento:

- ✪ Se encendió el equipo con la llave posterior, el display marcó 90.0.
- ✪ Se verificó que esté encendida la luz indicadora del grano a medir, caso contrario se oprimió el botón correspondiente hasta que encienda la luz.
- ✪ Se verificó que el volcador esté cerrado antes de ingresar la muestra.

⇒ Pesado de la muestra: pesar 205 g de maní.

⇒ Medición de la humedad:

- ✪ Se colocó el volcador sobre la cuba y se apretó el pulsador del mismo, para que la muestra ingrese en la cuba de medición.
- ✪ Una vez que ingresa, el display mostó unas líneas hasta realizar la compensación por temperatura.
- ✪ Luego el display indicó la humedad del grano ya corregida por la temperatura y mantuvo ese valor hasta que se retiró el grano de la cuba de medición.

⇒ Retiro del grano de la cuba de medición:

- ✪ Para vaciar la cuba de medición, se tiró de la perilla ubicada en el lado derecho. El grano cayó en el cajón inferior y luego se abrió y se retiró el grano.
- ✪ Luego de vació la cuba, el display volvió a marcar 90.0 ([www.tesma.com.ar](http://www.tesma.com.ar)).

Especificaciones del humedímetro:

- Preciso.
- Alimentación por 12V y 220V, ambos cables provistos con el equipo.

- Transmisión de datos a PC.
  - Selección y medición directa de 12 granos distintos (más dos opcionales).
  - Pesado de la muestra por balanza mecánica de alta precisión.
  - Lectura rápida en pocos segundos.
  - Corrección automática por temperatura.
  - Calibración con granos controlados por el SENASA y la Cámara Arbitral de Cereales.
  - Exactitud y confiabilidad: no permite re calibraciones manuales.
- 
- ✓ Luego de determinar la humedad, se tomaron los recipientes con las muestras de granos descascarados, sueltos, cuerpos extraños y tierra para el análisis de calidad de la materia prima. Para llevar a cabo este análisis se debió pesar de forma separada tierra, cuerpos extraños, granos sueltos y granos que estaban dentro de las vainas, y se los expresó en porcentaje.
  - ✓ Los granos obtenidos luego del descascarado, se colocaron en la tamañadora, la cual tiene en su interior juegos de zarandas superpuestas (9 mm, 7.75 mm, 7.5 mm, 6.75 mm, 6.25 mm). Esta máquina realiza movimientos de vaivén para separar el maní por tamaño; el maní que atraviesa la última zaranda será considerado industria.
  - ✓ Luego se pesaron las fracciones por separado sobre cada zaranda, pero previo separado de los granos pelados, de otro color, con daño tipo I (dañados por insectos, helados, moho interno, brotados), con daño tipo II (ardidos, podridos, moho externo), manchados, revolcados y/o partidos.
  - ✓ Se pesaron los daños separados anteriormente y se los expresaron como porcentaje.
  - ✓ Se llenaron planillas con todos los datos obtenidos.

Antes de analizar los daños que puede sufrir el maní, se deben tener en cuenta una serie de definiciones:

- a. **Granos con daño tipo I:** son aquellos granos o pedazos de granos de maní que presentan una alteración en su constitución, que no es posible eliminar a través del proceso de selección. Se consideran como tales a:
  - i. Granos brotados: son aquellos que han iniciado de manera visible el proceso de germinación, lo que se manifiesta por la presencia de la radícula.
  - ii. Granos helados: son aquellos que habiendo sido afectados por heladas tiene un aspecto anormal del tegumento, algo descolorido y por lo general de color apagado. Una vez partidos y pelados, la pulpa tiene aspecto brillante-translúcido, descolorido y de aspecto gomoso, puede exhibir una alteración notable en su color, hasta amarillo, pardusco o grisáceo, y tiene un sabor desagradable.
  - iii. Granos dañados por insectos: son aquellos que presentan perforaciones producidas por carcomas, gorgojos, etc.
  - iv. Granos con moho interno: presentan adherencias de masas fúngicas visibles en su interior.

- b. **Granos con daño tipo II:** son aquellos granos o pedazos de granos de maní que presentan una alteración en su constitución, y que es posible eliminar a través del proceso de selección. Se consideran como tales a:
- Granos ardidados: son aquellos que presentan un oscurecimiento en su coloración interna y externa como consecuencia de fermentaciones.
  - Granos podridos: presentan una coloración marrón oscura y alteraciones en su estructura, producto de proceso de descomposición.
  - Granos con moho externo: presentan adherencias de masas fúngicas en su superficie.
- c. **Granos alterados en su presentación:** son aquellos granos o pedazos de granos que presentan alteraciones visibles que no implican modificación en sus propiedades sápidas-aromáticas. Se consideran a:
- Granos manchados: son aquellos granos que no presentan en más de una cuarta parte de su superficie zonas oscuras o distintas a su coloración natural. No se consideran manchados a los granos de tinte violáceo.
  - Granos sucios: granos que presentan adherencias de tierra u otra suciedad, independiente de la definición de revolcado que se refiere al lote en su conjunto.
  - Granos chuzos y/o arrugados: presentan profundos surcos y depresiones como consecuencia de la maduración incompleta o factores climáticos adversos.
  - Granos descoloridos: presentan una coloración notoriamente más pálida y tenue que la normal, en parte o en la totalidad de su tegumento.

#### **4. II. Determinación de la frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de maní**

##### **4. II. A. Procedimiento:**

- Las superficies de trabajo se descontaminó con etanol al 70%, también puede hacerse con hipoclorito de sodio al 5% u oxidal al 4%, antes de comenzar a trabajar.
- Bajo campana de flujo laminar o en el cono de esterilidad se colocó 1 mL de hipoclorito de sodio al 0.4% (lavandina comercial) en un frasco con 100 mL de agua destilada estéril.
- Se tomó aproximadamente 100 granos enteros al azar y se colocaron en dicho frasco (punto 2), se agitó manualmente durante unos segundos y se dejó en reposo durante uno a dos minutos.
- Se lavó sucesivamente los granos. Para esto se tomaron los granos del punto anterior con una cuchara esterilizada a la llama del mechero y se los traspasaron a un frasco que contenía 100 mL de agua destilada estéril. Se dejó unos segundos.
- Se tomaron los granos del punto anterior con una cuchara esterilizada a la llama del mechero y se los traspasó a otro frasco que contiene 100 mL de agua destilada estéril. Se dejó unos segundos y se repitió el procedimiento.
- Una vez desinfectados y lavados los granos, con una pinza esterilizada a la llama del mechero, se colocaron los granos sobre la superficie de los diferentes medios de cultivo: **Agar Dichloran, Rosa de Bengala, Cloranfenicol (DRBC) y Agar *Aspergillus flavus* y**

*parasiticus* (AFPA). Se sembraron 100 granos distribuidos en cinco placas. El número de granos por placa dependió del tamaño de los mismos. En general, se recomienda sembrar por placa 16 a 20 granos pequeños y 8 a 10 granos grandes.

7. Se colocaron las placas en una estufa de cultivo a 25<sup>0</sup>C durante 5 a 7 días.  
Una vez transcurrido el período de incubación se calcularon los porcentajes de infección de los granos a través de la siguiente relación: n° semillas infectadas / n° semillas totales colocadas en las placas y el porcentaje de semillas infectadas con cepas aflatoxicogénicas (en AFPA).
8. Una vez finalizada la experiencia, se limpió adecuadamente la superficie de trabajo con etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 5% u oxidal al 4%. Se descartó todo el material contaminado adecuadamente.

#### 4. II. B. Composición de los medios de cultivo

##### DRBC (Agar Dichloran, Rosa de Bengala, Cloranfenicol)

Componente	Cantidad
Glucosa	10 g
Peptona	5 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	1 g
SO <sub>4</sub> Mg7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Dichloran	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Rosa de Bengala	25 mg
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 mL

##### AFPA (Agar *Aspergillus flavus* y *parasiticus*)

Componente	Cantidad
Peptona	10 g
Extracto de Levadura	20 g
Citrato de Amonio-Férrico	0,5 g
Dichloran	2 mg
Cloranfenicol	100 mg
Agar	15 g
Agua Destilada	1000 mL

#### 4. II. C. Fundamento de los medios de cultivo

**DRBC** (King, A.D. y col., 1979): es un medio recomendado para el aislamiento y enumeración de hongos en alimentos con alto contenido de agua. Este medio contiene **Rosa de Bengala** que inhibe el crecimiento bacteriano; además contiene **Cloranfenicol**, antibiótico que inhibe el crecimiento de bacterias y **Diclorán**, un antifúngico que restringe el tamaño de la colonia e inhibe aquellos hongos de crecimiento rápido.

**AFPA** (Pitt, J.I. y col., 1983): es un medio utilizado para la detección rápida de especies productoras de aflatoxinas, por la fácil diferenciación de otras especies que no lo son. Se diferencian por una coloración anaranjado brillante en el reverso de la placa (*A. flavus/parasiticus* toxicogénicos) que se produce por la reacción química que ocurre entre un intermediario en la síntesis de aflatoxinas y el **Citrato de amonio férrico** contenido en el medio. También contiene **Cloranfenicol** y **Diclorán**.

#### 4. II. D. Análisis estadísticos

Se evaluó la correlación entre los parámetros evaluados utilizando el índice de Pearson, los análisis se realizaron con el software SigmaStat v 2.1



## **RÉSULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5. I. Análisis de los distintos tipos de daños que pueden afectar a la planta de maní

Durante la campaña agrícola de maní 2007/2008 se tomaron 46 muestras al azar, representando cada una de ellas un turno asignado al camión de acuerdo al ingreso a la planta de acopio. Estas muestras fueron procesadas y analizadas en relación a diferentes parámetros que evalúan calidad, que son los de rutina en la planta de acopio; las muestras fueron trasladadas a la Universidad y mantenidas a 4°C hasta el análisis de la flora fúngica total y aflatoxicogénica.

Con respecto a los daños encontrados en las 46 muestras se puede decir que son más comunes los de tipo I, ya que son los daños más habituales, siendo el de mayor importancia los granos helados con un porcentaje de 16,77%, habiéndose encontrado una de las muestras (440) un 9,51%. El resto de daños tipo I se encuentran en un porcentaje menor a 3,73% (Tabla N° 8 y Figura N° 21).

**Tabla N° 8: Daños y alteraciones en las muestras de maní**

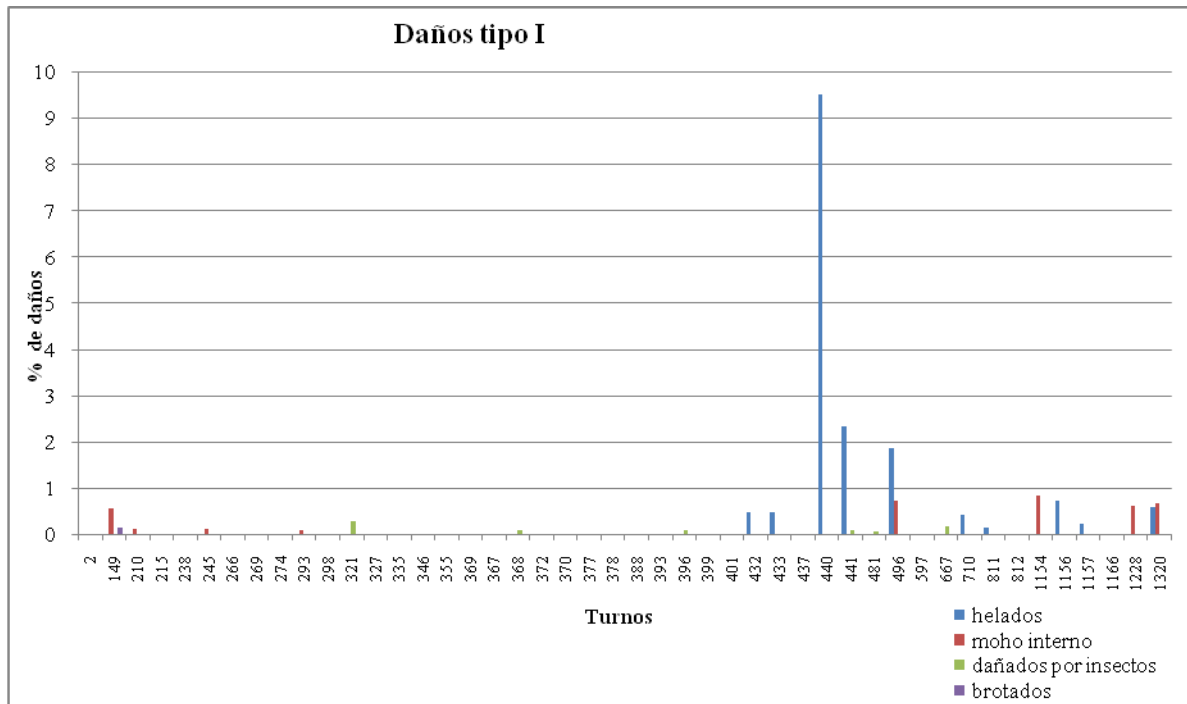
Turno	Daños tipo I (%)				Daños tipo II (%)		
	Helados	Moho interno	Dañados por insectos	Brotados	Ardidos	Podridos	Moho externo
2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,31	0,00
149	0,00	0,56	0,00	0,15	0,49	0,00	0,00
210	0,00	0,12	0,00	0,00	0,42	0,00	0,00
215	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
238	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
245	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
266	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
269	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00
274	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
293	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
298	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
321	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
327	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
335	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
346	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
355	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
369	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,19	0,00
367	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
368	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
372	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00
370	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
377	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



378	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
388	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,00	0,00
393	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00
396	0,00	0,00	0,10	0,00	0,08	0,00	0,00
399	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
401	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,15	0,00
432	0,47	0,00	0,00	0,00	0,09	0,04	0,00
433	0,49	0,00	0,00	0,00	0,75	0,23	0,00
437	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
440	9,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,00
441	2,34	0,00	0,08	0,00	0,24	0,04	0,00
481	0,00	0,00	0,07	0,00	0,69	0,08	0,11
496	1,86	0,72	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00
597	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00
667	0,00	0,00	0,18	0,00	0,16	0,00	0,00
710	0,42	0,00	0,00	0,00	0,49	0,06	0,16
811	0,14	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
812	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00
1154	0,00	0,83	0,00	0,00	0,12	2,14	0,19
1156	0,73	0,00	0,00	0,00	0,09	0,52	0,00
1157	0,23	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
1166	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,35	0,00
1228	0,00	0,63	0,00	0,00	1,01	0,00	1,71
1320	0,59	0,67	0,00	0,00	1,02	0,00	0,24

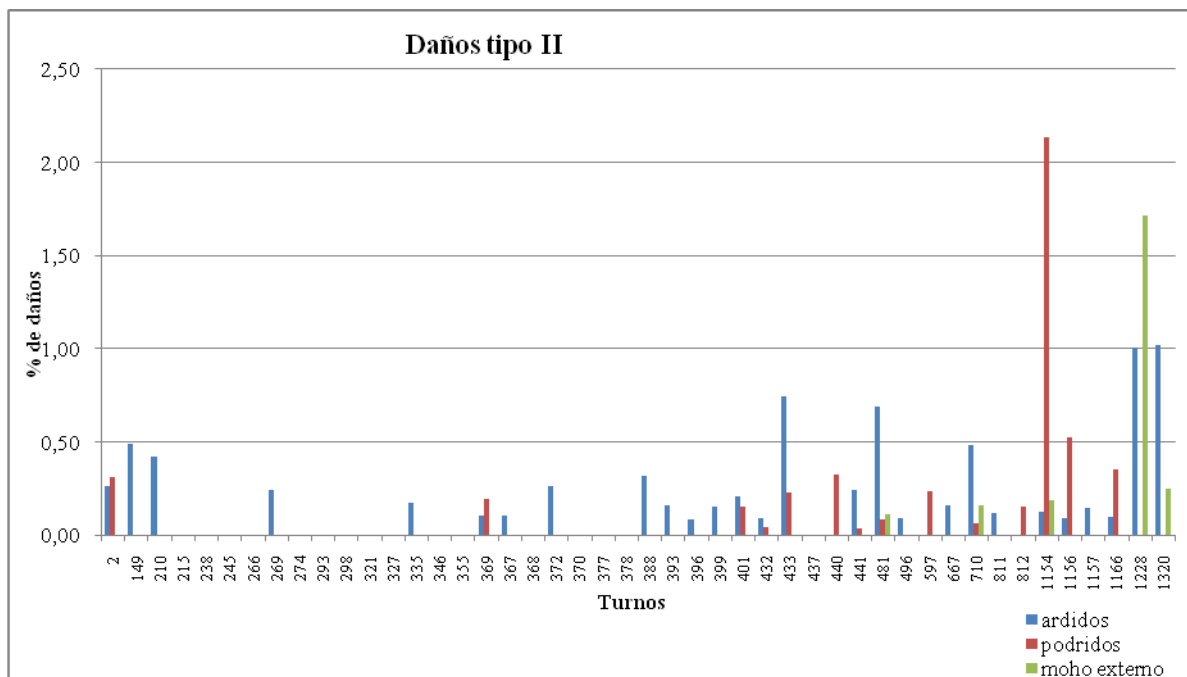
Turno	Alterados en su presentación (%)				
	Manchados	Sucios	Chuzos	Descoloridos	Insectos vivos
2	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
149	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
210	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00
215	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
238	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00
245	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
266	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00
269	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00
274	0,40	0,00	0,04	0,00	0,00
293	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
298	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
321	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
327	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
335	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00
346	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00

355	1,65	0,00	0,00	0,00	0,00
369	0,91	0,00	0,00	0,00	0,00
367	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
368	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
372	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
370	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
377	0,72	0,00	0,00	0,00	0,00
378	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
388	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00
393	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00
396	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
399	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00
401	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00
432	1,24	0,00	0,00	0,00	0,00
433	1,26	0,00	0,00	0,00	0,00
437	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
440	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
441	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
481	0,45	0,00	0,03	0,00	0,00
496	2,55	0,00	0,00	0,00	0,00
597	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
667	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
710	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00
811	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
812	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00
1154	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
1156	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
1157	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00
1166	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00
1228	0,94	0,00	0,00	0,00	0,00
1320	1,96	0,00	0,00	0,00	0,00



**Figura N° 21: Daños tipo I en el maní**

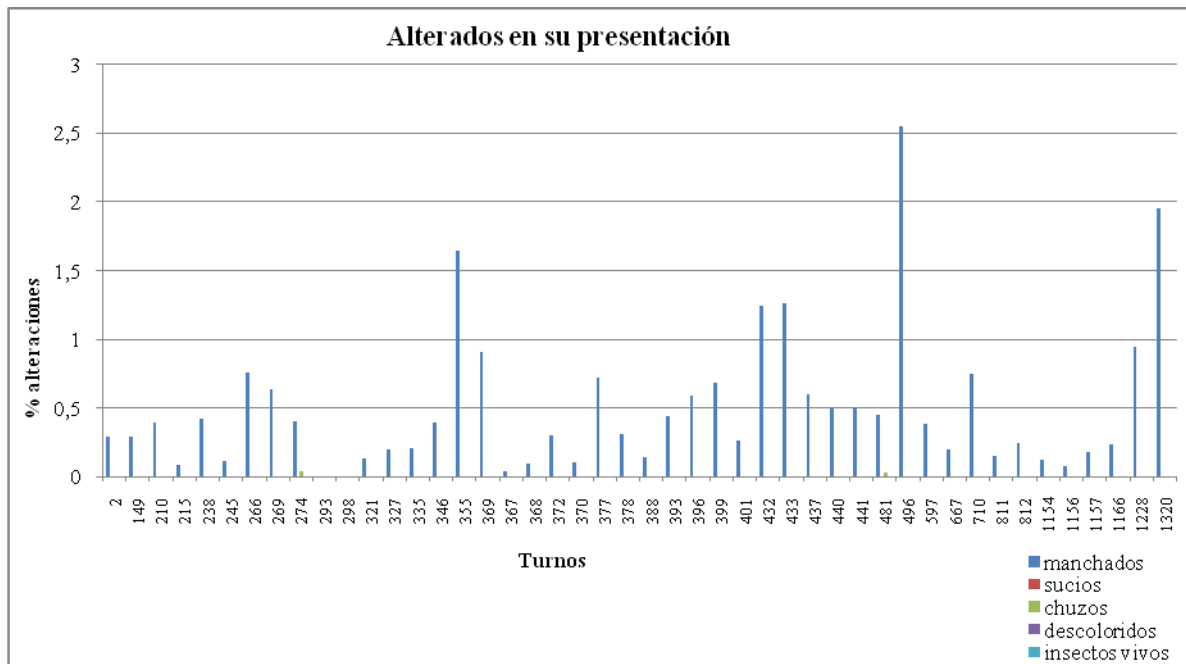
En lo que respecta al daño tipo II se puede observar que el daño que aparece en mayor porcentaje es el grano ardido (8,05%), mientras que granos podridos y con moho externo se encuentran en menor porcentaje, 4,82 para el primero y 2,42 para el segundo (Tabla N° 8 y Figura N° 22).



**Figura N° 22: Daños tipo II en maní**

Observando la *Tabla N° 8* y *el Figura N° 23* se puede decir que los granos alterados en su presentación son menos comunes de encontrar que los daños tipo I y II.

Dentro de esta última clasificación, los granos manchados son los que se encuentran en un porcentaje de 22,86%; en cambio los granos chuzos en un porcentaje muy bajo (0,07%). No encontrándose granos sucios, descoloridos ni la presencia de insectos vivos.



***Figura N° 23: Alteraciones en el grano de maní***

Resumiendo: se vió que los daños más comúnmente encontrados en el total de las muestras analizadas fueron: helados, podridos, moho externo, ardidos y manchados.

## **5. II. Análisis de otros parámetros (tierra, cuerpos extraños, cáscara, granos sueltos, granos descascarados)**

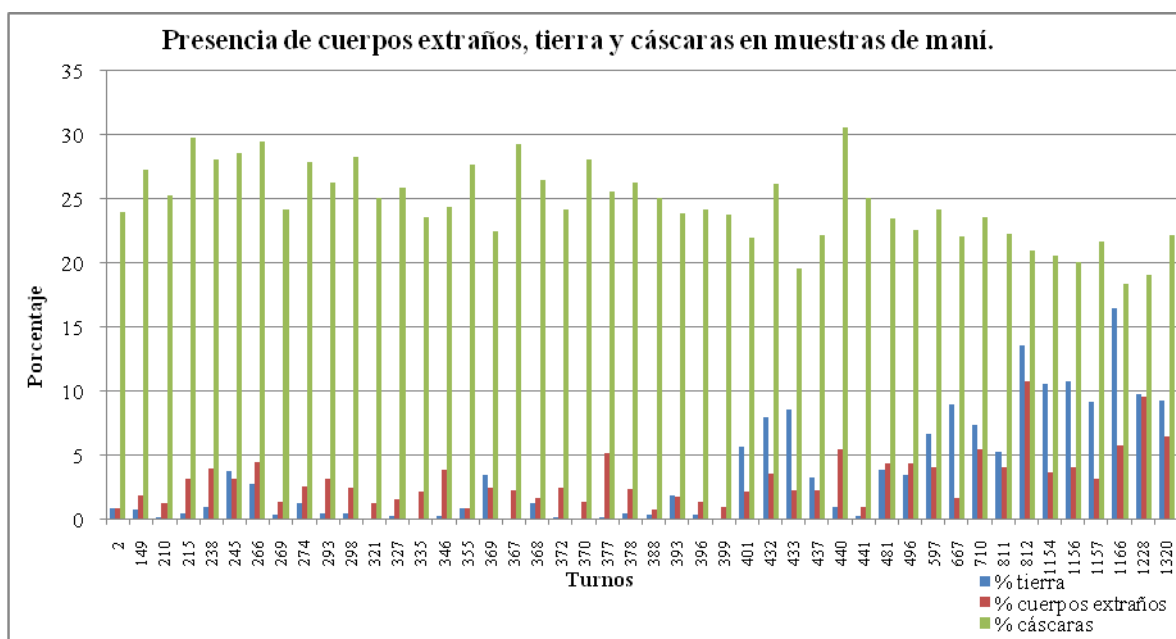
Por otra parte se analizó el porcentaje de tierra, variando el mismo entre 0,08-16,43%; cuerpos extraños entre 0,83-10,77%; cáscaras entre 18,43-29,84% (*Tabla N° 9* y *Figura N° 24*); granos sueltos entre 0,10-22,71% y por último granos descascarados entre 45,27-74,83% (*Tabla N° 9* y *Figura N° 25*).

**Tabla N° 9: Otros factores que influyen en la calidad del maní**

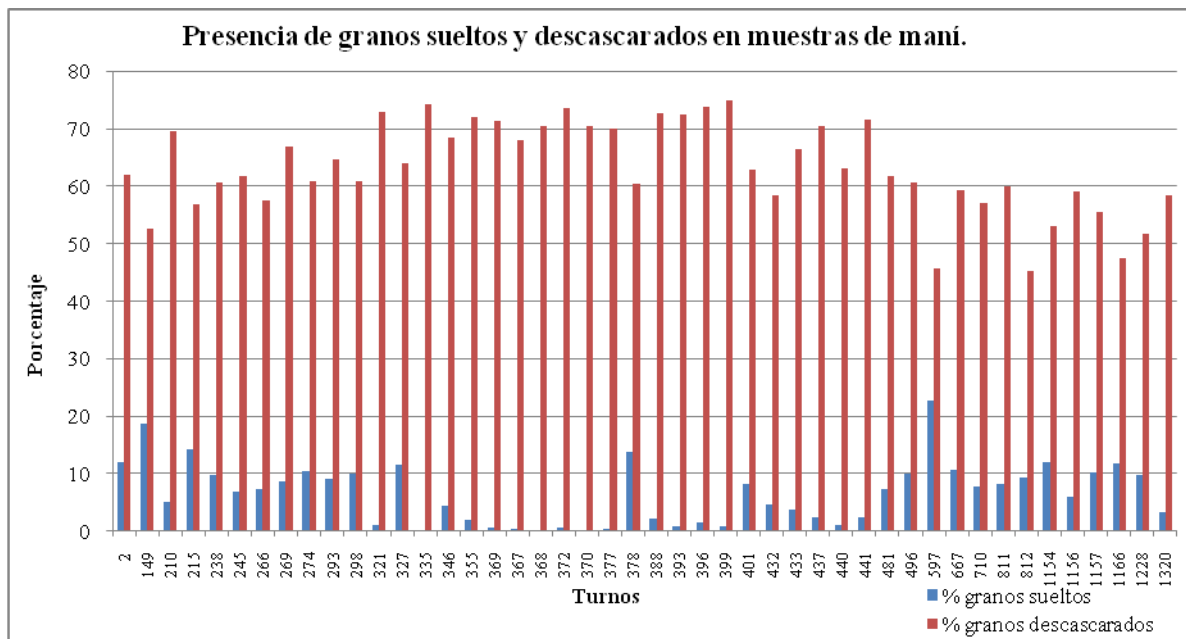
N° Turno	Tierra (%)	C. Extraños (%)	Cáscaras (%)	G. Suelos (%)	G. Descasc. (%)
2	0,85	0,93	24,00	12,21	62,02
149	0,75	1,94	27,27	18,87	52,61
210	0,20	1,29	25,32	5,20	69,50
215	0,46	3,21	29,84	14,38	56,83
238	0,95	4,00	28,14	9,80	60,64
245	3,71	3,18	28,56	7,03	61,67
266	2,73	4,47	29,48	7,48	57,48
269	0,33	1,39	24,21	8,80	66,86
274	1,21	2,57	27,92	10,46	60,90
293	0,49	3,23	26,28	9,21	64,59
298	0,48	2,51	28,31	10,20	60,78
321	0,08	1,32	25,14	1,13	72,97
327	0,27	1,61	25,87	11,66	63,88
335	0,08	2,19	23,58	0,25	74,25
346	0,21	3,87	24,39	4,52	68,43
355	0,81	0,88	27,68	2,08	71,90
369	3,44	2,47	22,52	0,78	71,41
367	0,06	2,33	29,34	0,64	67,93
368	1,21	1,66	26,49	0,39	70,38
372	0,15	2,51	24,17	0,81	73,59
370	0,07	1,38	28,12	0,10	70,45
377	0,15	5,15	25,57	0,60	69,87
378	0,46	2,38	26,25	14,00	60,30
388	0,39	0,83	25,13	2,25	72,74
393	1,84	1,78	23,88	1,05	72,39
396	0,32	1,40	24,18	1,55	73,76
399	0,05	1,03	23,83	1,09	74,83
401	5,68	2,21	22,00	8,39	62,81
432	7,93	3,62	26,18	4,80	58,35
433	8,52	2,33	19,57	3,81	66,33
437	3,21	2,34	22,24	2,47	70,39
440	0,91	5,47	30,62	1,25	63,01
441	0,26	0,97	25,13	2,53	71,56
481	3,82	4,36	23,54	7,40	61,70
496	3,42	4,42	22,56	10,01	60,72
597	6,70	4,06	24,18	22,71	45,59
667	9,00	1,66	22,09	10,83	59,35
710	7,41	5,48	23,58	7,98	56,97
811	5,22	4,08	22,28	8,38	60,04
812	13,59	10,77	20,96	9,40	45,27
1154	10,56	3,70	20,55	12,22	52,97

1156	10,78	4,08	20,06	6,10	58,98
1157	9,18	3,20	21,68	10,36	55,58
1166	16,43	5,83	18,43	11,96	47,36
1228	9,76	9,56	19,09	9,98	51,62
1320	9,26	6,55	22,23	3,48	58,49

- G. Suelos: granos sueltos
- G. Descascarados: granos descascarados
- C. Extraños: cuerpos extraños



***Figura N° 24: Presencia de tierra, cuerpos extraños y cáscaras en las muestras de maní***



**Figura N° 25: Presencia de granos sueltos y granos descascarados en las muestras de maní**

En base a los tipos de daños y a otros parámetros evaluados, como la humedad y los niveles de aflatoxinas, el maní se clasificó en diferentes tipos que se detallan en la *Tabla N° 10*.

**Tabla N° 10: Clasificaciones de los tipos de maní según distintos parámetros**

Parámetros	TIPO "A"	TIPO "B"	TIPO "C"	TIPO "D"	TIPO "F"	TIPO "E"
<b>Humedad</b>	<25%	<25%	<25%	<25%		<25%
<b>Granos sueltos</b>	<10%	<10%	<10%	<10%		<10%
<b>Cuerpos extraños</b>	<10%	<10%	<10%	<10%		<10%
<b>Tierra</b>	<10%	<10%	<10%	<10%		<10%
<b>Moho interno</b>	<0,3%	<0,5%	<1%	<1,50%		<0,5%
<b>Daños y defectos*</b>	<5%	<10%	<15%	<18%		<15%
<b>Helado</b>	<0,30%	<0,50%	<1%	<1,50%		<0,50%
<b>Aflatoxina</b>	0 ppb	0 ppb	0 ppb	<10 ppb	**	0 ppb
<p>* Excluye M. interno y helados  ** No cumple con las especificaciones del tipo A, B, C, D, F, E, por lo tanto es destinado a industria</p>						

En general se postulan dos modos de infección del maní con las especies *A. flavus/parasiticus*. La primera, es que tanto las vainas como los frutos son invadidos cuando la planta se encuentra estresada; mientras que el segundo modo de infección se observa cuando las vainas o frutos están dañados y permiten una invasión directa de las cepas aflatoxicogénicas presentes en el suelo.

Tanto el daño interno como externo de las vainas provocarían un aumento en el porcentaje de granos infectados principalmente por *A. flavus* (Lynch y Wilson, 1991) y un aumento en la contaminación con aflatoxinas bajo condiciones predisponentes (Hill y col, 1983; Sanders y col., 1985).

Aunque no es necesario que las vainas de maní estén dañadas para la colonización de sus tejidos y la consiguiente invasión del grano (Diener y col., 1987), como puede verse en este trabajo más adelante.

Los insectos pueden jugar un rol importante en la diseminación del inóculo y en facilitar la penetración de los hongos aflatoxicogénicos en maní.

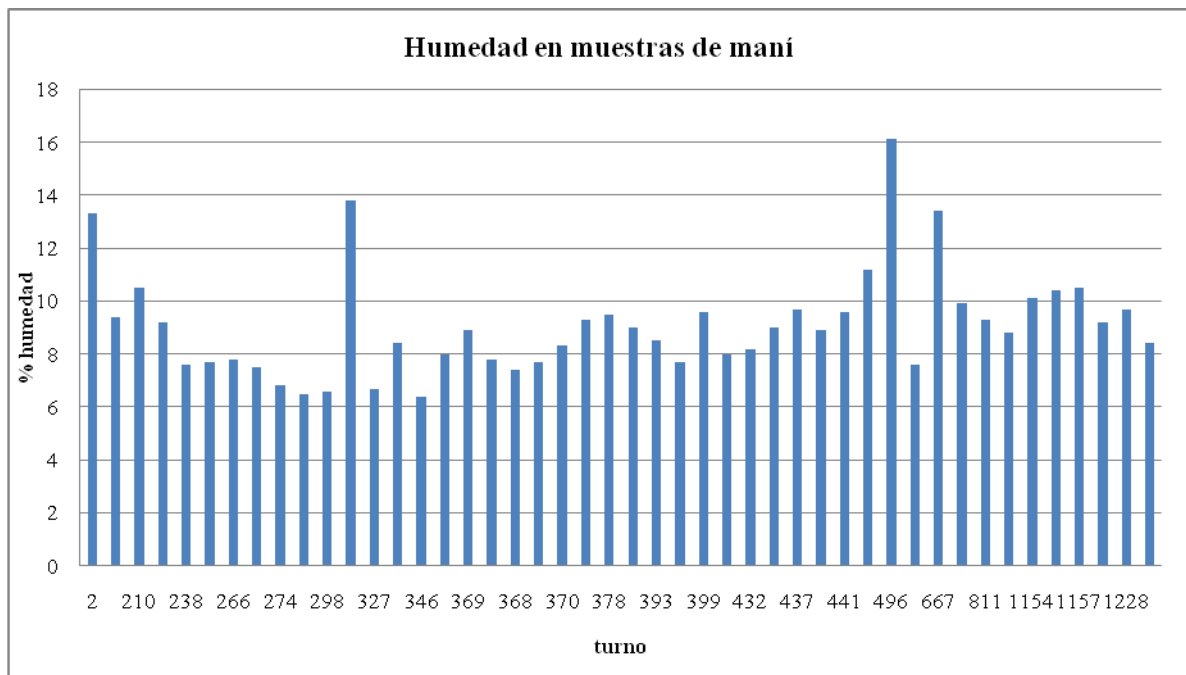
### **5. III. Análisis del contenido de humedad en los granos de maní**

El contenido de humedad del maní es la variable más importante en el almacenamiento. Una vez que el maní es arrancado, el secado puede producirse en la parcela o por secado artificial. En general se considera que un 10-11% de humedad para maní en caja y un 6-8% de humedad para maní pelado, es un valor seguro como para evitar la proliferación de *A. flavus/parasiticus* en el almacenamiento (Wilson, 1995).

Podemos observar que 9 de las muestras tienen porcentajes de humedad por encima o en el límite de lo aconsejado.

Los niveles de humedad (%) en las 46 muestras de maní analizadas variaron en un rango entre 6,50 y 16,10% (*Figura N° 26*). En aquellas muestras donde se detectó contaminación por aflatoxinas los niveles de humedad variaron entre 7,50 y 13,13 (*Tabla N° 11*).





***Figura N° 26: Humedad en los granos de maní***

En el cultivo de maní, los granos varían considerablemente en su aw y exposición a la temperatura del suelo. Los niveles de aw para granos individuales varían entre 0,75 a 1,0 (Corner y col., 1989) y las temperaturas del suelo en la zona de contacto con la vaina fluctúan de 20°C en regiones templadas a 38°C en áreas tropicales semiáridas (Craufurd y col., 2003). Las especies aflatoxicogénicas tienen una ventaja competitiva sobre los otros hongos a aw menores a 0,96 y a temperaturas aproximadas de 30°C (Corner y col., 2003; Marin y col., 1998).

#### **5. IV. Contaminación con aflatoxinas**

De las 46 muestras analizadas, el 19,5% (9 muestras) presentaban contaminación con aflatoxinas totales con niveles entre 0,7 y 247,82 ppb.

El establecimiento de límites regulatorios varía de un país a otro, dependiendo de la exposición de la población, factores políticos, sociales y económicos. En Argentina y el MERCOSUR los niveles de aflatoxinas permitidos son 5ppb de AFB1 y 20ppb de aflatoxinas totales. En la Comunidad Europea, donde las reglamentaciones son más estrictas, se rechazan todos los lotes que contienen niveles superiores a 2ppb de AFB1 y 4ppb de aflatoxinas totales (Commission of the European Communities, 2006).

Teniendo en cuenta estas últimas reglamentaciones podemos observar que un 10% de las muestras se encuentran por encima de estos valores: 6,72 (muestra 149); 7,76 (muestra 269); 12,8 (muestra 597); 247,82 (muestra 811); 85,87 (muestra 1228) de aflatoxinas totales, con niveles de AFB1 de 6,42; 5,94; 12; 189,92; 70,44; respectivamente.

Las otras muestras presentaron niveles menores de aflatoxinas totales: 3,54 (muestra 2); 1,57 (muestra 396); 0,69 (muestra 710); 1,07 (muestra 1320), con niveles de AFB1 de: 1; 1,57; 0,69; 1,07; respectivamente (*Tabla N° 11*).

***Tabla N° 11 Características a destacar en las muestras de maní***

<b>N° Turno</b>	<b>Campo</b>	<b>Localidad</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Aflat. totales (ppb)</b>	<b>AFB1(ppb)</b>
2	La Libertad	Buena Esperanza	13,30	3,54	1
149	La Libertad	Villa Valeria	9,40	6,72	6,42
210	Los Pumas	Villa Valeria	10,50	0	0
215	Los Pumas	Buena Esperanza	9,20	0	0
238	La Libertad	Chaján	7,60	0	0
245	Vaggione	Buena Esperanza	7,70	0	0
266	La Libertad	Villa Huidobro	7,80	0	0
269	Coscia	Buena Esperanza	7,50	7,76	5,94
274	La Libertad	Buena Esperanza	6,80	0	0
293	La Libertad	Buena Esperanza	6,50	0	0
298	La Libertad	Buena Esperanza	6,60	0	0
321	La Libertad	General Levalle	13,80	0	0
327	Moine	Buena Esperanza	6,70	0	0
335	La Libertad	Buena Esperanza	8,40	0	0
346	La Libertad	Buena Esperanza	6,40	0	0
355	La Libertad	Coronel Moldes	8,00	0	0
369	Fantoni	Buena Esperanza	8,90	0	0
367	La Libertad	Villa Huidobro	7,80	0	0
368	Toselli	Villa Huidobro	7,40	0	0
372	Coscia	Buena Esperanza	7,70	0	0
370	La Libertad	Villa Huidobro	8,30	0	0
377	Toselli	Buena Esperanza	9,30	0	0
378	La Libertad	Buena Esperanza	9,50	0	0
388	La Libertad	Coronel Moldes	9,00	0	0
393	Fantoni	Buena Esperanza	8,50	0	0
396	La Libertad	Coronel Moldes	7,70	1,57	1,57
399	Fantoni	Buena Esperanza	9,60	0	0
401	La Libertad	Coronel Moldes	8,00	0	0
432	Fantoni	Berrotarán	8,20	0	0
433	Malpassi	San Ambrosio	9,00	0	0
437	Magnoli	San Ambrosio	9,70	0	0
440	Magnoli	Berrotarán	8,90	0	0
441	Malpassi	San Ambrosio	9,60	0	0
481	Magnoli	Las Acequias	11,20	0	0
496	Toraso	La Aguada	16,10	0	0
597	Benitez	Buena Esperanza	7,60	12,8	12

667	La Libertad	Moestino Pizarro	13,40	0	0
710	Jaeschke	Villa Valeria	9,90	0,69	0,69
811	Vaggione	Chaján	9,30	247,82	189,92
812	Mandolini	Villa Huidobro	8,80	0	0
1154	Avanzini, R	Suco	10,10	0	0
1156	Los Tigres	Justo Dract	10,40	0	0
1157	Alufi	Bulnes	10,50	0	0
1166	Samiz	Bulnes	9,20	0	0
1228	Avanzini, J	Suco	9,70	85,87	70,44
1320	Benitez	La Aguada	8,40	1,07	1,07

Aflat. totales: aflatoxinas totales

AFB1: aflatoxina B1

### **5.V. Análisis de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de maní**

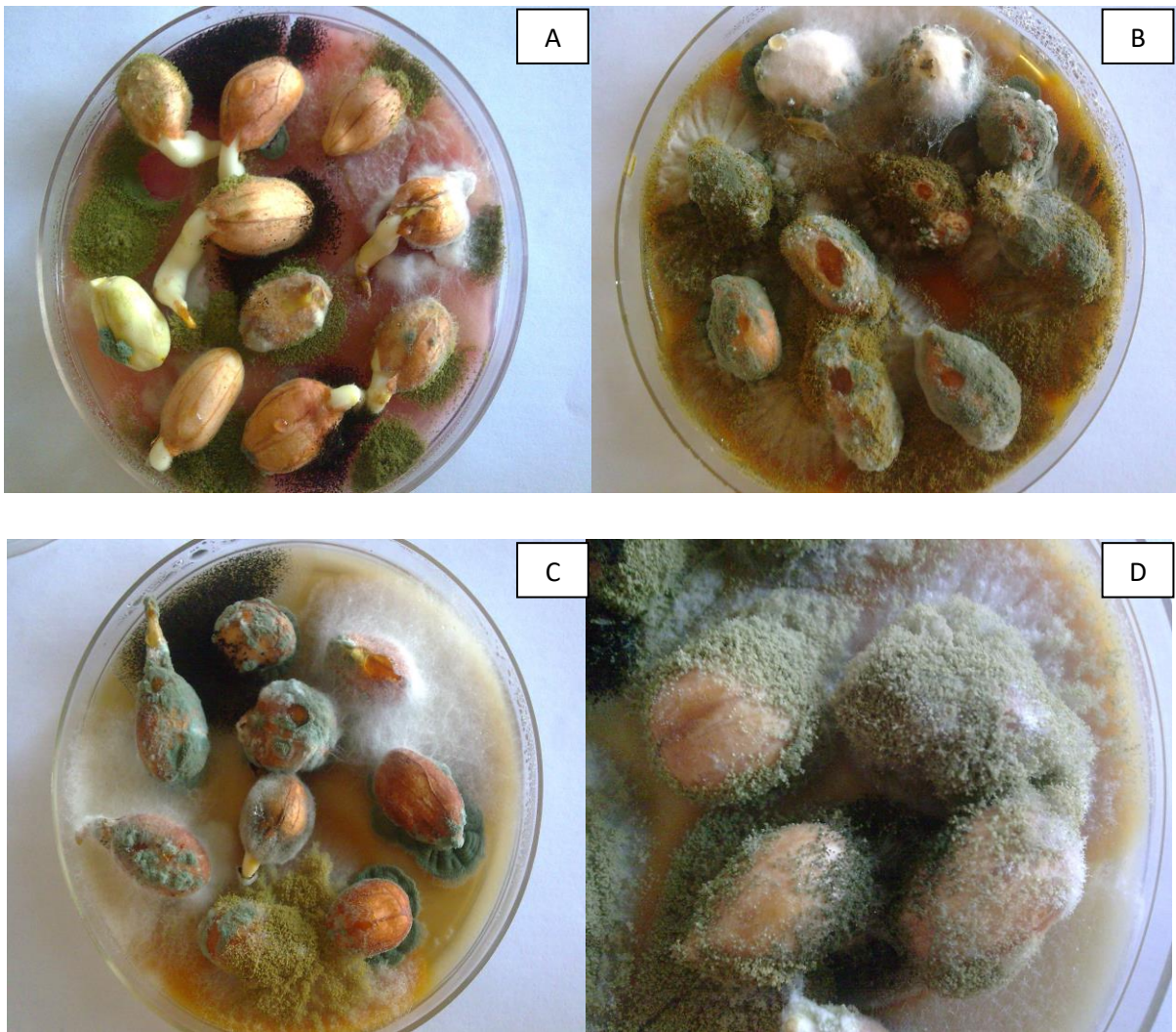
Se ha demostrado que las comunidades de *Aspergillus* de la sección *Flavi* pueden variar tanto en la composición de especie como en el potencial toxicogénico (Lisker, 1993).

La región manisera de la provincia de Córdoba se caracteriza por presentar esporádicamente ciclos inductivos de contaminación con aflatoxinas. Dicha contaminación resulta de una interacción entre el inóculo, la capacidad de la cepa aislada y las condiciones medioambientales. Así, un aumento de las cepas toxicogénicas al momento de la cosecha, junto a las condiciones de estrés hídrico y térmico podrían ser determinante en el grado de contaminación del maní (Barros, G., 2006).

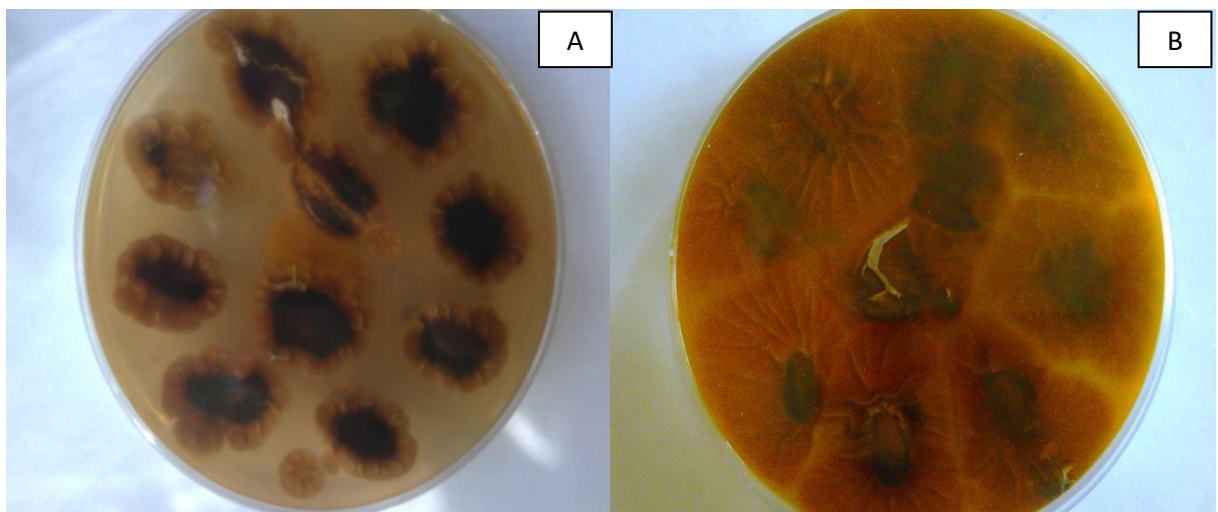
Con respecto al análisis de las muestras, en lo referente al porcentaje de infección total, porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y porcentaje de *A. flavus/parasiticus* toxicogénicos, los resultados se observan en la *Tabla N° 12*.

Todas las muestras analizadas presentaron un porcentaje de infección con hongos del 100%, excepto 3 muestras (441, 401, 369) que mostraron un nivel menor pero por encima del 94%. Estos valores se deben a que el grano de maní está colonizado por distintos microorganismos, ya sean productores de toxinas o no, como flora asociada característica.

El porcentaje de infección con *A. flavus/parasiticus*, fue evaluado en las placas con el medio de cultivo DRBC, a partir de las características macroscópicas de las colonias tal como se puede observar en la *Figura N° 27 A*. Dicho porcentaje fue muy variable entre las muestras, con un rango entre 0 y 88%, con una media de contaminación del 36,25% (*Tabla N° 12*).



***Figura N°27: Detección de A.flavus/parasiticus***



***Figura N° 28: Detección de A.flavus/parasiticus toxicogénicos en medio AFPA***

**Tabla N° 12: Porcentaje de infección total y presencia de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de maní**

N° Turno	Cant. Sem. Infect.	% Infec. Total	Cant. Sem. Infect. por A.flavus/ parasiticus	% infec. por A.flavus/ parasiticus	Cant. Sem. Infect. por A.flav/parasit toxicog.	% A.flavus/ parasiticus toxicog.
2	50	100	32	64	25	50
149	50	100	35	70	29	58
210	50	100	37	74	46	92
215	50	100	4	8	0	0
238	50	100	33	66	17	34
245	50	100	12	24	13	26
266	50	100	28	56	20	40
269	50	100	13	26	8	16
274	50	100	8	16	13	26
293	50	100	12	24	10	20
298	50	100	14	28	15	30
321	50	100	0	0	0	0
327	50	100	22	44	18	36
335	50	100	33	66	20	40
346	50	100	8	16	0	0
355	50	100	26	52	16	32
367	50	100	0	0	4	8
368	50	100	2	4	3	6
369	47	94	7	14	4	8
370	50	100	25	50	25	50
372	50	100	31	62	0	0
377	50	100	11	22	1	2
378	50	100	32	64	36	72
388	50	100	4	8	9	18
393	50	100	0	0	0	0
396	50	100	2	4	0	0
399	50	100	24	48	30	60
401	49	98	11	22	14	28
432	50	100	41	82	41	82
433	50	100	5	10	5	10
437	50	100	44	88	39	78
440	50	100	43	86	45	90
441	48	96	36	72	13	26
481	50	100	15	30	0	0
496	50	100	28	56	16	32
597	50	100	13	26	8	16
667	50	100	14	28	11	22

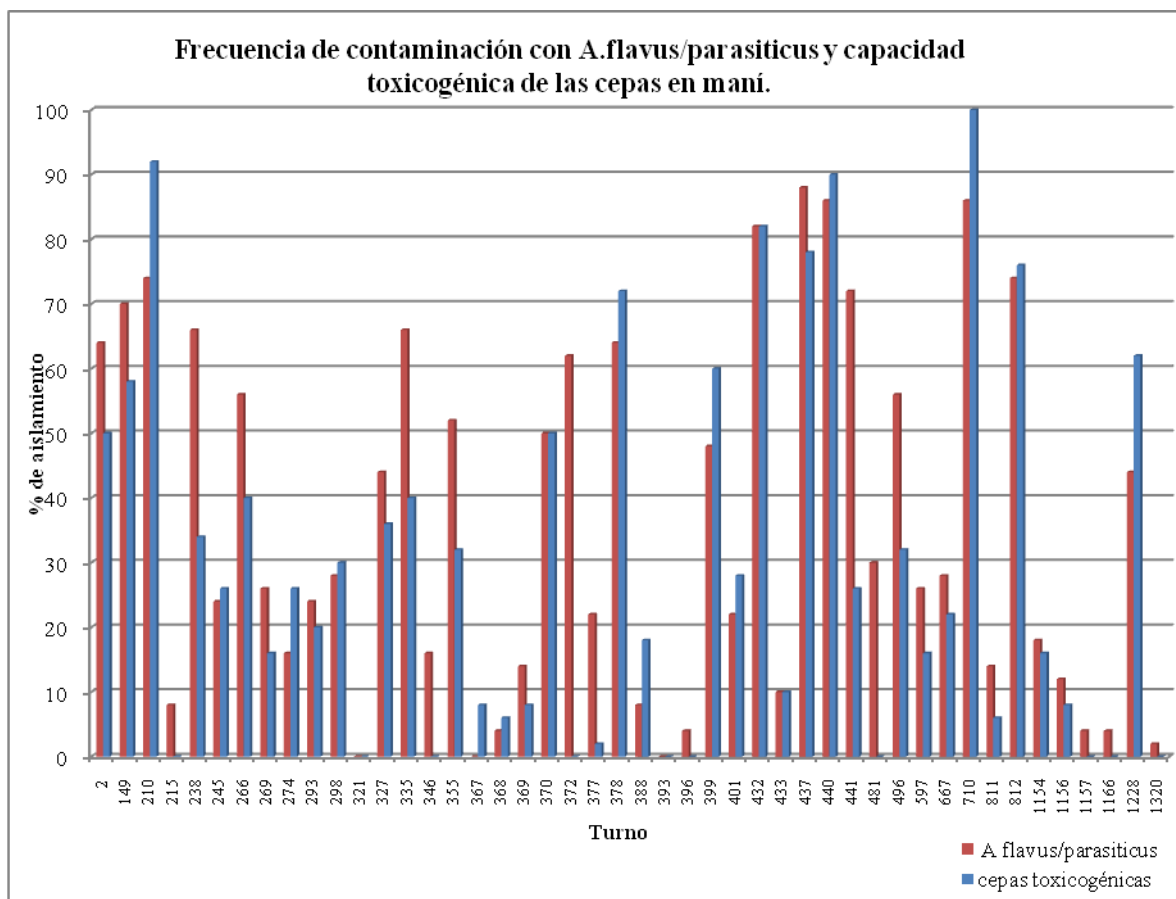
710	50	100	43	86	50	100
811	50	100	7	14	3	6
812	50	100	37	74	38	76
1154	50	100	9	18	8	16
1156	50	100	6	12	4	8
1157	50	100	2	4	0	0
1166	50	100	2	4	0	0
1228	50	100	22	44	31	62
1320	50	100	1	2	0	0

La detección de *A. flavus/parasiticus* toxicogénicos fue realizada en placas con medio de cultivo AFPA, donde las cepas toxicogénicas se observaban en el envés con una coloración anaranjada brillante difundida en el medio de cultivo (*Figura N°28 A, B*).

Estos resultados indican que un gran porcentaje de las muestras presentan contaminación con cepas toxicogénicas, este dato es indicativo que podría haber una potencial contaminación con aflatoxinas. Sin embargo la confirmación de la presencia de la toxina debe realizarse por métodos químicos, ya que la presencia del hongo no asegura la contaminación con la micotoxina, esto es debido a que las condiciones ambientales pueden no ser las adecuadas para dicha producción pero si para el crecimiento fúngico.

Aún cuando el maní cosechado no haya presentado contaminación por aflatoxinas, el transporte de inóculo desde el campo al lugar de almacenamiento, podría ocasionar problemas de contaminación con aflatoxinas si no se cumplen las condiciones adecuadas, fundamentalmente aw y temperatura durante esa etapa.

Los resultados obtenidos demuestran que 36 muestras de las 46 totales contenían cepas aflatoxicogénicas (*Tabla N° 12*). El porcentaje de cepas aflatoxicogénicas fue variable entre las muestras positivas con rangos entre 2 y 100% (*Figura N° 29*).



**Figura N° 29: Frecuencia de contaminación con *A. flavus/parasiticus* y capacidad toxicogénicas de las cepas aisladas**

## **5. VI. Correlaciones entre diversos factores que podrían afectar la contaminación del maní con aflatoxinas**

Para determinar si existió correlación entre los valores de porcentaje de humedad, daños de los granos, frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* y la contaminación con aflatoxinas se realizaron análisis estadísticos de correlación utilizando el coeficiente de Pearson.

Los resultados obtenidos demostraron:

1. Se encontró correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos helados, esto podría deberse a que al estar helado el grano, las defensas del mismo disminuyen, entonces esto favorecería al crecimiento del hongo aflatoxicogénico y a la producción de aflatoxinas. Esto quiere decir que a medida que aumenta el porcentaje de granos helados, también aumenta el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus*.
2. No se encontró correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* con porcentaje de humedad, con porcentaje de moho interno, daños por insectos, granos brotados, ardidos, podridos, moho externo, manchados, granos descascarados, ni con los niveles de aflatoxinas.

3. Tampoco se encontró correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de granos descascarados y el nivel de aflatoxinas ni entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* toxicogénicos y los niveles de aflatoxinas.

Si bien el número de muestras analizadas fue bajo podemos concluir que el maní a cosecha presenta una incidencia de contaminación con aflatoxinas bajo.

Estos resultados coinciden con estudios previos donde se ha demostrado que las condiciones de campo en nuestro país en general, salvo años con condiciones climáticas inductivas, no son apropiadas para la contaminación con aflatoxinas (Barros, G., 2006). El problema suele presentarse esporádicamente en algunas campañas y dentro de un mismo año en algún campo en particular, tal lo mostrado en este estudio, donde se encontraron algunas muestras con niveles muy elevados de aflatoxinas.

En general las muestras recibidas en la planta presentaban niveles de daños y otros parámetros que no se correlacionaron con la infección con *Aspergillus flavus/parasiticus* y la contaminación con aflatoxinas.

Es de destacar que uno de los parámetros importantes, donde si se encontró correlación es la presencia de frutos helados donde los mismos han perdido la capacidad de defenderse frente a la infección fúngica y su posterior contaminación con aflatoxinas.





## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

- ★ Se encontró un bajo porcentaje de muestras contaminadas con aflatoxinas.
- ★ Un alto porcentaje de muestras estaban infectadas por *A. flavus/parasiticus* y dentro de éstas una elevada cantidad de cepas aflatoxicogénicas, pero a campo no se dieron las condiciones para la producción de toxina en el maní.
- ★ No se encontró correlación entre todos los parámetros evaluados, excepto en el porcentaje de granos helados y la infección con *A. flavus/parasiticus*.
- ★ En las muestras de esta campaña agrícola, algunos campos presentaron una contaminación con aflatoxinas muy superior a los niveles permitidos, aún en años que son considerados no inductivos, por lo tanto hay que tener en cuenta cada campo en particular.
- ★ Los niveles de infección con *A. flavus/parasiticus* son muy importantes de tener en cuenta dado que este inóculo permanece en los frutos durante el almacenamiento y si las condiciones son propicias los niveles de aflatoxinas pueden elevarse considerablemente, si no se tienen buenas prácticas.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Abdel Rahman, A (1982). Compositional study on some Egyptian peanut varieties. Rev. Ital. Delle Sostanze Grasse 59:287-288
- ✓ AGRISCIENTIA, 2004. Vol.XXI (2): 85-88.
- ✓ Alexopoulos Constantine J., 1985. Introducción a la Micología. Ediciones Omega, SA. Barcelona, (1985).
- ✓ Barros, G. (2006). Ecofisiología y diversidad genética de *Aspergillus* sección *Flavi* aislados de suelo de la zona manisera de la provincia de Córdoba. Tesis de doctorado. UNRC.
- ✓ Bennett, J. W., and L.S. Lee (1979). Mycotoxins: their biosynthesis in fungi-aflatoxins and others bisfuranoids. J. Food Prot. 42:805-809.
- ✓ Bhatnagar, D. Cleveland, T.E. and Ehrlich, K.C. (2003). Molecular genetics analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Biotechnol. 61: 83-93.
- ✓ Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. and Cleceland, T.E., (1992). Oxidation-reduction reactions in byosynthesis of secondary metabolites. In: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B. and Arora, D.K., eds. New York: Marcel Dekker, pp. 255-286.
- ✓ Bilgrami, K.S. and Sinha, K.K. (1992). Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In: Handbook in Applied Mycology Vol 5, Micotoxins in Ecological Sitems. Bratnagar, D., Lillehoj, E. and Arora, D.K. (Eds.), pp. 255-286. Dekker, Basel, USA.
- ✓ Bragachini, M. A. (1994). Maní: implantación, cuidados culturales, cosecha, secado y almacenaje. INTA-SAGyP.
- ✓ Bu'Lock, J.D. (1965). The biosynthesis of natural products. MacGrawHill, New York, USA.
- ✓ Buchanan, R.L.Jr, and Ayres, J.C. (1975). Effect of initial pH on aflatoxin production. Appl. Microbiol. 30: 1050-1051.
- ✓ Buchi, G. y Rae, I.D. (1969). The structure and chemistry of aflatoxins. En: Aflatoxins. L.A. Goldblatt (ed.) Academic Press, New York, USA, pp. 55-75.
- ✓ Catey, C.G., Nuang, Z.G., Sarr, A.B., Clement, B.A. y Phililips, T.D. (1994). Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M1 in milk. J. Dairy Science 77:1223-1231.
- ✓ Chang, P.K., Bennett, J.W. and Cotty, P.J. (2001). Association of aflatoxin biosynthesis and esclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia. 153: 41-48.
- ✓ Cole, R.J. and Cotty, P.J. (1990). Biocontrol of aflatoxin production by using biocompetitive agent. In: A. Perspective of aflatoxin in Field Crops and Animal Food Products in the United States. Robens, J.R. (Ed.), pp. 62-66. Agricultural Research Service, Beltsuille, USA.

- ✓ Commission of the European Communities (2006). Commission regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official J. of European Union, L.364:5-24.
- ✓ Cotty, P.J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *A. flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808-814.
- ✓ Cotty, P.J. (1992). Use a native *Aspergillus flavus* strains to prevent aflatoxin contamination. United States Patent 5.171.686
- ✓ Cotty, P.J. (1994). Influence of field application of an atoxigenic strain of *A. flavus* infection cotton bolls and on aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84: 1270-1277.
- ✓ Cotty, P.J., Bayman, P. and Bhatnagar, D. (1990). Two potential mechanisms by which atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* prevent toxigenic strains from contaminating cottonseed. *Phytopathology* 80: 94
- ✓ Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S and Elias, K.S. (1994). Agricultura, aflatoxins and *Aspergillus*. In: *The Genus Aspergillus*. Powell, K.A., Renwich, A. and Peberdy, J.F. (Eds.), pp. 1-28. Plenum Press, New York, USA.
- ✓ Craufurd, P.Q., Prasad, P.V.V., Kakani, V.G., Wheeler, T.R. and Nigam, S.N. (2003). Heat tolerance in groundnut. *Field Crop Res.* 80: 63-67.
- ✓ Davis, N.D. and Diener, U.L. (1983). Biology of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, some characteristics of toxigenic and nontoxigenics isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In: *Aflatoxins and Aspergillus flavus* in corn. Diener, U.L., Asquith, R.L. and Dickens, J.W. (Eds.), pp. 1-5. Auburn University, Auburn, USA.
- ✓ Debets, A.J.M. (1998). Parasexuality in fungi: mechanisms and significance in wild populations. In: *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. Bridge, P., Couteaudier, Y., and Clarkson, J.M. (Eds), pp. 41-52. CAB International, Wallingford, UK.
- ✓ Demain, A.L. and Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69: 1-39.
- ✓ Diener, U.L. and Davis, N.D. (1966). Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 56: 1390-1393.
- ✓ Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders T.H., Payne, G.A., Lee, L.S. and Klich, M.A. (1987). Epidemiology of aflatoxin formation by *A. flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 249-270
- ✓ Diener, U.L., Dettit, R.E. and Cole, R.J. (1982). Aflatoxins and other mycotoxin in peanuts. In: *Peanut Science and Technology*. Pattee, H.E. and Young, C.T. (Eds.), pp. 486-519. Amer. Peanut Res. Edu. Soc., Yoakum, Tx, USA.
- ✓ Dowd, P.F. (1992). Insect interactions with mycotoxin-producing fungi and their hosts. In: *Handbook of Applied Mycology Vol. 5. Mycotoxins in Ecological Systems*. Bhatnagar, D., Lillehoj, E., and Arora, D.K. (Eds.), pp. 137-155. Marcel Dekker, Basel, USA.

- ✓ Drummond, J. and Pinnock, D.E. (1990). Aflatoxin production by entomopathogenic isolates of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. J. Invertebr. Pathol. 55: 332-336.
- ✓ Dutton, M.F. and Hesthote, J.G. (1966). Two new hydroxy aflatoxinas. Biochem. J. 100: 21-22.
- ✓ Egel, D.S., P. J. Cotty, and K.S. Elias (1994). Relationship among isolates of *Aspergillus* sect. *Flavi* that vary in aflatoxin production. Phytopathology 84:906-912.
- ✓ Ehrlich, K.C., Cary, J.W. and Montalbano, B.G (1999). Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthesis pathway regulatory protein AFLR. Biochim. Biophys. Acta 1444: 412-417.
- ✓ Etzel, R.A. (2002). Mycotoxins. Journal of the American Medical Association 287: 425-427.
- ✓ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (1997). Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium, 64: 7-28.
- ✓ Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2000). Neopetromyces gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. Studies in Mycology 45: 201-207.
- ✓ Frisvad, J.C., Samson, R.A. and Smedsgaard, J. (2004). Emericella astellata, a new producer of aflatoxin B1, B2 and sterigmatocystin. Lett. Appl. Microbiol. 38: 440-445.
- ✓ Frobish, R.A., B.D. Bradley, D.D. Wagner, P.E. Long-Bradley, and H. Hairston (1986). Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. J. Food Prot: 49:781-785.
- ✓ Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., Pitt, J.I. and Samson, R.A. (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. Samson, R.A. and Pitt, J.I. (Eds.), pp. 55-62. Plenum Publ., New York, USA.
- ✓ Giandana, E. (1994). Descripción botánica. En: Maní, Implantación, Cuidados culturales, Cosecha, Secado y Almacenaje. Bragachini, M. (Ed.), p. 151 EEA INTA Manfredi, Córdoba, Argentina.
- ✓ Gourama, H. and Bullerman, L.B. (1995). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of Concern in Foods and Feeds: A review. J. Food Prot. 58: 1395-1404.
- ✓ Gregory, W.C., Krapovickas, A. Y Gregory, M.P. (1980). Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. En: Advances in legume science. R.J. Summerfield y A.H. Bunting (eds.) New York. Plenum, pp. 91-136.
- ✓ Griffin, G.J., and Garren, K.H. (1976). Colonization of rye green manure and peanut fruit debris by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* group in field soils. Appl. Environ. Microbiol. 32: 28-32.
- ✓ Hara, S., Kitamoto, K and Gomi, K. (1992). New developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Biology and Industrial*

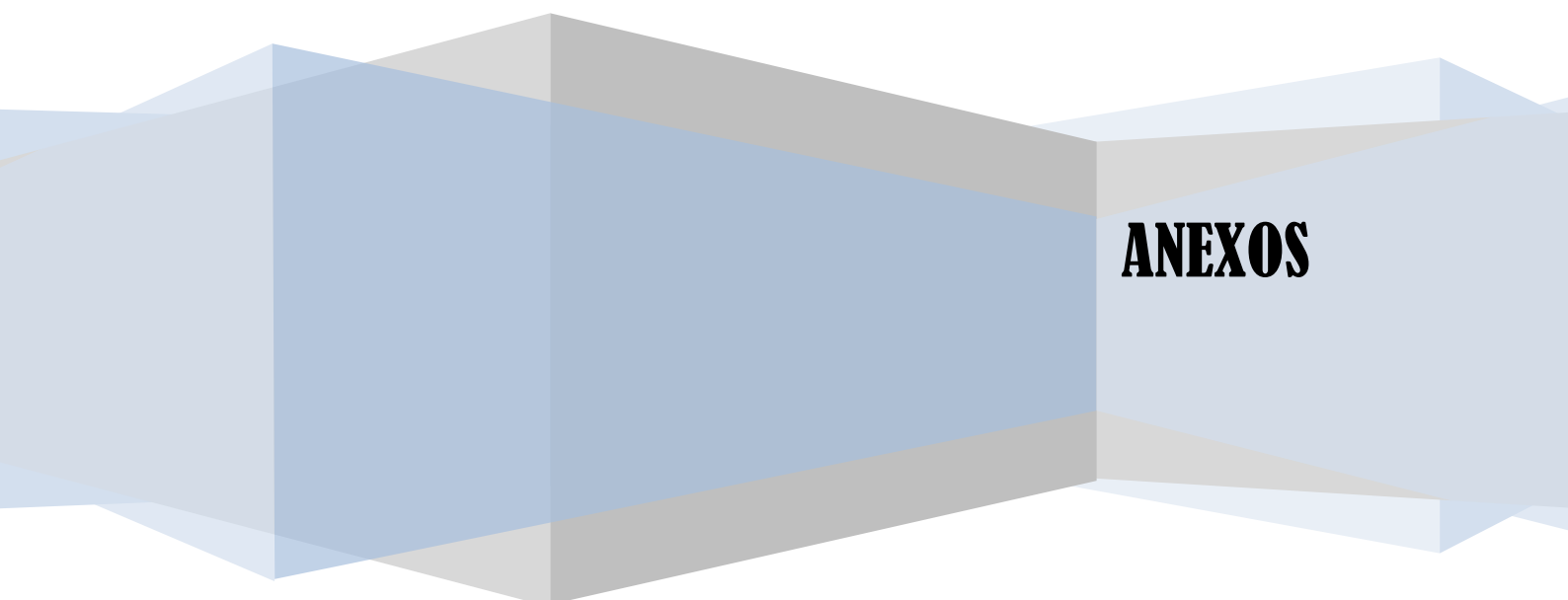
- Applications. Bennett, J.W. and Klich, M.A. (Eds.), pp. 133-153. Butterworth-Heinemann, Boston, USA.
- ✓ Hasan, H.A. (2001). Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. *Acta Microbiol. Immunol.* 48: 27-37.
  - ✓ Hill, R.A., Brankenship, P.D., Cole, R.J. and Sanders, T.H. (1983). Effect of soil moisture and temperature of preharvest invasion of peanut by the *A. flavus* group and subsequent aflatoxin development. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 628-633.
  - ✓ Horn, B.W. (1997). *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. *Mycotaxon* 61: 185-191.
  - ✓ Horn, B.W., Dorner, J.W., Greene, R.L., Blankenship, P.D. and Cole, R.J. (1994). Effect of *Aspergillus parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. *Mycopathologia* 125: 179-191.
  - ✓ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (2004). Fuente de Internet: [www.inta.gov.ar](http://www.inta.gov.ar)
  - ✓ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (2005). Fuente de Internet: [www.inta.gov.ar](http://www.inta.gov.ar)
  - ✓ International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to human. (Lyon France: IARC), Vol 56 pp. 257-263.
  - ✓ Ito, Y. Peterson, S.W., Wichlow, D.T. and Goto, T. (2001). *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycol. Res.* 105: 233-239.
  - ✓ Jarvis, B. (1971). Factors affecting the production of micotoxins. *J. Appl. Bact.* 34: 199-213.
  - ✓ King, A.D., Hocking A.D. and Pitt J.I. (1979). Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:959-964.
  - ✓ Klich, M.A. (2002a). Biogeography of *Aspergillus* species in oils and litter. *Mycologia* 94:21-27.
  - ✓ Klich, M.A. (2002b). Identification of Common *Aspergillus* Species. Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
  - ✓ Klich, M.A. and Pitt, J.I. (1988). Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO, Division of food research Sydney Academic Press, Australia.
  - ✓ Klich, M.A., Cary, J.W., Beltz, S.B. and Bennett, C.A. (2003). Phylogenetic and morphological analysis of *Aspergillus ochraceoroseus*. *Mycologia* 95: 1252-1260.
  - ✓ Kozakiewicz, Z., 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* N° 161, C.A.B. International Mycological Institute.
  - ✓ Lancaster, M.C., Jenkins, F.P. T Philp, M. (1961). Studies on aflatoxin detoxification in shelled corn by ensiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18: 640.

- ✓ Landers, K.E., Davis, N.D. and Diener, U.L. (1967). Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus Flavus* in Peanut. *Phytopathology* 57: 1086-1090.
- ✓ Lisker, N., Michaeli, R., and Frank, Z.R. (1993). Mycotoxigenic potential of *A. flavus* strains isolated from ground nuts growing in Israel. *Mycopathologia* 122: 177-183.
- ✓ Lynch, R.E. and Wilson, D.M. (1991). Enhanced infection of peanut, *Arachis hypogaea* L., seeds by *A. flavus* group fungi due to external scarification of peanut pods by lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller). *Peanut Sci.* 18: 110-116.
- ✓ Maggon, K.K., Gupta, S.K. and Venkita Subramanian, T.A. (1997). Biosynthesis of aflatoxins. *Bacterio. Rev.* 41: 822.
- ✓ Marín, S., Sanchis, V., Campanis, E., Ramos, A.J. and Magan, N. (1998). Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycol. Res.* 120: 959-964.
- ✓ Meyers, D.M., O'Brien, G., Du, W.L., Bhatnagar, D. and Payne, G.A. (1998). Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin- appl. *Environ. Microbiol.* 64: 3713-3717.
- ✓ Micheli, P.A. (1729). *Nova plantarum genera. Florentiae.*
- ✓ Moss M.O. (1996). Mycotoxins. Centenary review. *Mycol. Res.*, 100: 513-523.
- ✓ Moss, J.P. and Ramanatha Rao, V., 1995. The peanut-reproductive development to plant maturity. In: *Advances en Peanut Science.* Pattee H.E. and Stalker, H.T. (eds.). In Peanut Research and Education Society, Inc., Stilwater, OK, pp: 1-13.
- ✓ Northolt, M.D., van Egmond H.P., Paulsch W.E. (1979). Penicilic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.*, 42: 476-484.
- ✓ Payne, G.A. and Brown, M.P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 329-362.
- ✓ Peterson, S.W. (2000). Phylogenetic relationship in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification.* R.A. Samson y J.I. Pitt (eds). Harwood Academic Publishers, Reading, U.K., pp.323-355.
- ✓ Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W. and Goto, T. (2001). *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation within its sibling species, *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- ✓ Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage.* CSIRO Division of Food Science and Technology Sydney Academic Press., Australia.
- ✓ Pitt, J.I. and Hocking, A.D., (eds.) (1997). *Fungi and food spoilage. Capitulo 8. Aspergillus and Related Teleomorphs.* CSIRO Division of Food Science and Technology, North Ryde, New South Wales, Australia, pp: 339-416.
- ✓ Pitt, J.I.; Hocking A.D. and Glenn D.R. (1983). An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Appl. Bacteriol.* 54:109-114.



- ✓ Pitt, J.W., Dyer, S.K. and McCammon, S. (1991). Systemic invasion of developing peanut plants by *A. flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 13:16-20.
- ✓ Pontecorvo, G.(1956). The parasexual cycle in fungi. Ann. Rev. Microbiol. 10:393-400.
- ✓ Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*, pp. 686. Williams and Wilkins, Co., Baltimore, MA, USA.
- ✓ Rinaldi, M.G. (1983). Invasive aspergillosis. Rev. Infec.Dis. 5: 1061-1077.
- ✓ Roberts, D.W. and Yendol, W.G. (1971). Use of fungi for microbial control of insects. In: Microbial Control of Insects and Mites. Burges, H.S. and Burges, N.W. (Eds), pp. 125-149. Academic Press, New York, USA.
- ✓ Rodriguez, M.M.; Basha, S.M. y Sanders, T.M. (1989). Maturity and roasting of peanut as related to precursors of roasted flavour. J. Agric. Food Chem. 37:760-765
- ✓ Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Kawasugi, S., Manabe, M. and Buangsuwon, D. (1986). Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *A. flavus* isolate from soils in Thailand. Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol. 24: 41-46.
- ✓ Salazar, A.J. y Young, C.T. (1984). An azomethine H automated method for boron determination in peanuts. Journal of Food Science 49:72-74
- ✓ Samson, R.A. (1979). A compilation of the *Aspergilli* described since 1965. Studies in mycology. 18: 1-38.
- ✓ Samson, R.A., van Reenen-Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2000). Introduction to Food and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science, The Netherlands.
- ✓ Sanders, T.H., Cole, R.J., Branquenship, P.D and Hill, R.A. (1985). Relation of environmental stress duration to *A. flavus* invasion and aflatoxin production in preharvest peanut. Sci. 12: 90-93.
- ✓ Sargeant, K., Sheridan, A. O'Kelly, J. Carnaghan, R.B.A. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 192: 1096-1097.
- ✓ Savage, G.P. y Keenan, J.I. (1994). The composition and nutritive value of groundnut Kernels. A scientific basis for improvement. J. samrtt (ed), Chapman & Hall, St Edmundsbury Press, Great Britain, pp. 173-205.
- ✓ Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (2007) Estimaciones Agrícolas mensuales. Cifras Oficiales al 16/05/07. Campaña Agrícola 2006/07. Disponible: [www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar)
- ✓ Sidhu, G.S. (2002). Mycotoxins genetics and genes clusters. Eur. J. Plant Pathol. 108: 705-711.
- ✓ St. Leger, R.J., Steven, E., Screen, S.E. and Pirzadeh, B.S. (2000). Lack of host specialisation in *Aspergillus flavus*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 320-324.
- ✓ Townsend, C.A. (1997). Progress towards a biosynthetic rationale of the aflatoxin pathway. Pure Appl. Chem. 58: 227-238.
- ✓ Trucksess, M.W., Stack, M.E. and Nesheim, S. (1994). Multifunctional column with chromatography for determination of aflatoxins B1, B2, G1 y G2 in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts. Collaborative study. J. AOAC Int. 77: 1512-1520.

- ✓ van del Hondel, C.A.M.J.J, Punt, P.J. and van Gorcom, R.F.M. (1992). Production of extracellular proteins by filamentous fungus *Aspergillus*. Anton. Leeuwen. 61: 153-160.
- ✓ Varga, J., Juhász, A., Kevei, F. and Kozakiewicz, Z. (2004). Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* Species. Eur. J. plant Pathol. 110: 627-640.
- ✓ Wadhvani, K. and Srivastava, M. (1985). *Aspergillus flavus* Link as an antagonist against aphids of crucifers. Acta Bot. Indica. 13: 281-282.
- ✓ Wallerstein, I.S., Merin, U. y Rosenthal, I. (1989). Comparison of Kernels of three Virginia-type peanut cultivars. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 22:179-181.
- ✓ Ward, P.P., Lo, J.Y., Ducke, M., May, G.S, Headon, D.R and Connely, O.M. (1992). Production of biologically active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. Biol. Technol. 10: 784-789.
- ✓ Wicklow, D.T. (1990).adaptation in *Aspergillus flavus*. Trans. Mycol. Soc. jpn. 31: 511-523.
- ✓ Willets, H.J. and Bullock, S. (1992). Developmental biology of sclerotia. Mycol. Res. 96: 801-816.
- ✓ Wilson, D. (1995). Management of Micotoxins in Peanut. Departamento of Plant Pathology. University of Georgia, Tifton, USA.
- ✓ [www.tesma.com.ar](http://www.tesma.com.ar)
- ✓ Yu, J. Chang, P.K. Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P. and Bennett, J.W., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Applied Environment Microbiology. 70: 1253-1262.
- ✓ Yu, J.,Chang, P.K., Cary, J.W., Wright, M. , Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A. and Linz J.E. (1995). Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Appl. Environ. Microbial. 61: 2365-2371.
- ✓ Yu, J.,Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A. and Linz J.E., Woloshuk, C.P. and Bennett, J.W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbial. 70: 1253-1262.



**ANEXOS**

**8. ANEXOS****Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de humedad en la muestra de maní****Pearson Product Moment Correlation** Martes, Noviembre 18, 2008, 02:36:50 p.m.**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

	<b>% contam Aflavus parasiticus</b>
Humedad	0,109
	0,472
	46
% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos helados****Pearson Product Moment Correlation** Martes, Noviembre 18, 2008, 02:37:34 p.m.**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

	<b>Helados</b>
% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	0,312
	0,0349
	46
Helados	

The pair(s) of variables with positive correlation coefficients and P values below 0,050 tend to increase together. For the pairs with negative correlation coefficients and P values below 0,050, one variable tends to decrease while the other increases. For pairs with P values greater than 0,050, there is no significant relationship between the two variables.

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos con moho interno**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:38:15 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Moho interno**

% contam. *A. flavus/parasiticus*    0,00707

0,963

46

Moho interno

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table (P > 0,050).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos dañados por insectos**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:38:53 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Daño insectos**

% contam <i>A. flavus/parasiticus</i>	-0,213
	0,155
	46

Daño insectos

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos brotados**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:39:24 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Brotados**

% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	0,180
	0,231
	46

Brotados

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos ardidos**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:39:52 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Ardidos**

% contam. *A. flavus/parasiticus*-0,0249

0,869

46

Ardidos

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table (P > 0,050).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos podridos**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:40:25 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Podridos**

% contam. *A. flavus/parasiticus* -0,105

0,486

46

Podridos

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table (P > 0,050).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos con moho externo**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:41:01 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Moho externo**

% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	0,0275
	0,856
	46

Moho externo

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos manchados**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:42:36 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Manchados**

% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	0,154
	0,306
	46

Manchados

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).



**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y los niveles de aflatoxinas en las muestras de maní**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 02:52:00 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Aflatoxina**

% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	-0,0980
	0,517
	46

Aflatoxina

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table (P > 0,050).

**Correlación entre el porcentaje de infección por *A. flavus/parasiticus* y el porcentaje de granos descascarados en las muestras de maní**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 03:09:18 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

**Granos descascarados**

% contam. <i>A. flavus/parasiticus</i>	-0,0644
	0,671
	46

Granos descascarados

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table (P > 0,050).

**Correlación entre el porcentaje de granos descascarados y los niveles de aflatoxinas en las muestras de maní**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 03:10:00 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

	<b>Aflatoxina</b>
Granos descascarados	-0,152
	0,313
	46

Aflatoxina

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).

**Correlación entre el porcentaje de A.flavus/parasiticus toxicogénicos y los niveles de aflatoxinas en las muestras de maní**

**Pearson Product Moment Correlation**      Martes, Noviembre 18, 2008, 03:16:55 p.m.

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Cell Contents:

Correlation Coefficient

P Value

Number of Samples

	<b>% aflatoxicogénicos</b>
Aflatoxina	-0,0634
	0,675
	46

% aflatoxicogénicos

There are no significant relationships between any pair of variables in the correlation table ( $P > 0,050$ ).