



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

# ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS ASOCIADAS A FUSARIOSIS EN TRIGO

---

**Cinthia Gabriela Pendás Custodio**

**Tesis de Maestría**

Presentada como requisito para el título de

**Magíster**

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Mayo 2024

# **Estrategias analíticas para la detección y cuantificación de las micotoxinas asociadas a Fusariosis en trigo**

## **Tribunal**

Nombre integrante del tribunal: Dra. Natalia Besil

Nombre integrante del tribunal: Dra. Gabriela Garmendia

Nombre integrante del tribunal: Dra. Carolina Leoni

Director de Tesis/Académico: Dra. Alejandra Rodríguez

Cotutor de Tesis/Académico: Dra. Lucía Pareja

## Agradecimientos

*En primer lugar, quisiera agradecer a mi padre, por su apoyo constante a lo largo de mi vida. Por todos los consejos, por permitirme elegir sin restricciones mi camino en la vida, estar a mi lado en los tropezones, impulsándome a seguir adelante y en tus palabras buscar lo que me haga feliz.*

*A mis amigas, Cami, Flo, Lu, Lule, Mari, Ani, Luchi y Emi, por el aguante todos estos años, por su comprensión, por sus consejos, por creer en mí cuando no me creía capaz, y no dejarme bajar los brazos, por las charlas y las risas, los momentos de locura, por estar siempre a mi lado.*

*A mi directora de tesis, Ale, gracias por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto y esta maestría, por integrarme a tu grupo de trabajo. Muchas gracias por creer en mí, por tu guía, tu buena onda, por compartir momentos de risas y locura, ha sido una gran experiencia transitar este camino contigo. A David, gracias por tu paciencia al enseñarme a usar los equipos, por guiarme en el trabajo del laboratorio, y siempre estar dispuesto a darme una mano. Vicky, muchísimas gracias por todo tu apoyo en estos cinco años, por tus consejos, por todas las charlas compartidas, y por darnos ánimo mutuamente.*

*A Lucía Pareja, muchas gracias por permitirme trabajar junto a tu grupo y aceptar ser mi cotutora. Valoro muchísimo tus consejos y opiniones, fue un gusto trabajar contigo. A Agustina Muela, sin quien no habría logrado hacer todos los ensayos, muchas gracias por toda tu buena onda y el esfuerzo para que saliera el trabajo.*

*A mis compañeros de trabajo del LAC de FVET. Agradecerles por el aguante y el apoyo a lo largo de este trabajo. A mi jefa Paula, por su buena disposición, aliento y cuidarme todos estos años. A Pati, Euge y Lau, gracias por apoyarme siempre, por las risas y momentos mágicos, por siempre levantarme los ánimos, por las charlas de la vida y más.*

*A PEDECIBA y ANII por su financiación, permitiendo que este trabajo fuera posible.*

*A mi pequeña, Arya, por ser mi apoyo emocional todos estos años.*

*A mi mamá, por siempre en mis pensamientos y en mi corazón.*

# Estrategias analíticas para la detección y cuantificación de las micotoxinas asociadas a Fusariosis en trigo

Cinthia Gabriela Pendás Custodio

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTOR: Dra. Alejandra Rodríguez<sup>1</sup> y Dra. Lucía Pareja<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Química BioAnalítica, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República; <sup>2</sup> Departamento de Química del Litoral Cenur Litoral Norte sede Paysandú, Universidad de la República)

## Resumen

En Uruguay, el trigo es el principal cultivo de invierno, representando entre un 50 y un 60% de la superficie cerealera del país. La Fusariosis de la Espiga (FE) es una de las principales limitaciones en la producción de trigo. Esta enfermedad es principalmente atribuida a hongos pertenecientes al complejo de especies de *Fusarium graminearum* (CEFG), las cuales tienen la capacidad genética de producir micotoxinas, compuestos con actividad tóxica tanto para humanos como animales.

Dentro de las micotoxinas producidas por *Fusarium*, las de principal interés en estos cultivos son los tricotecenos tipo B, deoxinivalenol (DON), 3-acetildeoxinivalenol (3ADON), 15-acetildeoxinivalenol (15ADON), nivalenol (NIV) y la zearalenona (ZEA). La presencia de estos contaminantes en alimentos y piensos constituyen un peligro a la salud pública, siendo uno de los contaminantes de mayor prevalencia en la cadena alimenticia.

En el marco del Proyecto Innovagro Inocuidad FSA\_I\_2017\_1\_139442 se estudió la FE en varios aspectos, dentro de los cuales se encuentra la evaluación de contenido de micotoxinas en muestras de granos de trigo. En ese marco se originó este trabajo de tesis, en el cual se propuso el desarrollo y validación de un método analítico,

empleando HPLC-MS/MS, para la determinación del perfil de micotoxinas en granos de trigo. El método validado fue empleado en la caracterización de micotoxinas de dos grupos de muestras.

El primer grupo corresponde a 71 muestras de granos de trigo, de diferentes cultivares, colectados durante la zafra de 2018, provenientes de campos de siete localidades diferentes del área productora del Uruguay.

El segundo corresponde a granos de trigo derivados de ensayos dirigidos, realizados en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) La Estanzuela, en los años 2018 y 2019. Dichos experimentos consistieron en la evaluación de distintas formas de manejo de la enfermedad, tales como resistencia del cultivar de trigo a FE, eficiencia del control de fungicidas seleccionado y momento de aplicación de los mismos. El ensayo fue realizado en 3 temporadas, una de baja enfermedad en 2018 ( $n= 31$  muestras), una de alta enfermedad en primera etapa del año 2019 ( $n= 56$ ), y una enfermedad intermedia en la segunda etapa de 2019 ( $n= 28$ ).

Se desarrollaron dos metodologías, la primera (método 1) basada en la propuesta de Sulyok, Malachová y colaboradores. La segunda metodología (método 2), se desarrolló en colaboración con el Departamento de Química del Litoral (DQL), Cenur Litoral Norte en Paysandú, previamente evaluada para el análisis de fungicidas, ZEA y DON. Se extendió el alcance del método para los otros 3 compuestos de interés, realizando la optimización y validación de la metodología.

Como resultado, se desarrolló y validó una metodología analítica (método 2) para la determinación de las micotoxinas DON, 3ADON, 15ADON, NIV y ZEA. Los resultados de la validación fueron adecuados según los requerimientos sugeridos por las guías de validación de la Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria, DG SANTE, permitiendo emplearlo en el análisis de muestras de campo.

Del total de las 71 muestras de campo obtenidas de la zafra de 2018, se detectaron micotoxinas en 47 de ellas, siendo DON la micotoxina más prevalente, encontrándose en 46 de ellas, en un rango de concentración entre 102 y 10507  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En 9 muestras se cuantificó NIV entre 31 y 66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que ZEA se logró determinar en 6 muestras entre 104 a 5193  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se detectó 3ADON en una muestra, con una concentración de 67  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , no encontrándose 15ADON en ninguna de las muestras evaluadas. Se observó además la co-detección de micotoxinas; en donde 7 presentaron

DON y NIV, 4 DON y ZEA, una muestra presentó DON, NIV y ZEA, y otra DON, ZEA, y 3ADON.

Los cultivares susceptibles a FE demostraron un mayor número de muestras con micotoxinas, con concentraciones elevadas de DON, así como de ZEA. Los cultivares con moderada resistencia, tienen concentraciones en general menores. Una prueba ANOVA determinó que existen diferencias significativas entre los cultivares de trigo con respecto al contenido de DON.

Los resultados obtenidos para estas muestras permitieron realizar un relevamiento del perfil de micotoxinas presentes en la zafra 2018, que fue relacionado con la identificación de los hongos presentes en las mismas.

Por otro lado, se empleó el método desarrollado en ensayos dirigidos realizados en INIA que permitieron evaluar tres variables de estrategias de manejo de la FE en cuanto a su efecto en la producción de micotoxinas.

Se evaluaron un total de 84 muestras del 2019, correspondientes al período de alta enfermedad (temporada 1) y enfermedad intermedia (temporada 2), detectándose en ambos grupos de muestras las cinco micotoxinas.

En las muestras de la temporada 1 se obtuvo un porcentaje de contaminación de 100% para DON, 64% para 3ADON, 84% para 15ADON, 32% para NIV y 25% para ZEA. La mayor prevalencia de co-detección, fue observada para el DON y sus variables acetiladas 3ADON y 15ADON, que estuvieron presentes en un 36% de las muestras sin presencia de las otras micotoxinas evaluadas. En cuanto a las muestras obtenidas en la temporada 2, el porcentaje de contaminación fue de 100% para DON, 28% para 3ADON, 89% para 15ADON, 43% para NIV y 4% para ZEA. Se observó mayor co-detección, un 39%, para la combinación DON y 15ADON.

Los niveles más altos de contaminación con micotoxinas fueron observados en la temporada 1, de mayor enfermedad. En este caso, los niveles de DON estuvieron por encima de 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , el valor límite máximo según Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional. Un 18% de las muestras presentaron ZEA, a concentraciones mayores que 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , el límite para esta micotoxina en maíz según el decreto previamente mencionado.

En la temporada 2, caracterizada como de enfermedad intermedia, un 86% de las muestras presentaron concentraciones de DON por encima del límite máximo

establecido en nuestro país. Los niveles del resto de las micotoxinas fueron menores para esta temporada, en particular para ZEA, donde se detectó en una única muestra.

Los resultados obtenidos fueron valorados en el contexto de los ensayos realizados, donde se evaluó la relación entre el contenido de micotoxinas y diferentes cultivares de trigo, la influencia de la aplicación a campo de dos mezclas de fungicidas (PROSARO y SWING PLUS) y el efecto del momento de aplicación de estos (Z61, Z65 y Z71, según escala de Zadoks).

La información derivada de los resultados obtenidos nos permite conocer el perfil micotoxigénico asociado a las especies de hongo causales de la FE en nuestro país.

# Analytical strategies for the detection and quantification of the mycotoxins associated with Fusariosis in wheat.

Cinthia Gabriela Pendás Custodio

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

2024

DIRECTORS: Dra. Alejandra Rodríguez<sup>1</sup> y Dra. Lucía Pareja<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Departamento de Química BioAnalítica, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República; <sup>2</sup> Departamento de Química del Litoral Cenur Litoral Norte sede Paysandú, Universidad de la República)

## Abstract

In Uruguay, wheat is the main winter crop, representing between 50 and 60% of the country's cereal area. Fusarium Head Blight (FHB) is one of the main limitations in wheat production. This disease is mainly attributed to fungi belonging to the *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), which have the genetic capacity to produce mycotoxins, compounds with toxic activity for both humans and animals.

Among the mycotoxins produced by *Fusarium*, those of main interest in these crops are type B trichothecenes, deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3ADON), 15-acetyldeoxynivalenol (15ADON), nivalenol (NIV), and zearalenone (ZEA). The presence of these contaminants in food and feed constitutes a danger to public health, being one of the most prevalent contaminants in the food chain.

Within the framework of the Innovagro Safety Project FSA\_I\_2017\_1\_139442, the FHB study in several aspects was proposed, among which is the evaluation of mycotoxin content in wheat grain samples. On this basis, this thesis work was originated, proposing the development and validation of an analytical method, using HPLC-MS/MS, for the determination of the mycotoxins in wheat grain. The validated method was used in the mycotoxin characterization of two groups of samples.

The first group corresponds to 71 samples of wheat grains of different cultivars, collected during the 2018 harvest, coming from fields in seven different locations in the producing area of Uruguay.

The second corresponds to wheat grains derived from directed trials, carried out at the National Institute of Agricultural Research (INIA) La Estanzuela, in the years 2018 and 2019. These experiments consisted of the evaluation of different forms of disease management, such as resistance of the wheat cultivar to FHB, efficiency of fungicide control selected and time of their application. The trial was carried out in 3 periods, one of low disease in 2018 ( $n= 31$  samples), one of high disease in the first stage of 2019 ( $n= 56$ ), and an intermediate disease in the second stage of 2019 ( $n= 28$ ).

Two methodologies were developed, the first (method 1) based on the proposal of Sulyok, Malachová and collaborators. The second methodology (method 2) was developed in collaboration with the Department of Coastal Chemistry (DQL), Cenur Litoral Norte in Paysandú, previously evaluated for the analysis of fungicides, ZEA and DON. The scope of the method was extended to the other 3 compounds of interest, performing the optimization and validation of the methodology.

As a result, an analytical methodology (method 2) was developed and validated for the determination of the mycotoxins DON, 3ADON, 15ADON, NIV and ZEA. The validation results were adequate according to the requirements suggested by the validation guides of the General Directorate of Health and Food Safety, DG SANTE, allowing it to be used in the analysis of field samples.

Of the total of 71 field samples obtained from the 2018 harvest, 47 were positive for mycotoxins, with DON being the most prevalent mycotoxin, found in 46 of them, in a concentration range between 102 and 10507  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In 9 samples, NIV was quantified between 31 and 66  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , while ZEA was determined in 6 samples between 104 and 5193  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . 3ADON was detected in one sample, with a concentration of 67  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and 15ADON was not found in any of the samples evaluated. The co-occurrence of mycotoxins was also observed; where 7 presented DON and NIV, 4 DON and ZEA, one sample presented DON, NIV and ZEA, and another DON, ZEA, and 3ADON.

Cultivars susceptible to FHB demonstrated a larger number of positive samples, with higher concentrations of DON, as well as ZEA. Cultivars with moderate resistance have generally lower concentrations. An ANOVA test determined that there are significant differences between wheat cultivars with respect to DON content.

The results obtained from these samples allowed us to carry out a survey of the mycotoxin profile present in the 2018 harvest, which was related to the identification of the fungi present in them.

On the other hand, the analytical method was used in directed trials performed at INIA that allowed the evaluation of three variables of FHB management strategies in terms of their effect on mycotoxin production.

A total of 84 samples from 2019 were evaluated, corresponding to the period of high disease (season 1) and intermediate disease (season 2), with the five mycotoxins being detected in both groups of samples.

In the samples from season 1, a contamination percentage of 100% was obtained for DON, 64% for 3ADON, 84% for 15ADON, 32% for NIV and 25% for ZEA. The highest prevalence of co-occurrence was observed for DON and its acetylated variables 3ADON and 15ADON, which were present in 36% of the samples without the presence of the other mycotoxins evaluated. Regarding the samples obtained in season 2, the contamination percentage was 100% for DON, 28% for 3ADON, 89% for 15ADON, 43% for NIV and 4% for ZEA. Greater co-occurrence, 39%, was observed for the combination DON and 15ADON.

As expected, the highest levels of mycotoxin contamination were observed in season 1, with greater disease. In this case, the DON levels were above 1000 µg/kg, the maximum limit value according to Decree No. 155/006 of the National Food Regulations. An 18% of the samples presented ZEA at elevated concentration.

In season 2, characterized as intermediate disease, 86% of the samples presented DON concentrations above the maximum limit established in our country. The levels of the rest of the mycotoxins were lower for this time, particularly for ZEA, where it was detected in a single sample.

The results obtained were evaluated in the context of the tests carried out, where the relationship between the mycotoxin content and different wheat cultivars, the influence of the field application of two mixtures of fungicides (PROSARO and SWING PLUS) and the effect of the moment of their application (Z61, Z65 and Z71, according to Zadoks scale) was assessed.

The information derived from these results allows us to know the mycotoxigenic profile associated with the fungal species that cause FHB in our country.

# Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Fusariosis de la espiga .....	1
1.1.1 Ciclo de la enfermedad.....	2
1.1.2 Manejo de la enfermedad .....	5
1.2 Micotoxinas y alimentos.....	7
1.3 Micotoxinas de <i>Fusarium</i> .....	8
1.3.1 Tricotecenos.....	9
1.3.1.1 Deoxinivalenol (DON) .....	11
1.3.1.2 Metabolitos de DON: 3-acetil-deoxinivalenol y 15-acetil-deoxinivalenol (3ADON y 15ADON).....	13
1.3.1.3 Nivalenol (NIV).....	15
1.3.2 Zearalenona (ZEA).....	16
1.4 Micotoxinas modificadas.....	18
1.5 Co-detección y exposición .....	19
1.6 Regulaciones .....	22
1.7 Situación en Uruguay.....	27
1.8 Métodos de detección y cuantificación de micotoxinas .....	28
1.8.1 Muestreo .....	29
1.8.2 Transporte.....	30
1.8.3 Preparación de las muestras y procesamiento .....	31
1.8.4 Procedimientos de extracción .....	31
1.8.5 Limpieza de la muestra (clean-up) .....	32
1.8.6 Métodos de extracción y purificación .....	32
1.8.7 Método instrumental.....	33
1.8.7.1 Métodos de tamizaje.....	34
1.8.7.2 Métodos confirmatorios .....	35
1.9 Guías para la validación de métodos analíticos.....	36
1.9.1 Parámetros de validación de métodos analíticos .....	36
1.9.2 Criterios para la identificación y confirmación del analito .....	39
1.9.2.1 Requisitos para la cromatografía .....	39
1.9.2.2 Requisitos para espectrometría de masas (MS).....	39
1.10 Proyecto INNOVAGRO.....	39
1.11 Hipótesis .....	40
2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION .....	41
2.1 Objetivo general.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1 Equipos.....	42
3.1.1 Sistema instrumental analítico .....	42
3.1.2 Otros equipos .....	42
3.2 Materiales y reactivos .....	43
3.3 Preparación de estándares.....	43
3.4 Muestras de Trigo .....	44
3.4.1 Muestras de trigo zafra 2018.....	44
3.4.2 Muestras de trigo provenientes de ensayos de manejo de FE.....	44
3.4.3 Conservación de las muestras .....	45
3.5 Métodos analíticos evaluados.....	46
3.5.1 Método 1 .....	46
3.5.1.1 Extracción .....	46
3.5.1.2 Condiciones cromatográficas.....	48
3.5.1.3 Condiciones de analizador de masas .....	48
3.5.1.4 Control de Calidad método 1 .....	48
3.5.1.5 Miniaturización del método 1 .....	49
3.5.1.6 Validación método 1 .....	49
3.5.2 Método 2 .....	50
3.5.2.1 Extracción .....	50
3.5.2.2 Condiciones cromatográficas.....	52
3.5.2.3 Condiciones de analizador de masas .....	53
3.5.2.4 Control de calidad.....	53
3.5.2.5 Validación método 2 .....	53
3.5.3 Comparativa del método 2 con ELISA AgraQuant DON .....	56
3.6 Tratamiento de datos .....	56
3.6.1 Análisis de las muestras.....	56
3.6.2 Tratamiento estadístico .....	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
4.1 Métodos .....	58
4.1.1 Optimización del Método 1 .....	58
4.1.1.1 Método cromatográfico .....	58
4.1.1.2 Parámetros del analizador de masas .....	62
4.1.2 Validación preliminar del método 1 .....	64
4.1.3 Optimización del método 2.....	66
4.1.3.1 Método cromatográfico .....	66
4.1.3.2 Parámetros de espectrometría de masa.....	67
4.1.3.3 Método de extracción .....	70

4.1.4	Validación del método 2 .....	71
4.1.5	Control de Calidad método 2 .....	76
4.2	Evaluación de micotoxinas derivadas de la población de <i>Fusarium</i> circulante en el país en la zafra 2018. ....	78
4.2.1	Detección de micotoxinas .....	79
4.2.1.1	DON y variantes acetiladas .....	82
4.2.1.2	ZEA.....	84
4.2.1.3	NIV.....	85
4.2.1.4	Co-detección.....	86
4.2.2	Evaluación por cultivar .....	86
4.2.3	Evaluación según departamento .....	89
4.2.4	Evaluación según quimiotipo.....	92
4.3	Evaluación de estrategias de manejo de FE y su efecto en el contenido de micotoxinas.....	95
4.3.1	Muestras de Temporada 2018 (baja enfermedad) .....	95
4.3.2	Muestras de la Temporada 2019 (enfermedad intermedia y alta) .....	97
4.3.2.1	Detección de micotoxinas.....	101
4.3.2.2	Contenido de micotoxinas según estrategia de manejo de FE .....	103
	Evaluación de los rangos y las medias de concentraciones de DON .....	106
	Evaluación de los rangos y las medias de concentraciones de otras micotoxinas .	108
4.3.3	Comparación resultados método 2 con ELISA AgraQuant DON .....	111
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	114
6.	ANEXO .....	116
	Anexo I - Ejemplo de cálculos de concentración de micotoxinas .....	116
	Cálculos para muestras concentradas.....	116
	Cálculo para muestras diluidas.....	116
	Anexo II - Resultados de los parámetros evaluados en el control de calidad de los distintos ensayos realizados. ....	117
	Muestras de Temporada 1 2019 (1 a 28) .....	117
	Muestras de Temporada 1 2019 (29 a 56) y Temporada 2 2019 (100 a 127) .....	117
	Muestras de zafra 2018 .....	117
	Anexo III - Resultados relevamiento de micotoxinas de la zafra de trigo 2018, especificando departamento, cultivar, identificación de los hongos aislados, quimiotipo y concentración de las micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).....	118
	Anexo IV – Análisis de varianza de un factor entre cultivar de trigo y concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) .....	121
	Anexo V - Análisis de varianza de un factor entre el Departamento y la concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) .....	121
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	122

## Lista de tablas

**Tabla 1** - Contenido máximo de DON y ZEA, en trigo y alimentos derivados, según el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N°1881/2006.

**Tabla 2** - Límites recomendados para DON en productos de trigo para consumo humano, granos y sub-productos de granos, según las guías para la Industria y la FDA.

**Tabla 3** - Límites máximos de DON en alimentos en Argentina; Artículo 156 de la Resolución Conjunta N°22/2019 del Código Alimentario Argentino.

**Tabla 4** - Límites Máximos de Tolerancia para DON y ZEA, en trigo y derivados, de acuerdo con la Resolución RDC N°7 de Brasil.

**Tabla 5** - Límites máximos de DON y ZEA en alimentos de acuerdo con el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional del 31/05/2006. Límites máximos de DON en alimentos destinados para consumo animal, de acuerdo con la resolución S/N/001 del MGAP.

**Tabla 6** - Número y procedencia de las muestras analizadas en la investigación.

**Tabla 7** - Fórmula, peso molecular (PM) y principales iones precursores formados durante la ionización para los tricotecenos tipo B y ZAE. Ac=acetato, ACN=Acetonitrilo.

**Tabla 8** - Ion precursor, iones productos, tiempos de retención (tR), ion ratio (IR) y condiciones de voltaje en el espectrómetro de masas para método 1. Se marca en negrita la transición de cuantificación.

**Tabla 9** - Ion precursor, iones producto, ion ratio (IR), tiempo de retención (tR) y condiciones de voltaje en el espectrómetro de masas para modo positivo, del método 2. Se marca en negrita la transición de cuantificación.

**Tabla 10** - Ion precursor, iones producto, ion ratio (IR), tiempo de retención (tR) y condiciones de voltaje en el espectrómetro de masas para modo negativo del método 2. Se marca en negrita la transición de cuantificación.

**Tabla 11** - Resultados preliminares de la validación del método 1 para las cinco micotoxinas evaluadas, expresándose linealidad en matriz ( $R^2$  MM), repetitividad (%RSD) instrumental y del método, límite de cuantificación (LOQ), porcentaje de recuperación (%Rec), ion ratio (IR), porcentaje de efecto matriz (%EM).

**Tabla 12** - Condiciones evaluadas en la optimización cromatográfica del método 2

**Tabla 13** - Resultados de la validación del método 2 para las cinco micotoxinas evaluadas, expresándose porcentaje de recuperación (%Rec), repetitividad (%RSD) según concentración evaluada, ion ratio (IR), tiempos de retención (tR), límite de cuantificación (LOQ), porcentaje de efecto matriz (%EM) y linealidad tanto en matriz (R2 MM) como solvente (R2 ste).

**Tabla 14** - Resultados del Operador 2 para las cinco micotoxinas evaluadas, expresándose porcentaje de recuperación (%Rec), repetitividad (%RSD) según concentración evaluada, ion ratio (IR), tiempos de retención (tR), límite de cuantificación (LOQ), porcentaje de efecto matriz (%EM) y linealidad tanto en matriz (R2 MM) como solvente (R2 ste).

**Tabla 15** - Resultados del análisis de micotoxinas de las muestras correspondientes a la zafra de cultivo de trigo 2018, indicando el cultivar y departamento de siembra asociadas a las mismas. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras con concentraciones superiores a los límites máximos establecidos (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

**Tabla 16** - Resultados de muestras de trigo de zafra 2018 ordenados con respecto al cultivar, indicando número total de muestras, número de muestras con presencia de micotoxinas, micotoxina encontrada, rango de concentración y susceptibilidad del cultivar a FE.

**Tabla 17** - Número de muestras analizadas y rango de concentración detectado para cada micotoxina según la localidad en las muestras de trigo de la zafra 2018, así como el porcentaje de muestras que superan los límites máximos establecidos por el Decreto N°155/006.

**Tabla 18** - Información de la cantidad de muestras según su quimiotipo, micotoxina presente y números de muestras con presencia de micotoxinas.

**Tabla 19** - Resultados preliminares de la cuantificación de micotoxinas de Temporada 1 2018 según el método 1. MOM: Momento de aplicación, Z: Escala Zadoks. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras de concentración superior al límite máximo establecido (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

**Tabla 20** - Concentraciones medias obtenidas para DON y NIV, de acuerdo con el cultivar, tratamiento antifúngico, y momento de aplicación de este (MOM) según escala de Zadoks,

para las muestras de Temporada 1 2018, evaluadas con el método 1. SWING PLUS= (metconazol + epoxiconazol); PROSARO= (protioconazol + tebuconazol).

**Tabla 21** - Resultados de la cuantificación de micotoxinas del ensayo de temporada 1 2019. ND: no detectado, MOM: Momento de aplicación, Z: Escala Zadoks. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras de concentración superior al límite máximo establecido (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

**Tabla 22** - Resultados de la cuantificación de micotoxinas del ensayo de temporada 2 2019. ND: no detectado, MOM: Momento de aplicación, Z: Escala Zadoks. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosado las muestras de concentración superior al límite máximo establecido (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

**Tabla 23** - Resultados del ensayo de diferentes estrategias de manejo de FE en cuanto al contenido de micotoxina para Temporada 1; el número total de muestras analizadas en cada uno de los experimentos es 4, MOM es el momento de aplicación, Z según escala de Zadoks.

**Tabla 24** - Resultados de concentraciones de DON obtenidos para 20 muestras de cultivar 2387 obtenidos mediante HPLC-MS/MS y ELISA.

## Lista de figuras

**Figura 1** - Ciclo de la enfermedad de FE.

**Figura 2** - Esquema de espiguilla de trigo especificando sus partes.

**Figura 3** - Mapa de riesgo de contaminación por DON para fecha de espigazón estimada de 17 de setiembre de 2023.

**Figura 4** - Clasificación de las estructuras de tricotecenos. Los grupos R pueden ser H, OH, OAcil o variaciones en la cadena de macrólidos.

**Figura 5** - Estructura química de DON y sus derivados.

**Figura 6** - Estructuras químicas de (a) 3-acetildeoxinivalenol y (b) 15-acetildeoxinivalenol.

**Figura 7** - Estructura química del Nivalenol

**Figura 8** - Estructura química de (a) Zearalenona y sus metabolitos principales, (b)  $\alpha$ -zearalenol y (c)  $\beta$ -zearalenol.

**Figura 9** - Esquema de trabajo método 1.

**Figura 10** - Gradiente de elución del método 1.

**Figura 11** - Esquema de trabajo del método 2.

**Figura 12** - Gradiente de elución para el método 2.

**Figura 13** - TIC de mezcla de estándares a una concentración de 500  $\mu\text{g/L}$  vs tiempo (a) en solvente, (b) en matriz.

**Figura 14** - Cromatograma de mezcla de estándares de concentración 1000  $\mu\text{g/L}$  en solvente con (a) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (20:79:1, v/v/v) y, (b) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (50:49:1, v/v/v).

**Figura 15** - Cromatograma de mezcla de estándares de concentración 1000  $\mu\text{g/L}$  en solvente con (a) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (80:19:1, v/v/v) y, (b) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (90:9:1, v/v/v).

**Figura 16** - TIC de mezcla de estándares a una concentración de 500  $\mu\text{g/kg}$ , en modo negativo (a) y positivo (b), correspondientes al método 2.

**Figura 17** - Comparación de TIC de mezcla de estándares a una concentración 500  $\mu\text{g/kg}$ , con una muestra positiva a las cinco micotoxinas, indicándose sus IR correspondientes.

**Figura 18** - Comparación del %EM obtenido en la validación y los ensayos posteriores, para las micotoxinas evaluadas. GM= grupo de muestras.

**Figura 19** - Comparación del porcentaje de recuperación (%Rec) entre la validación y los ensayos posteriores, para las micotoxinas evaluadas, y sus desviaciones estándar relativas (%RSD) indicadas como barras de error. GM= grupo de muestras.

**Figura 20** - Representación gráfica de la distribución de las muestras de acuerdo con el departamento.

**Figura 21** - Representación gráfica de la distribución de las muestras de acuerdo con el cultivar.

**Figura 22** - Porcentaje de muestras con presencia de micotoxinas y su co-detección en las muestras analizadas.

**Figura 23** - Número de muestras con presencia de micotoxinas según los distintos cultivares de trigo de Uruguay.

**Figura 24** - Porcentaje de muestras con presencia de micotoxinas en las distintas zonas de producción evaluadas.

**Figura 25** - Detección de las micotoxinas durante la temporada de intermedia y alta enfermedad, con sus rangos de concentración correspondiente en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Figura 26** - Rango de concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de acuerdo con el cultivar, tratamiento y momento de aplicación de fungicidas. PR= PROSARO, SP= SWING PLUS. La flecha roja indica que el rango de concentración se extiende más allá de la escala empleada.

**Figura 27** - Comparación de la concentración media de DON con respecto a cultivar, tratamiento y momento de aplicación de fungicidas.

**Figura 28** - Comparativa de la concentración de 3ADON, 15ADON, NIV y ZEA, con respecto al cultivar, tratamientos antifúngicos y el momento de aplicación de estos.

**Figura 29** - Comparación de las concentraciones de DON obtenidas mediante ELISA AgraQuant y HPLC-MS/MS ( $n= 20$ ).

**Figura 30** - Comparación de resultados de la cuantificación de DON mediante ELISA vs HPLC-MS/MS.

## Lista de imágenes

**Imagen 1** - HPLC (Agilent Technologies 1200 series) acoplado a un híbrido, triple cuadrupolo trampa lineal (4000 QTRAP LC-MS/MS).

**Imagen 2** - (a) Shaker orbital horizontal, (b) tubo de muestra post decantación por gravedad con sobrenadante límpido.

## Lista de ecuaciones

**Ecuación 1** - Determinación del efecto matriz en porcentaje.

**Ecuación 2** - Cálculo de la relación de áreas de iones productos para la identificación de analitos mediante MS/MS.

**Ecuación 3** - Cálculo de la desviación estándar relativa en porcentaje.

**Ecuación 4** - Cálculo de las concentraciones retro calculadas (back calculated concentration) en porcentaje.

## Anexos

**Anexo I** - Ejemplo de cálculos de concentración de micotoxinas.

**Anexo II** - Resultados de los parámetros evaluados en el control de calidad de los distintos ensayos realizados.

**Anexo III** - Resultados relevamiento de micotoxinas de la zafra de trigo 2018, especificando departamento, cultivar, identificación de los hongos aislados, quimiotipo y concentración de las micotoxinas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Anexo IV** - Análisis de varianza de un factor entre cultivar de trigo y concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Anexo V** - Análisis de varianza de un factor entre el departamento y la concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

## Lista de abreviaturas

<b>15ADON</b>	15 acetil-deoxinivalenol
<b>3ADON</b>	3 acetil-deoxinivalenol
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Químicos Analíticos (Association of Official Analytical Chemists)
<b>AQC</b>	Control de Calidad Analítico (Analytical quality control)
<b>AUDPC</b>	Área debajo de la curva de la progresión de la enfermedad (Area Under Disease Progress Curve)
<b>CE</b>	Energía de colisión (collision energy)
<b>CE</b>	Comisión Europea
<b>CEFG</b>	Complejo de especies de <i>Fusarium graminearum</i>
<b>CEFT</b>	Complejo de especies de <i>Fusarium tricinctum</i>
<b>CEN</b>	Comisión Europea de Estandarización (European Committee for Standardization)
<b>CONTAM</b>	Panel sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria
<b>CXP</b>	Potencial de salida de la celda de colisión (collision cell exit potential)
<b>D3G</b>	Deoxinivalenol-3-glucósido
<b>DG SANTE</b>	Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria (Directorate-General for Health and Food Safety)
<b>DON</b>	Deoxinivalenol
<b>DP</b>	Potencial de desagrupamiento (declustering potential)
<b>DQL</b>	Departamento de Química del Litoral
<b>d-SPE</b>	Extracción dispersiva en fase sólida (dispersion solid phase extraction)
<b>E2</b>	17 $\beta$ -estradiol
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority)
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>EM</b>	Efecto Matriz
<b>EP</b>	Potencial de entrada (entrance potential)
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization

<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration)
<b>FDK%</b>	Porcentaje peso/peso según la Comisión canadiense, de granos con síntomas en muestra de 25 g (Fusarium Damaged Kernel)
<b>FE</b>	Fusariosis de la Espiga
<b>FGSC</b>	<i>Fusarium graminearum</i> species complex
<b>FHB</b>	Fusarium Head Blight
<b>FIA</b>	Análisis por inyección de flujo (Flow Injection Analysis)
<b>FID</b>	Ionización en llama
<b>FPIA</b>	Inmunoensayo polarización de fluorescencia
<b>GC</b>	Cromatografía de gases (Gas Chromatography)
<b>HAc</b>	Ácido acético
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High-performance liquid chromatography)
<b>HPLC-MS/MS</b>	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masa
<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer)
<b>IFE</b>	Índice de Fusariosis de la Espiga
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
<b>IR</b>	Relación de iones (ion ratio)
<b>JECFA</b>	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)
<b>LATU</b>	Laboratorio Tecnológico del Uruguay
<b>LMT</b>	Límites Máximos de Tolerancia
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MGAP</b>	Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
<b>MRM</b>	Monitoreo de Reacciones Múltiples (Multiple Reaction Monitoring)
<b>MS</b>	Espectrometría de masas (Mass Spectrometry)
<b>NIV</b>	Nivalenol
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

<b>ONUAA</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>PMTDI</b>	Ingesta diaria máxima tolerable provisional
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinilideno
<b>QuEChERS</b>	Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe)
<b>RASFF</b>	Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (Rapid Alert System Feed and Food)
<b>RE</b>	Receptores de estrógeno
<b>Rec%</b>	Porcentaje de recuperación
<b>RSD</b>	Desviación Estándar Relativa (Relative Standard Deviation)
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction)
<b>TDI</b>	Ingesta diaria tolerable
<b>TIC</b>	Cromatograma de Iones Totales (Total Ion Chromatogram)
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography)
<b>tR</b>	Tiempo de retención (tR)
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>UV</b>	Ultravioleta (UV)
<b>ZEA</b>	Zearalenona (ZEA)

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Fusariosis de la espiga

El trigo (*Triticum spp*) es uno de los cereales más importantes en el mundo, con una producción anual de alrededor de 800 millones de toneladas por año <sup>1</sup>. Esta producción puede verse reducida significativamente por varias enfermedades fúngicas, entre ellas, la Fusariosis de la Espiga (FE) o por sus siglas en inglés *Fusarium* Head Blight (FHB). Con una distribución global, la FE es de las enfermedades más dañinas, comprometiendo tanto el rendimiento como la calidad del cultivo <sup>2</sup>.

Esta enfermedad es principalmente atribuida a especies pertenecientes al complejo de especies de *Fusarium graminearum* (CEFG), conocido también por sus siglas en inglés FGSC (*Fusarium graminearum* species complex), agrupando al menos 16 especies reconocidas <sup>2,3</sup>.

Son un complejo dinámico de especies morfológicamente relacionadas que se encuentran en todas las regiones productoras de cereales del mundo. Dentro del CEFG, especies como *F. graminearum* y *F. asiaticum*, son considerados los principales patógenos asociados a FE <sup>4,5</sup>.

Otras especies relacionadas a como *F. poae*, *F. avenaceum* y otros miembros del complejo de especies de *F. tricinctum* (CEFT), también se asocian comúnmente a esta enfermedad, contribuyendo a las epidemias de FE en regiones templadas <sup>4,5</sup>.

Las especies fúngicas muestran distintos niveles de preferencia de cultivo hospedante, por ejemplo, *F. asiaticum* con arroz, *F. bootii* y *F. meridionale* en maíz, mientras que *F. graminearum* se encuentra en trigo, cebada y maíz <sup>5</sup>.

Estos microorganismos, tienen la capacidad genética de producir cientos de metabolitos secundarios estructuralmente diversos, dentro de los cuales se encuentran toxinas que pueden actuar como factores de virulencia en el desarrollo de la enfermedad en la planta. Estas toxinas, a las cuales se denomina micotoxinas, son compuestos con actividad tóxica tanto para humanos como animales <sup>6</sup>.

La especie causal de FE puede variar según la región geográfica, presentando diversos perfiles micotoxigénicos. La especie con mayor incidencia global es *Fusarium graminearum*. Esta es considerada la más agresiva, mientras que especies como *F. avenaceum*, *F. poae* y *F. acuminatum*, son consideradas como patógenos débiles <sup>2</sup>.

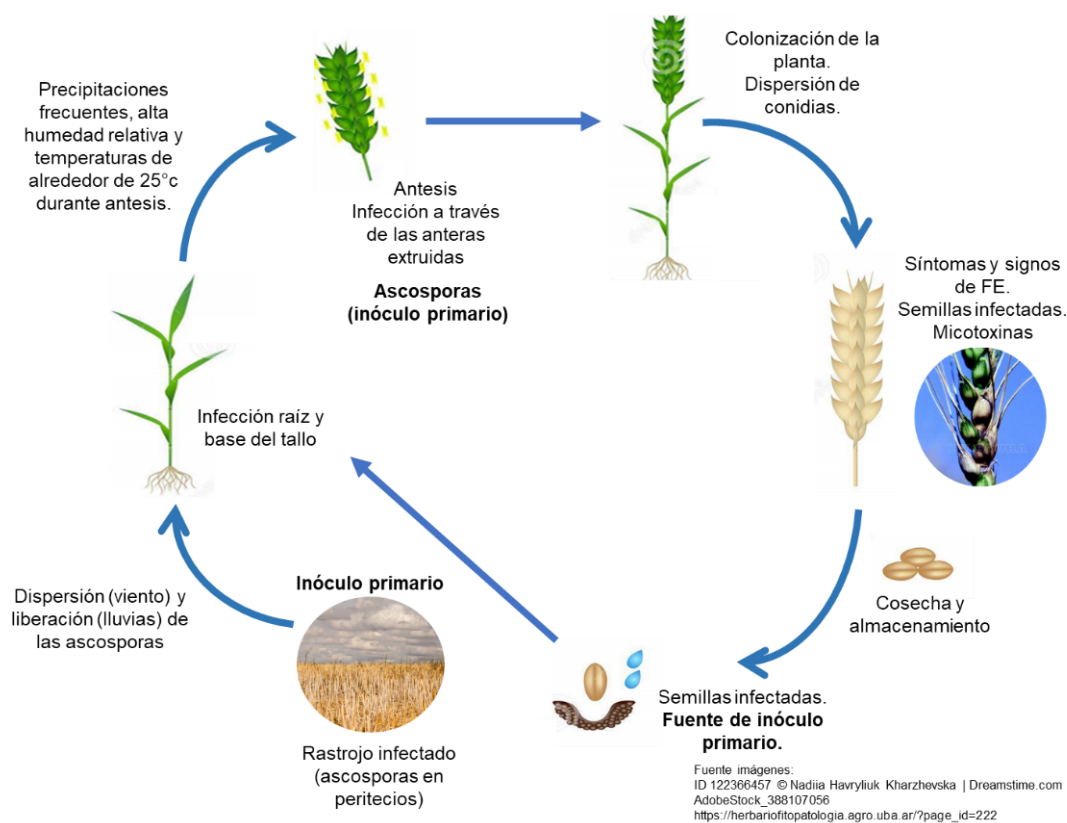
Los patógenos menos dominantes pueden ser importantes en regiones o años donde el clima no es favorable para los brotes de FE por *F. graminearum* <sup>4</sup>.

El éxito de *Fusarium* como patógeno, y la acumulación de micotoxinas asociada, depende en gran medida de las interacciones con otros organismos y de las condiciones ambientales <sup>6</sup>. Varias especies causales de FE pueden coexistir en la misma región, pudiendo interactuar entre ellas e influenciar el desarrollo de la enfermedad y la producción de micotoxinas <sup>7</sup>. La principal preocupación derivada de la presencia de múltiples especies toxigénicas se relaciona a un mayor número de micotoxinas que puede ser acumuladas en los granos <sup>4,5</sup>.

### **1.1.1 Ciclo de la enfermedad**

Durante el ciclo de la enfermedad de FE (Figura 1), pueden observarse dos fases, una parasítica, en la cual el patógeno crece como biótrofo en los tejidos infectados, sin perder estos su funcionalidad; y una fase saprofitica, donde el hongo se desarrolla sobre los tejidos muertos. El pasaje de la fase parasítica a saprofitica en general está asociada a la acumulación de toxinas liberadas por el hongo durante la infección. La fase saprofitica continúa hasta la generación de esporas por el hongo, con el fin de infectar nuevos tejidos e iniciar una nueva fase parasítica <sup>8</sup>.

El tipo de espora producido depende de la especie de *Fusarium*, pudiendo ser conidios asexuales, así como ascosporas sexuales. La distribución de las especies dentro del agroecosistema se ve influida por el tipo de espora generada, siendo un paso crítico para la colonización por el hongo de diversas partes de la planta. Las ascosporas sexuales son liberadas por los peritecios, dando lugar a su disseminación, mientras que las esporas asexuales dependen del viento y de la lluvia para su disperseión <sup>7</sup>.



**Figura 1 - Ciclo de la enfermedad de FE.**

Tomado y adaptado de Erlei Melo Reis

([https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page\\_id=222](https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=222)).

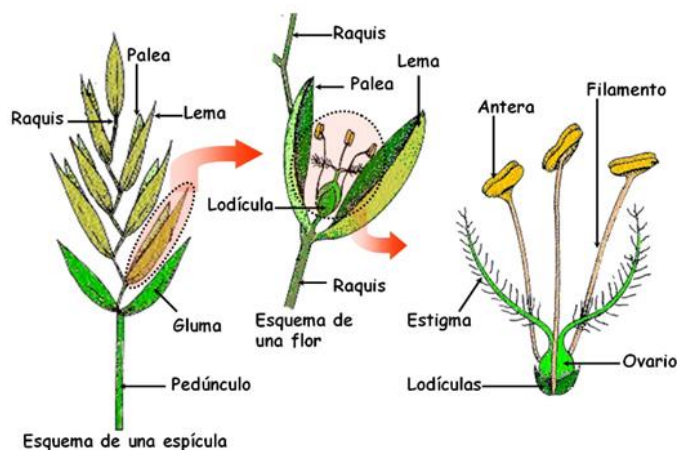
Las prácticas agronómicas como las rotaciones de cultivos, la cual implica plantar de forma secuencial diferentes cultivos en la misma parcela de tierra, y el laboreo, puedan afectar el microbioma del suelo <sup>6,7</sup>. Si bien es una técnica empleada con el objetivo de mejorar el uso del suelo, mediante la optimización de los nutrientes presentes, el mismo puede influenciar las enfermedades de los cultivos y con ello la contaminación por micotoxinas <sup>9</sup>.

Los residuos contaminados de cultivos previos son una fuente importante de inóculo, ya que permiten la supervivencia saprofitica del hongo. El maíz es uno de los cultivos previos con mayor riesgo de inóculo para FE, ya que es un buen huésped para *Fusarium* y genera grandes cantidades de residuos <sup>7,8</sup>.

El inóculo de *Fusarium*, además, puede ser introducido por semillas infectadas o por deposición de esporas de otras áreas de cultivo, a kilómetros de distancia <sup>7,8</sup>.

En Uruguay se ha detectado producción de conidios y ascosporas sobre rastrojos infectados durante todo el año, siendo las ascosporas el inóculo primario de mayor relevancia en esta enfermedad, diseminándose por el viento a chacras vecinas <sup>8</sup>.

Las espiguillas de trigo constan de múltiples partes como posibles sitios de infección (Figura 2). Las anteras de trigo extruidas son consideradas los principales sitios de infección, permitiendo el establecimiento de la infección por las hifas fúngicas, entrando a las flores individuales. Es por ello que la antesis o floración es considerada la etapa de crecimiento más susceptible para infección del trigo por *Fusarium* <sup>2,7</sup>. Otros posibles sitios de infección en la espiguilla son la superficie adaxial de las glumas, la lema o la palea <sup>2</sup>.



**Figura 2** - Esquema de espiguilla de trigo especificando sus partes

Fuente:

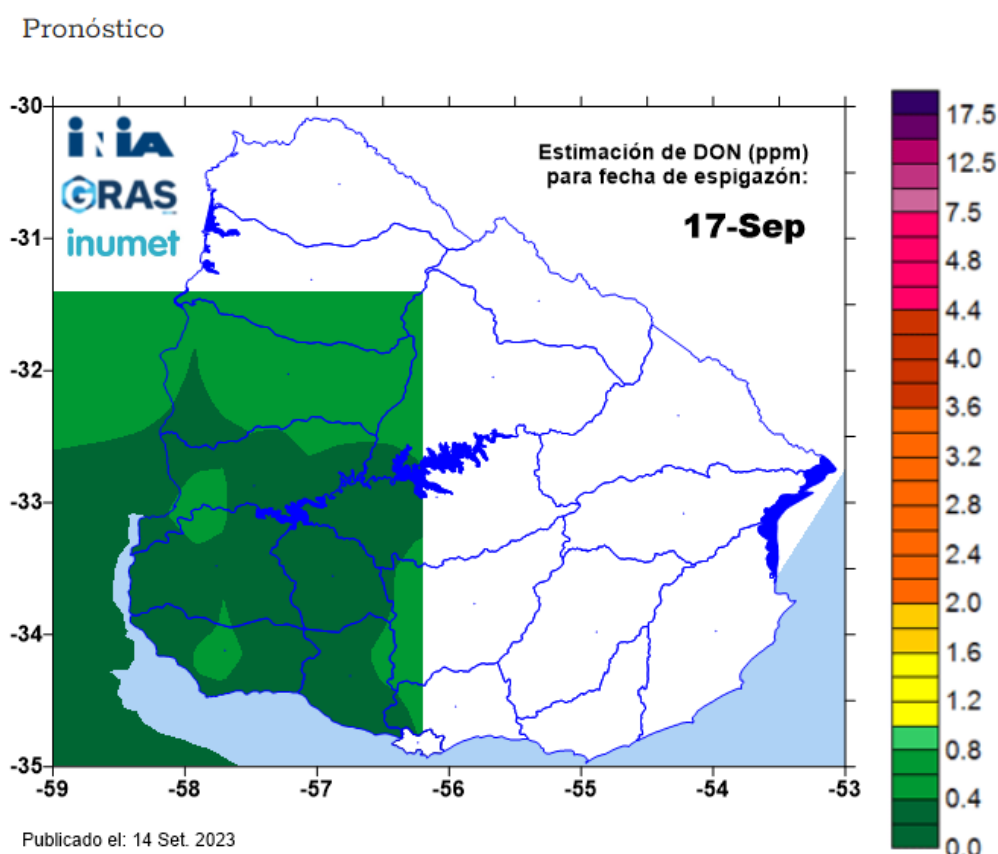
[http://www.euita.upv.es/varios/biologia/images/Figuras\\_tema\\_21/Commel%C3%ADnidas/Gramineas/Gramineas%206.jpg](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/images/Figuras_tema_21/Commel%C3%ADnidas/Gramineas/Gramineas%206.jpg)

La infección durante la antesis en general resulta en una falta de desarrollo del grano. Infecciones posteriores a la antesis pueden dar lugar al desarrollo del hongo, junto con la acumulación de micotoxinas en los granos, con una expresión de síntomas en el grano limitada. Esto podría tener como consecuencia, la producción de semillas viables, pero contaminadas, pudiendo constituir de esta forma una fuente de inóculo de la enfermedad <sup>2,7</sup>.

Los factores ambientales, son los más importantes durante la infección, especialmente la temperatura y la humedad, afectando tanto el crecimiento del hongo como la producción de micotoxinas. Su influencia sobre el ciclo vital de *Fusarium* y de

otros microorganismos presentes, repercute en las interacciones entre el huésped y el patógeno <sup>6,7,9</sup>.

En Uruguay, para la predicción de riesgo de contaminación del cultivo con DON, se desarrollaron mapas de riesgo para esta micotoxina. El modelo, llamado DONCast, permite predecir la cantidad de DON en trigo esperada en la cosecha, empleando datos meteorológicos. Se evalúan los datos provistos por el Instituto Uruguayo de Meteorología y las estaciones Agroclimáticas de INIA, durante un período de 18 días alrededor de la fecha de espigazón (7 previos y 10 posteriores). Como resultado se presentan mapas diarios de niveles de DON en la cosecha para cada fecha de espigazón (Figura 3) <sup>10</sup>.



**Figura 3** - Mapa de riesgo de contaminación por DON para fecha de espigazón estimada de 17 de setiembre de 2023. Fuente: DonCast<sup>10</sup>.

### 1.1.2 Manejo de la enfermedad

Dentro de las estrategias empleadas para el manejo de la FE se encuentra el uso de fungicidas. Esta es una herramienta de prevención, que en general, no logra controlar o prevenir de forma completa la presencia de infección y producción de

micotoxinas. Esta estrategia de manejo está limitada por las condiciones ambientales al momento de la aplicación, así como por los cambios fenológicos en cada área de cultivo <sup>11,12</sup>.

Los fungicidas de tipo triazol sistémicos, como el tebuconazol, metconazol, prothioconazol y epoxiconazol, se encuentran entre los fungicidas más empleados en el control de FE, observándose una disminución de la incidencia de la enfermedad y la acumulación de micotoxinas en los cultivos <sup>13</sup>. Son empleados por sí solos o en combinaciones, y han sido los fungicidas de elección durante muchos años en Uruguay. Son inhibidores de la desmetilación (DMI) que afectan la biosíntesis de ergosteroles en la membrana celular <sup>14</sup>. El uso generalizado de estos fungicidas específicos de sitio en trigo y cebada ha llevado a la aparición de resistencia en hongos causales de FE. Estudios previos realizados en Uruguay <sup>3,15</sup>, en donde evaluaron la sensibilidad al tebuconazol y metconazol de *F. graminearum* y otras especies que causales de FE, sugieren un aumento de la tolerancia al tebuconazol <sup>7,14</sup>.

Otra táctica de manejo de FE es el empleo de cultivares resistentes a infecciones por *Fusarium*. La resistencia está asociada a la habilidad de la planta de prevenir la infección primaria y el crecimiento del hongo, pudiendo de esta forma, disminuir el potencial de contaminación con micotoxinas <sup>11,12</sup>.

Se han descrito al menos cinco tipos de resistencia a la FE. El tipo I comprende la capacidad de la planta de resistir a la infección fúngica inicial y el tipo II se produce cuando la planta huésped evita la propagación de la infección dentro de la cabeza de la espiga. El tipo III implica resistencia a la infección del grano y el tipo IV es tolerancia durante la cual la infección está presente, pero sin un efecto sustancial sobre el rendimiento y las pérdidas de calidad del trigo. El tipo V es la capacidad de la planta huésped para degradar la micotoxina responsable de la virulencia. Son preferibles los cultivares de trigo que incorporen mecanismos de resistencia del Tipo I y Tipo II, ya que la resistencia sería más estable y duradera <sup>16</sup>.

Tomando en cuenta las variables para el desarrollo de la FE, podríamos decir, que una estrategia adecuada para el manejo de la enfermedad implicaría la integración del uso de cultivares resistentes con la aplicación preventiva de fungicidas, en el momento de la anthesis o floración, teniendo en cuenta las condiciones ambientales <sup>11,12</sup>.

## 1.2 Micotoxinas y alimentos

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, de bajo peso molecular, sintetizados por varios tipos de hongos, capaces de producir enfermedad y muerte, en plantas, animales y humanos <sup>17,18</sup>.

La síntesis de estos metabolitos se atribuye principalmente a las especies *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*, y las micotoxinas más comúnmente encontradas son: aflatoxinas, ocratoxina A, citrina, patulina, tricotecenos, fumonisinas y zearalenona (ZEA) <sup>19,20</sup>. Tanto *Aspergillus* como *Penicillium* causan deterioro típicamente durante el almacenamiento, mientras que *Alternaria* y *Fusarium* son patógenos de las plantas, causando contaminación y consecuente acumulación de toxinas en la etapa de precosecha <sup>9,17,20</sup>.

La distribución y contaminación de alimentos con micotoxinas es variable, tanto geográfica como temporalmente, dependiendo de las condiciones climáticas, tanto antes como después de la cosecha <sup>19</sup>.

Factores como la competencia microbiana, composición del sustrato, actividad de agua, pH, temperatura, humedad relativa, presencia de insectos, y la aplicación de fungicidas u otros pesticidas influyen en gran medida en el crecimiento de los hongos en los cultivos. Por lo cual, describir un conjunto de condiciones ambientales óptimo tanto para el crecimiento de hongos o la producción de micotoxinas es difícil, ya que la influencia de estos factores es diferente para cada uno de ellos <sup>17,21</sup>.

La presencia del hongo no implica necesariamente producción de micotoxinas. A su vez, la ausencia de micotoxinas no está garantizada por la eliminación del hongo, ya que puede haberse sintetizado previo a su eliminación <sup>17,21</sup>.

La contaminación con micotoxinas es considerada un problema impredecible e inevitable, constituyendo un peligro a la salud pública <sup>19,21</sup>. Una gran variedad de efectos tóxicos en animales y humanos ha sido observada debido a la ingestión de alimentos contaminados con micotoxinas, tales como inmunosupresión, carcinogénesis, genotoxicidad, teratogénesis o efectos mutagénicos. El impacto en la salud depende de varios factores como ser niveles de ingestión, toxicidad del compuesto en particular, mecanismo de acción, tiempo de exposición, presencia de más de una micotoxina, masa corporal, especie, condición fisiológica y edad del individuo <sup>17</sup>.

Son unos de los contaminantes más prevalentes de la cadena alimenticia <sup>19,21</sup>, encontrándose generalmente en alimentos como cereales (trigo, maíz, cebada), piensos, especias y semillas<sup>17,18</sup>, así como también en leche, y determinadas frutas<sup>22-25</sup>. Las principales micotoxinas presentes en cereales son tricotecenos tipo A y B, fumonisinas, aflatoxinas, ZEA y ocratoxina A <sup>9</sup>.

Cuando los animales consumen piensos contaminados con micotoxinas, en algunos casos es posible su acumulación en los tejidos, por ende, los alimentos de origen animal, como los huevos, la leche o la carne, podrían ser fuente de estos metabolitos. Dada su resistencia a altas temperaturas y tratamientos químicos o físicos, la cocción estándar no es suficiente para su eliminación, por lo que tienden a permanecer en el producto final, encontrándose en productos procesados tales como cerveza, panes, jugos, chocolate y vino, debido al uso de materias primas contaminadas <sup>17,21</sup>. Son varios los esfuerzos realizados para disminuir o inhibir la producción de micotoxinas durante la elaboración de materias primas de alimentos procesados, tanto previo a la cosecha como postcosecha, no siempre siendo suficientes para la eliminación completa de las mismas <sup>9</sup>.

La contaminación de cultivos agrícolas con micotoxinas implica importantes pérdidas económicas derivadas de su presencia en los alimentos y productos derivados de los mismos <sup>9,21</sup>. Se estima que alrededor de 25 a 30% de la producción anual de cultivos se encuentra contaminada con micotoxinas, implicando pérdida anuales de millones de toneladas de alimentos, piensos y derivados, pudiendo estos números incluso estar subestimados, con el incremento de reportes de productos contaminados que se generan año a año <sup>9,26</sup>. El costo económico es atribuible además a la reducción del rendimiento de los cultivos y pérdidas de alimentos, a cultivos con valor depreciado, disminución de la productividad animal, gastos médicos, tanto humanos como animales, implementación de métodos de prevención, control y detoxificación, entre otros <sup>9,21</sup>.

### **1.3 Micotoxinas de *Fusarium***

Dentro de las micotoxinas producidas por *Fusarium*, las de principal interés son los tricotecenos, fumonisinas y la ZEA. A nivel mundial, los más importantes son los tricotecenos debido a su prevalencia en los cultivos y el potencial riesgo a la salud que suponen <sup>19</sup>.

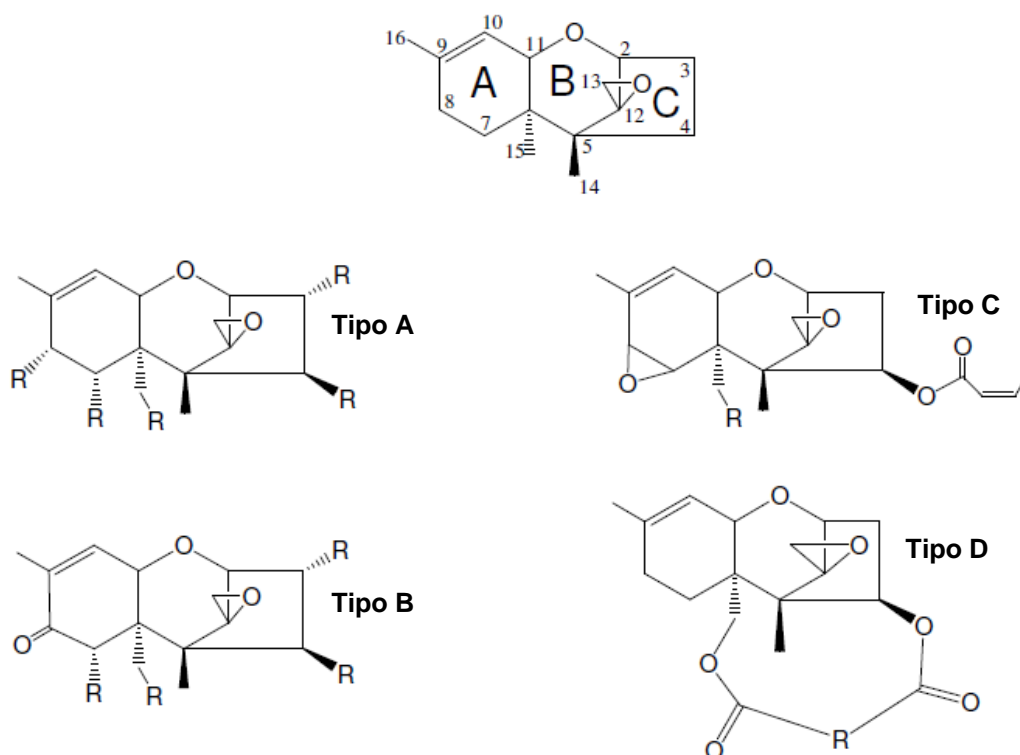
La producción de estas micotoxinas es a nivel de pre-cosecha, pudiendo cuantificarse en toda la planta, pero las mayores concentraciones son observadas en los granos y en las cáscaras externas <sup>19</sup>.

### **1.3.1 Tricotecenos**

Los tricotecenos son un grupo complejo de sesquiterpenoides relacionados químicamente que comparten un núcleo tricíclico 12,13-epoxitricotec-9-eno, caracterizado por un doble enlace en la posición 9 y 10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13, responsable de su toxicidad <sup>6,9</sup>. Varias especies de *Fusarium* han sido relacionadas con su producción, encontrándose más de 20 compuestos de ocurrencia natural <sup>27,28</sup>.

Se dividen en cuatro grupos de acuerdo con la estructura del núcleo tricíclico, denominados A, B, C y D (Figura 4) <sup>19,29</sup>. Los tipos A, B y C pueden diferenciarse basados en la sustitución del carbono en la posición del C-8. El tipo A incluyen compuestos con un grupo hidroxilo, función éster, o sin sustituyente con oxígeno en C-8. El tipo B, tienen un grupo funcional ceto en C-8. A su vez, tipo B derivados de *Fusarium*, tienen un grupo hidroxilo en el C-7 que no se observa en otros géneros de hongos, y todos los A y B, derivados de éste, tienen una función oxígeno, como hidroxilo o acetilo, en el C-3. El tipo C tiene un epóxido en C-7/C-8 <sup>29</sup>. El tipo D tiene un anillo adicional que une los carbonos en la posición 4 y 15 <sup>29</sup>.

Los tipos A y B son los tricotecenos más importantes en términos de ocurrencia natural y alta toxicidad, mientras que los tipos C y D no son sintetizados por especies de *Fusarium* <sup>19</sup>.



**Figura 4 - Clasificación de las estructuras de tricotecenos. Los grupos R pueden ser H, OH, OAcil o variaciones en la cadena de macrólidos.**

Fuente: McCormick et al, 2011 <sup>29</sup>.

Son contaminantes de alta prevalencia en el trigo, la cebada, la avena y el maíz. La toxicidad aguda de los tricotecenos A es mayor que la de los tricotecenos B, pero la concentración de tricotecenos B en cereales contaminados es generalmente mayor que la de los A <sup>9,27</sup>.

*F. graminearum* es el principal productor de tricotecenos tipo B como el deoxinivalenol (DON), con sus formas acetiladas (15 acetil-deoxinivalenol, o 15ADON, y 3 acetil-deoxinivalenol, o 3ADON), y nivalenol (NIV) <sup>2</sup>. Las formas acetiladas, 3ADON y 15ADON, así como el NIV, se encuentran de forma esporádica, en general, en muestras con alto contenido de DON <sup>9,19</sup>.

Se reconocen tres quimiotipos distintos de tricotecenos dentro de las especies de *Fusarium*, basados en los metabolitos producidos por las cepas individuales. El quimiotipo 3ADON y 15ADON incluyen especies que producen DON y 3-acetildeoxinivalenol o 15-acetildeoxinivalenol respectivamente, mientras que el quimiotipo NIV produce NIV y 4-acetilnivalenol <sup>3,30</sup>. La distribución geográfica de los quimiotipos puede depender del continente e incluso de las regiones dentro de un

país, pudiendo ocurrir diferentes quimiotipos en el mismo sitio geográfico, donde uno será el predominante. El conocimiento de los quimiotipos circulantes es crucial para las estrategias de gestión de riesgos aplicadas a la evaluación de exposición a estas micotoxinas, en particular, dada la diferencia en toxicidad de las micotoxinas, en particular DON y NIV, para los animales y humanos <sup>30</sup>. Los síntomas observados por el consumo de alimentos contaminados con micotoxinas de tricotecenos incluyen vómitos, mareos, diarrea y aborto espontáneo <sup>31</sup>.

La síntesis de los tricotecenos comienza a partir de farnesil-difosfato como metabolito primario, el cual, a través de diversas modificaciones enzimáticas, genera la micotoxina final. Cada paso enzimático está relacionado a un gen biosintético de tricoteceno en particular, llamados genes TRI. Las variaciones de quimiotipo pueden resultar por la presencia o ausencia de estos genes biosintéticos, en algunos casos, pudiendo resultar por diferencias en las funciones de variantes alélicas del mismo gen TRI. Diferentes alelos TRI8 son responsables por los quimiotipo 3ADON o 15ADON en *F. graminearum*, dependiendo si desacetila el C-15 o el C-3, respectivamente <sup>6</sup>.

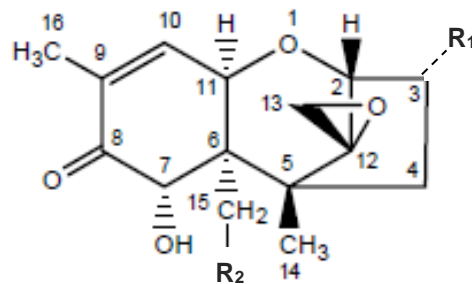
Los tricotecenos cumplen un rol importante en la virulencia del hongo, pudiendo atribuirse a la habilidad de estas micotoxinas de inhibir la síntesis de proteínas, así como provocar respuestas de defensa en las plantas. Su producción no es necesaria para el desarrollo y penetración del hongo en el huésped, pero sí lo es para la propagación del patógeno luego de la infección inicial <sup>6,9,31</sup>. Estas micotoxinas pueden verse afectadas por la presencia de bacterias y hongos que puedan alterar su estructura química y detoxificarlas <sup>19</sup>.

#### **1.3.1.1 Deoxinivalenol (DON)**

Su nombre químico es 12,3-epoxi-3,7,15-trihidroxitricotec-9-en-8-on. Su estructura molecular presenta 3 grupos hidroxilo libre (-OH), que son asociados a su toxicidad. En la figura 5 se puede observar su estructura química, así como las posibles sustituciones de sus grupos hidroxilos para la obtención de compuestos derivados.

Es producido por las especies *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* (*F. croockwellense*), *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. tricinctum* y *F. acuminatum*. Su concentración en cultivos varía de año a año de acuerdo con las diferentes condiciones meteorológicas <sup>9,19</sup>.

Dentro de los tricotecenos tipo B, el DON es detectado con mayor frecuencia y en las concentraciones más altas <sup>9,19</sup>.



	$R_1$	$R_2$
DON	OH	OH
3ADON	OAc	OH
15ADON	OH	OAc
D3G	Ogluc	OH

**Figura 5** - Estructura química de DON y sus derivados.

Fuente: EFSA Panel 2013, Knutsen et al, 2017.<sup>28,32</sup>

Estudios de su mecanismo de acción indican que se une a los ribosomas, inhibiendo la síntesis de proteínas y, posteriormente, también a la síntesis de ARN y ADN. La toxina interactúa con la enzima peptidil transferasa, uniéndose a la subunidad ribosómica 60S y luego provoca la inhibición de la traducción, así como el estrés ribotóxico. Este último activa diferentes proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La activación de las MAPK explica varios efectos del DON, como los efectos inflamatorios, por liberación de citocinas proinflamatorias, apoptosis y estrés oxidativo<sup>19,21,28</sup>. El DON podría causar daños en el ADN por acción directa sobre el mismo, mediante la formación de aductos de ADN a partir de radicales libres<sup>21</sup>.

En granos pequeños se puede encontrar al DON junto con sus derivados en todas las partes de la planta, distribuidos de forma no uniforme. La mayor concentración de micotoxina se encuentra en la cáscara externa, mientras que las menores concentraciones se detectan en el endoesperma. Las fracciones lipídicas del trigo, como el germen y el aceite de germen, no son fuentes significativas de DON. Sin embargo, el salvado, que es la fracción más empleada para alimentos de animales, es la más contaminada con esta micotoxina<sup>19,30</sup>.

Los niveles de DON pueden permanecer inalterados durante el almacenamiento, y ser reducidos si se toman medidas adecuadas durante su procesamiento. Para el caso específico de DON, la limpieza, clasificación, tamizado y descascarillado de los granos podrían disminuir su concentración, mientras que el procesamiento de los subproductos de los cereales, como el salvado utilizado en la alimentación animal, podría concentrar dicha micotoxina<sup>19,30</sup>.

A pesar de ser una toxina de rápida absorción y amplia distribución, el DON se encuentra en concentraciones bajas en los tejidos del animal, por lo que productos

derivados con residuos de esta micotoxina, no contribuirían significativamente a la exposición humana a la misma <sup>19</sup>.

### *Sintomatología en animales*

El sistema gastrointestinal es el órgano objetivo de esta toxina, siendo por ello conocida por el nombre de vomitoxina, dada la forma de presentación de los síntomas asociados con su toxicosis. Los fuertes efectos eméticos/anoréxicos del DON están asociados con dos mediadores principales: citocinas proinflamatorias y secreción de hormonas de la saciedad, que pueden activar receptores en el aferente vagal abdominal <sup>19,21,28</sup>.

Efectos tóxicos del DON han sido asociados con brotes de gastroenteritis, tanto en animales como en humanos. Sin embargo, su impacto es de gran relevancia a nivel clínico veterinario, en particular en la cría de cerdos <sup>4</sup>.

Los animales presentan clínicamente signos gastrointestinales que incluyen rechazo de alimentos, vómitos y trastornos digestivos con pérdida de peso, necrosis y hemorragia en el tracto digestivos, problemas reproductivos, abortos, destrucción de la médula ósea, supresión de la formación de las células sanguíneas y del sistema inmune e incluso la muerte <sup>19,21,28</sup>.

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer; IARC), ha clasificado al DON en el grupo 3, "no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano", ya que no se pudo evidenciar efectos cancerígenos en humanos <sup>21</sup>.

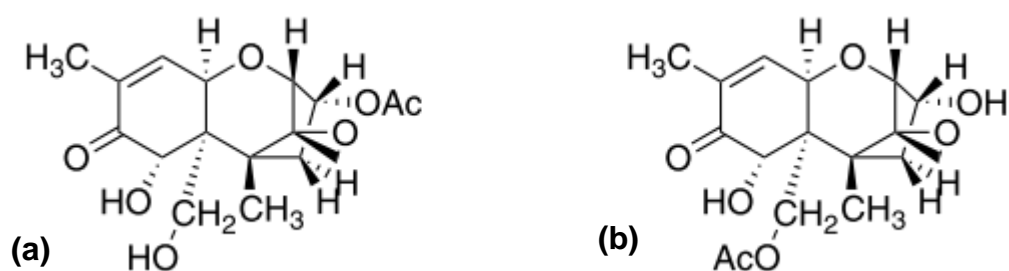
#### ***1.3.1.2 Metabolitos de DON: 3-acetil-deoxinivalenol y 15-acetil-deoxinivalenol (3ADON y 15ADON)***

Junto con DON, el 3ADON y el 15ADON (Figura 6) son metabolitos secundarios sintetizados por hongos. Ambos compuestos son precedidos por el 3,15-diacetil-deoxinivalenol, quien pierde uno de los grupos acetilo para dar lugar a una forma o la otra. Como se mencionó previamente, la síntesis de estas micotoxinas está asociada a variables genéticas (diferentes alelos TRI8), que determinan un quimiotipo u otro <sup>6,30</sup>.

La prevalencia de un determinado quimiotipo puede variar de una región a otra, o incluso de un año a otro, de acuerdo con la distribución de especies causales de FE y las condiciones meteorológicas. En Argentina, Uruguay y el sur de Brasil, la especie

predominante causal de FE parece ser *F. graminearum* quimiotipo 15ADON. El tipo 3ADON en *F. graminearum* fue reportado para varias cepas en Argentina y para un aislado de Uruguay. En Brasil, el quimiotipo 3ADON es exclusivo de las cepas de *F. cortaderiae* y *F. austroamericanum* de trigo y cebada <sup>4,5</sup>.

En América del Norte, Europa y China, las especies dominantes, ya sea *F. graminearum* o *F. asiaticum*, poseen más de un quimiotipo que alterna la dominancia según la región, el cultivo anterior o el año. En Europa, se han encontrado las cepas de *F. graminearum* 15ADON más comúnmente en el sur y el centro, mientras que *F. graminearum* 3ADON en el norte de Europa occidental. En China y Japón, *F. asiaticum* del tipo 3ADON parece ser el predominante. En América del Norte, el quimiotipo 15ADON de *F. graminearum*, es el hallado con mayor frecuencia, encontrándose a su vez, una alta frecuencia de aislamientos del quimiotipo 3ADON en algunas partes de EE. UU. y Canadá <sup>4</sup>.



**Figura 6** - Estructuras químicas de (a) 3-acetildeoxinivalenol y (b) 15-acetildeoxinivalenol

Fuente: Kim et al 2017 <sup>33</sup>

Su detección es infrecuente y en bajas concentraciones, encontrándose en trigo, maíz y cebada junto con DON <sup>34</sup>.

Se sugiere como mecanismo de acción la activación de MAPK e inducción de citoquinas inflamatorias y hormonas de la saciedad. Ambas micotoxinas son desacetiladas en gran medida a DON antes de la distribución sistémica, por lo que la exposición a ellas podría generar los mismos efectos agudos y crónicos que DON <sup>28</sup>.

### 1.3.1.3 Nivalenol (NIV)

El NIV es una micotoxina producida por hongos del género *Fusarium*, como *F. cerealis* (*F. crookwellence*), *F. meridionale*, *F. poae* y, en menor medida, también *F. culmorum* y *F. graminearum*<sup>35</sup>.

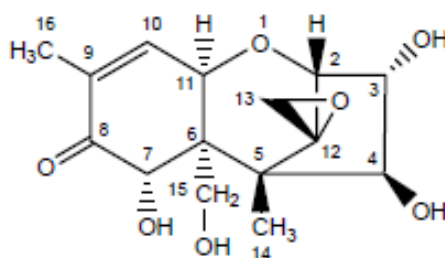
Si bien estructuralmente es similar al DON (Figura 7), su actividad tóxica es mayor, tanto para los seres humanos como los animales domésticos<sup>5,27</sup>.

En Argentina se identificaron cantidades variables de productores de NIV, la mayoría de estos aislamientos se identificaron como *F. meridionale*<sup>5</sup>. Este mismo productor de NIV fue el segundo en frecuencia observado en Brasil, luego del *F. graminearum* 15ADON. Otros productores de NIV han sido observados en Brasil como *F. austroamericanum* y *F. cortaderiae* en las epidemias de FE. En China y Japón, el principal productor de esta micotoxina es el *F. asiaticum*. En China en particular, ha ido siendo desplazado por el tipo 3ADON. En Estados Unidos y Canadá, se han reportado en niveles relativamente bajos de las cepas *F. graminearum* con el quimiotipo NIV<sup>4</sup>.

Las concentraciones medias más altas de NIV se observan en alimentos, piensos y cereales sin procesar como avena, maíz, cebada y trigo y sub-productos. Estos niveles de NIV pueden ser reducidos en las etapas de procesamiento, limpieza y clasificación, mientras que la molienda genera una redistribución del NIV en diferentes fracciones. Al igual que el DON, las condiciones normales de cocción parecen tener poca influencia en reducir su concentración en materias primas contaminadas<sup>32</sup>.

La exposición a NIV, no genera acumulación de este en tejidos, por lo que es poco probable que el consumo de alimentos de origen animal contribuya a la exposición en humanos<sup>19</sup>.

Sus efectos nocivos incluyen toxicidad de la médula ósea y órganos linfoides, eritropenia, leucopenia, hemorragia, diarrea y daño a las membranas epiteliales del intestino, el timo y el testículo. La toxicidad general y la inmunotoxicidad/hematotoxicidad del NIV se consideran efectos críticos. Estudios a largo plazo en ratones determinaron que estos efectos son similares a los de otros tricotecenos<sup>35</sup>.



**Figura 7 - Estructura química del Nivalenol**

Fuente: EFSA Panel 2013

(<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2014.EN-721>)<sup>32</sup>

### 1.3.2 Zearalenona (ZEA)

La ZEA es un macrólido comprendido por una lactona de catorce miembros fusionada con 1,3-dihidroxibenceno (Figura 8a). Es resistente a la luz ultravioleta y estable a altas temperaturas<sup>36</sup>. Su estructura química muestra una semejanza con el estrógeno endógeno (17  $\beta$ -estradiol (E2)), por lo que posee actividad similar al mismo, considerándose una micotoxina estrogénica no esteroide<sup>21,27,36</sup>.

Es producida por especies de *Fusarium* como *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. culmorum* y *F. equiseti*. La principal exposición alimentaria a ZEA proviene de los cereales, incluidos el maíz, la cebada, la avena, el sorgo y el trigo, pudiendo también proceder de las especias, la leche y la cerveza<sup>21,27,36</sup>.

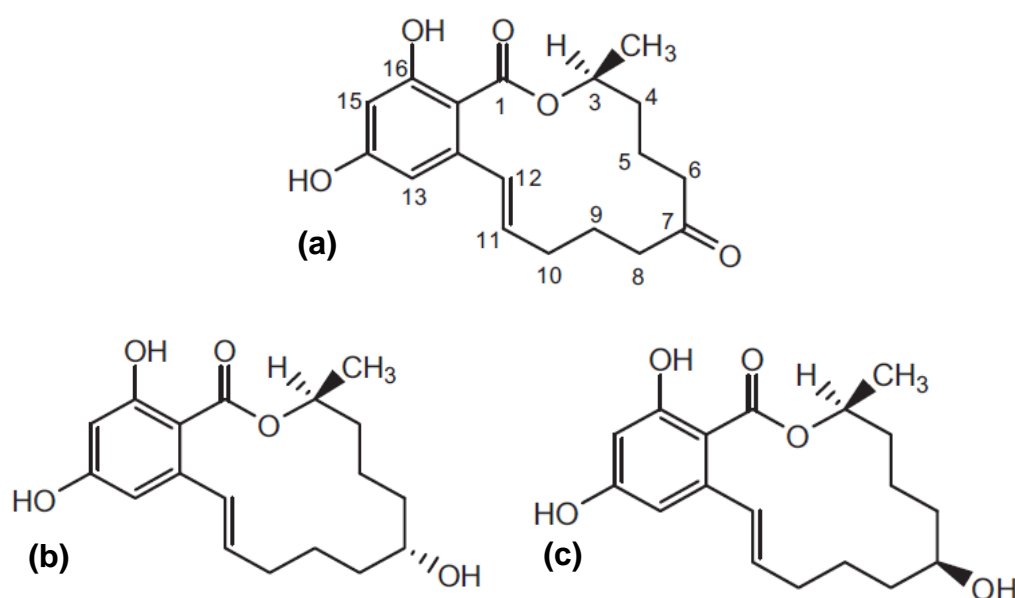
A diferencia de DON, la producción de ZEA no actúa como mecanismo de patogenicidad en el desarrollo de la enfermedad en trigo<sup>6</sup>. Su síntesis puede presentarse en diversas etapas del procesamiento de los alimentos, como el crecimiento a campo, la cosecha y el almacenamiento<sup>21</sup>.

Los principales metabolitos de esta micotoxina son el  $\alpha$ -zearalenol y  $\beta$ -zearalenol (Figura 8b y 8c respectivamente). Estos metabolitos son resultado de una de las vías principales de biotransformación en animales, la hidroxilación, pudiendo darse en diferentes partes del organismo, como las células de la granulosa porcina y bovina, la mucosa intestinal porcina, la línea celular Caco-2 intestinal humana y eritrocitos de ratas<sup>21,36</sup>.

La ZEA, el  $\alpha$ -zearalenol y  $\beta$ -zearalenol, causan hiperestrogenismo, afectando la reproducción de animales<sup>20</sup>. Se ha demostrado in vitro, que son capaces de unirse competitivamente a los receptores de estrógeno (RE), uniéndose a receptores

específicos en útero, glándula mamaria, hígado e hipotálamo de diferentes especies. En cuanto a su unión a los RE,  $\alpha$ -zearalenol y  $\beta$ -zearalenol, presentaron mayor y menor fuerza de unión respectivamente comparado con ZEA ( $\alpha$ -zearalenol > ZEA >  $\beta$ -zearalenol) <sup>21,27,36</sup>.

Esta micotoxina afecta principalmente a cerdos y aves <sup>20</sup>. Los cerdos en particular son la especie más susceptible a estas micotoxinas, causando vulvovaginitis en hembras y feminización en machos, pudiendo ser transmitida a las crías a través de la leche causando estrogenismo. Los rumiantes son más resistentes a los efectos de esta micotoxina que los animales monogástricos, probablemente debido a la degradación de esta en el rumen <sup>27</sup>.



**Figura 8** - Estructura química de (a) Zearalenona y sus metabolitos principales, (b)  $\alpha$ -zearalenol y (c)  $\beta$ -zearalenol

Fuente: EFSA Panel 2016 <sup>37</sup>

Además de poseer propiedades hepatotóxicas, inmunotóxicas y genotóxicas, se ha demostrado mediante estudios in vivo, que ZEA inhibe el crecimiento de la flora microbiana gastrointestinal beneficiosa e induce una respuesta inmunitaria de la mucosa intestinal, provocando inflamación de la mucosa. También provoca modificaciones en la metilación del ADN y la expresión de genes relacionados con receptores nucleares y vías metabólicas como IGF1, HK2, PXR y PPAR $\gamma$  en la línea celular de cáncer de mama <sup>21</sup>.

## 1.4 Micotoxinas modificadas

Se conoce como micotoxinas modificadas a aquellas micotoxinas que sufrieron algún tipo de reacción química que generó cambios en la estructura de la micotoxina original. Pueden ser producidas por el hongo o formarse por mecanismos de defensa de la planta infectada, como un intento de eliminar o disminuir la toxicidad de la micotoxina. Su formación puede darse durante el procesamiento del alimento, pudiendo en algunos casos revertir a la molécula original durante el metabolismo del individuo que la ingiera <sup>17</sup>.

Una forma de clasificación de las micotoxinas las divide en formas libres, modificadas y asociadas a la matriz. La forma libre correspondería a la micotoxina producida por el metabolismo secundario del hongo; modificadas, son aquellas que presentan un cambio estructural de la molécula original, ya sea por forma química (procesamiento) o biológica (planta, animal, microorganismo); asociadas a la matriz, son aquellas que forman complejos con la matriz del alimento o están físicamente unidas a él, sin reacción <sup>17</sup>.

Las micotoxinas modificadas pueden detectarse junto con la forma libre, en algunos alimentos procesados, incluso superándola en concentración, por lo que es de gran importancia la comprensión de su formación y degradación para modelos de evaluación de riesgo <sup>17</sup>. Los modelos deben tomar en cuenta la forma libre, así como las modificadas. En el caso del DON, estos incluirían las variables acetiladas mencionadas previamente, así como el deoxinivalenol-3-glucósido (D3G), la micotoxina modificada más prevalente de DON <sup>19,28</sup>.

Las modificaciones químicas introducidas tienen efecto potencial sobre la toxicidad de la molécula, aumentando o disminuyendo la misma con respecto a la micotoxina libre. Entre el grupo de micotoxinas modificadas, ZEN-14-sulfato y D3G, se encuentran con mayor frecuencia en los alimentos. Sus propiedades toxicológicas están siendo investigadas, así como la conversión de D3G a DON y ZEN-14-sulfato a ZEA por microorganismos del tracto intestinal <sup>20</sup>.

En particular, el D3G ha incrementado su relevancia dada la frecuencia de contaminación de cultivos con DON. Si bien el D3G presenta un impedimento estérico, que le impide unirse al ribosoma y, por lo tanto, no activar las MAPK ni inducir inflamación, el mismo puede ser metabolizado a su forma original. Luego de la ingestión, el enlace de glucósido puede escindirse por acción de las bacterias

presentes en el tracto gastrointestinal, distribuyéndose, metabolizándose y excretándose de igual forma que el DON <sup>19,28</sup>.

La falta de estudios toxicológicos para las toxinas modificadas representa un verdadero peligro para la salud pública, hasta ahora difícil de evaluar. Dado el potencial de revertir a la molécula original durante el proceso de digestión, o de generar un compuesto de mayor toxicidad, el riesgo a la salud derivado de una subestimación del contenido total de micotoxinas es aún mayor <sup>19</sup>.

## 1.5 Co-detección y exposición

Las matrices alimentarias pueden ser contaminadas con diferentes cepas de hongos micotoxigénicos, implicando la acumulación de más de uno de estos metabolitos en las mismas. A su vez, una sola cepa fúngica puede ser capaz de producir un amplio espectro de micotoxinas estructuralmente diferentes <sup>9,17</sup>.

En el caso de las micotoxinas derivadas de *Fusarium*, los perfiles de co-detección pueden diferir dada la distribución geográfica de los distintos quimiotipos, así como por el empleo de cultivares con diferente susceptibilidad a la infección <sup>28</sup>.

Varias investigaciones han evaluado el contenido de micotoxinas en alimentos, abarcando generalmente únicamente aquellas que son reguladas o para las que existe niveles recomendados de contenido de micotoxina <sup>20</sup>.

En investigaciones realizadas por el grupo de Kovalsky y colaboradores <sup>20</sup>, se evaluó la presencia de micotoxinas que poseen límites recomendados, y sus formas modificadas, en 1113 muestras de origen global (44 países) de pienso, maíz y silos de maíz, recolectadas en el período 2012 a 2015. Con relación a las micotoxinas que nos interesan, se evidenció la prevalencia de ZEA y DON en los productos evaluados. Estas estuvieron presentes en un 88% y 79% de las 1113 muestras respectivamente, con valores por encima de los límites recomendados en más del 50% de las muestras. A su vez se observó una alta prevalencia de las micotoxinas modificadas asociadas a ellas D3G (70%) y ZEA-14-sulfato (47%) <sup>20</sup>.

Otro ejemplo son los resultados obtenidos por Palacios y colaboradores <sup>38</sup>, quienes evaluaron la ocurrencia de DON, 3ADON y 15ADON, y D3G, en 84 muestras de trigo duro, provenientes de la principal zona de producción de Argentina, durante los años 2012/13 y 2013/14. Todas las muestras analizadas presentaron DON en concentraciones que variaron entre 50 y 9480 µg/kg, con un 30% de las muestras con

valores por encima del máximo establecido por el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N°1881/2006 de 1750 µg/kg para granos de trigo duro sin procesar. En un 94% de las muestras se detectó D3G en niveles entre 50 a 850 µg/kg. Además, en un 49% de las muestras fueron detectados 3ADON y 15ADON expresándose su concentración como la suma de ambos, en niveles que iban desde 20 hasta 190 µg/kg<sup>38</sup>.

Observaciones realizadas por esta investigación notaron que la contaminación por DON dependía del año de cosecha y de la ubicación geográfica. Esto, como se mencionó previamente, podría atribuirse a las condiciones climáticas, particularmente durante la antesis. Otra observación es que, si bien se detectaron las variables acetiladas y D3G, este último se presentó con una frecuencia mayor, aportando hasta un 22% del contenido total de DON<sup>38</sup>.

Información recolecta por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), de diversas investigaciones evaluando las concentraciones de DON y al menos uno de 3ADON, 15ADON y/o D3G en granos destinados al consumo humano, mostró ocurrencia frecuente de DON. Las concentraciones informadas fueron de hasta 23800 µg/kg para DON, con niveles más bajos para D3G, con un valor máximo de 6.600 µg/kg, y concentraciones aún más bajas para 3ADON y 15ADON con concentraciones máximas notificadas de 2720 y 244 µg/kg, respectivamente<sup>28</sup>.

Datos publicados sobre la co-detección de NIV y DON han demostrado que, en prácticamente todos los casos, la presencia de NIV en granos y derivados va acompañada de la presencia de DON, generalmente en concentraciones mucho más altas que NIV<sup>32</sup>.

La co-exposición a dos o más micotoxinas en los alimentos aumenta los potenciales efectos nocivos al consumidor, dado los efectos toxicológicos combinados de las mismas<sup>19</sup>. A causa de esto, la frecuencia de estudios de co-exposición y toxicidad ha ido en aumento<sup>26</sup>.

La exposición a mezclas de micotoxinas tanto para humanos como para animales, por lo general, ocurren a través de dietas diversificadas, con alimentos de múltiples orígenes<sup>26</sup>. Esto debe tenerse en cuenta al momento de una caracterización del riesgo de exposición. Una de las preocupaciones crecientes, son los efectos órgano específicos, y aún más los efectos subclínicos en la flora bacteriana gastrointestinal, ya que los mismos pueden ocurrir a concentraciones bajas<sup>19</sup>.

La exposición a DON proviene principalmente de cereales y alimentos a base de cereales. La principal fuente en las dietas regionales de Europa, Latinoamérica y del Medio Oriente es el trigo (64 - 88% de la exposición total). En las dietas de África y Oriente Lejano hay más variación, siendo el trigo, arroz y maíz en la dieta africana, y trigo y arroz en la dieta Oriente Lejano las fuentes de exposición <sup>34</sup>. El DON puede ocurrir solo o en combinación con sus formas acetiladas (3ADON y 15ADON) y D3G. Este último pudiendo encontrarse en niveles de 10 a 20% el nivel de DON <sup>26</sup>.

En cuanto a los animales, su exposición a la suma de DON, 3ADON, 15ADON y D3G es principalmente a través del consumo de granos de cereales, subproductos de cereales y maíz forrajero <sup>28</sup>.

De acuerdo con datos obtenidos por la EFSA para la caracterización de riesgo de exposición al NIV, los granos y los alimentos a base de granos constituyen la mayor fuente dietética para esta micotoxina. Los contribuyentes más importantes dentro de esta categoría de alimentos son el pan y los cereales productos de molienda. Aunque la concentración de NIV en estos puede ser relativamente baja, su alto consumo tuvo una contribución importante a la exposición en todas las edades, con excepción de los infantes. Otros contribuyentes importantes de NIV son la pasta, productos de panadería fina y cereales para el desayuno. En relación con éstos últimos, la contribución de NIV fue mayor en niños y adolescentes en comparación con los adultos. El aporte de la pasta fue importante en los países europeos con alto consumo de este alimento <sup>32</sup>.

Si bien el NIV no suele encontrarse en los forrajes conservados de gramíneas y leguminosas, puede estar presente en ensilajes de maíz empleados como alimento para rumiantes <sup>32</sup>.

En cuanto a la ZEA, las concentraciones más altas informadas en los reportes a EFSA fueron para salvado de trigo, maíz y productos derivados, por ejemplo, harina o copos de maíz, aceites. Los cereales para el desayuno aportan una contribución del 0,4 al 17% de la exposición alimentaria total a ZEA en adultos, y 0,1-5,1% en infantes. Productos como pan y productos de panadería fina, producen la mayor contribución a la exposición a la ZEA en todas las edades. También son contribuyentes a la exposición aceites vegetales, especialmente el aceite de germen tanto de maíz como de trigo <sup>39</sup>.

## 1.6 Regulaciones

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA), o por su nombre en inglés, Food and Agriculture Organization (FAO), son las responsables de la evaluación de riesgos de la exposición a micotoxinas a través de los alimentos, y de recomendar medidas adecuadas para proteger o disminuir dicha exposición. Evaluaciones de riesgo realizadas por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) son empleadas por los gobiernos y la Comisión del *Codex Alimentarius* (el organismo intergubernamental que establece las normas para los alimentos), para establecer niveles máximos de micotoxinas en los alimentos o proporcionar asesoramiento en gestión de riesgos para controlar o prevenir la contaminación <sup>40</sup>.

Se han establecido regulaciones para las micotoxinas más importantes en los alimentos, tanto para comercio nacional como internacional, encontrándose dentro de estas las aflatoxinas, tricotecenos tipo A, DON, ZEA, fumonisinas y ocratoxina A <sup>20</sup>.

En la Unión Europea, los valores máximos permitidos varían con el producto, grado de procesamiento y consumidor <sup>20</sup>. En la tabla 1 se presentan los contenidos máximos de DON y ZEA en trigo y alimentos derivados, de acuerdo con el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N°1881/2006 <sup>41</sup>. Aún no existe regulación para 3ADON, 15ADON o NIV.

Producto alimenticio	Contenido máximo (µg/kg)
<b>Deoxinivalenol</b>	
<i>Trigo duro y avena no elaborados</i>	1750
<i>Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales [incluida la harina de maíz, y el maíz triturado y molido], salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen, a excepción de los productos alimenticios</i>	750
<i>Pasta (seca)</i>	750
<i>Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno</i>	500
<i>Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad</i>	200
<b>Zearalenona</b>	
<i>Cereales no elaborados distintos al maíz</i>	100
<i>Cereales destinados al consumo humano directo, harina de cereales, salvado como producto final comercializado para el consumo humano directo y germen</i>	75
<i>Pan (incluidos pequeños productos de panadería), pasteles, galletas, aperitivos de cereales y cereales para desayuno, excluidos los aperitivos de maíz y los cereales para el desayuno a base de maíz</i>	50
<i>Alimentos elaborados a base de cereales (excluidos los alimentos elaborados a base de maíz) y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad</i>	20

**Tabla 1** - Contenido máximo de DON y ZEA, en trigo y alimentos derivados, según el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N°1881/2006.

En los Estados Unidos quien regula y supervisa la contaminación de los alimentos es la FDA (Food and Drug Administration). Particularmente la FDA se centra en las aflatoxinas, el DON, las fumonisinas, la patulina y la ocratoxina A <sup>42</sup>.

La FDA no establece límites máximos, solo niveles de recomendación para DON, en grano de trigo y en productos a base de trigo, para proporcionar un margen de seguridad adecuado en la industria y proteger la salud humana y animal <sup>2,43</sup>. Otras

micotoxinas, como los derivados acetilados de DON o NIV, así como ZEA aún no han sido reguladas por la FDA.

De acuerdo con las guías para la industria y la FDA, los límites recomendados para DON, emitidos por el Centro para la Medicina Veterinaria y el Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición aplicada, con fecha de julio de 2010, son los presentados en la tabla 2 <sup>44</sup>.

Alimento	Límite recomendado de DON (µg/kg)
<i>Productos derivados de trigo acabados, harina, salvado y germen, que potencialmente pueden ser consumidos por humanos</i>	1000
<i>Granos y subproductos de granos (sobre una base de 88 % de materia seca)</i>	10000

**Tabla 2** - Límites recomendados para DON en productos de trigo para consumo humano, granos y sub-productos de granos, según las guías para la Industria y FDA.

En Argentina, la Resolución Conjunta N°22/2019 incorporó al Código Alimentario Argentino el artículo 156 quarter, referido a los límites máximos de micotoxinas en alimentos, y el artículo 1414 tris, concerniente a los parámetros de referencia para la determinación de estos contaminantes. En la tabla 3 se muestran los límites para DON establecidos en el Artículo 156 quarter. Otras micotoxinas reguladas son Ocratoxina A y Fumonisinias (B1+B2), no habiendo regulación para las variables acetiladas de DON, NIV o ZEA <sup>45</sup>.

Alimento	Límite máximo de DON (µg/kg)
<i>Alimentos a base de cereales para lactantes y niños pequeños</i>	200
<i>Harina de maíz y sémola de trigo</i>	1000
<i>Harina, sémola, semolina y hojuelas o copos de trigo</i>	1000

**Tabla 3** - Límites máximos de DON en alimentos en Argentina; Artículo 156 de la Resolución Conjunta N°22/2019 del Código Alimentario Argentino.

En Brasil, de acuerdo con la Resolución RDC N°7, del 18 febrero 2011, posteriormente ampliada en los años 2012, 2014 y 2016, se establecen los Límites Máximos de Tolerancia (LMT) para DON y ZEA en trigo y derivados (Tabla 4) <sup>46</sup>.

Alimento	Límites Máximos de Tolerancia (µg/kg)
	<b>Deoxinivalenol</b>
<i>Para trigo integral, trigo para quibe, harina de trigo integral, salvado trigo, salvado de arroz, grano de cebada</i>	1000
<i>Harina de trigo, pasta, galletas saladas, crackers y productos de panadería, cereales y productos de cereales distintos del trigo incluida la cebada malteada</i>	750
	<b>Zearalenona</b>
<i>Harina de trigo, pasta, galletas saladas y productos de panadería, cereales y productos a base de cereales distintos del trigo, incluida la cebada malteada, así como para arroz procesado y derivados</i>	100
<i>Trigo Integral, harina de trigo integral, salvado de trigo</i>	200

**Tabla 4** - Límites Máximos de Tolerancia para DON y ZEA, en trigo y derivados, de acuerdo con la Resolución RDC N°7 de Brasil.

Según el informe anual del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) del 2012 para Brasil, las micotoxinas fueron el principal riesgo en las notificaciones de rechazo en frontera en la Unión Europea, siendo aflatoxinas, ocratoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas y zearalenona las responsables del 99,8% de denuncias de riesgos de contaminación en el período 2008-2012 <sup>47</sup>.

En Uruguay, el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional del 31/05/2006, establece los límites máximos de aflatoxinas, ZEA, DON, patulina y ocratoxina A en determinados grupos de alimentos. Para ZEA el límite máximo es 200 µg/kg en maíz y grano de cebada, no estando regulada en trigo; para DON es ≤1000 µg/kg para harina de trigo, sub-productos del trigo y alimentos elaborados en base a trigo (Tabla 5) <sup>48</sup>.

Según la Resolución S/N/001 del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), se establecen los límites máximos para DON en alimentos destinados a consumo animal (Tabla 5). Para las materias primas (granos y sus sub-productos)

destinados a la elaboración de alimentos para animales se establece un límite máximo de DON de 10 mg/kg <sup>49</sup>.

Alimento para consumo humano	Límite máximo (µg/kg)
<b>Deoxinivalenol</b>	
<i>Harina de trigo, subproductos del trigo y alimentos elaborados en base a trigo</i>	≤1000
<b>Zearalenona</b>	
<i>Maíz y grano de cebada</i>	200
Alimento de consumo animal	Límite máximo de DON (µg/kg)
<i>Bovinos de carne, ovinos y aves</i>	5000
<i>Bovinos de leche</i>	2000
<i>Cerdos y equinos</i>	1000
<i>Otros animales</i>	2000

**Tabla 5** - Límites máximos de DON y ZEA en alimentos de acuerdo con el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional del 31/05/2006. Límites máximos de DON en alimentos destinados para consumo animal, de acuerdo con la resolución S/N/001 del MGAP.

El Panel sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) de EFSA estableció la ingesta diaria máxima tolerable provisional (PMTDI) conjunta para DON, 3ADON y 15ADON de 1 µg/kg de peso corporal. Con respecto al D3G, una ingesta diaria tolerable (TDI) no fue establecida por falta de datos con respecto a su toxicidad y exposición a este metabolito u otras micotoxinas modificadas. Dada la potencial metabolización del D3G a nivel intestinal a DON, se considera que su nivel de toxicidad es similar al DON, por lo que D3G fue integrado al grupo para la PMTDI <sup>34,35</sup>.

El NIV presenta mayor toxicidad que el DON en los seres humanos y animales domésticos, por lo tanto, se ha establecido un límite más estricto para la ingesta diaria tolerable temporal de NIV de 0,7 µg/kg de peso corporal <sup>50</sup>.

## 1.7 Situación en Uruguay

El trigo es el principal cultivo de invierno en Uruguay, representado entre un 50 a 60% de la superficie cerealera del país. La producción mayoritaria está concentrada en el litoral del país, en los departamentos de Soriano (25%), Colonia (20%), que junto con Río Negro y Paysandú comprenden el 75% del área de cultivo de trigo. Superficies menores se encuentran en San José y Flores. La producción de trigo abastece a la industria molinera que elabora harina y proporciona afrechillo, subproducto de importancia en la alimentación animal <sup>51</sup>.

De acuerdo con los datos de la Encuesta Agrícola “Primavera 2022” (30/01/2023) la producción de trigo alcanzó 1.283.164 toneladas, el mayor registro de los últimos 8 años <sup>52</sup>. En los últimos siete años las exportaciones han mostrado un fuerte crecimiento; totalizando en el año 2021, US\$147 millones y 600.000 toneladas, implicando un incremento de 125% en valor y 95% en volumen <sup>53</sup>.

La FE es una de las principales limitaciones en la producción de trigo nacional, causando epidemias en el trigo del país que generaron pérdidas de rendimiento de hasta un 60%<sup>12</sup> y disminuciones en los precios debido a una menor calidad de la semilla y la contaminación por micotoxinas. Estos brotes han ocurrido de forma moderada a severa, cada uno o dos años, durante la última década <sup>14,50</sup>.

En los últimos 15 años, la FE ha causado pérdidas económicas importantes a los productores, y la industria. A su vez, los exportadores se ven enfrentados a las restricciones crecientes en los niveles de DON en grano impuestos por algunos países compradores. Esto lleva al sector a trabajar arduamente para intentar mantener el contenido de DON dentro de las regulaciones estipuladas según el decreto 533/001 <sup>12</sup>.

Estudios realizados por grupos de investigación nacional han determinado que el patógeno predominante tanto en granos de trigo como de cebada, es el *F. graminearum* con el quimiotipo 15ADON <sup>3,14,15</sup>. A su vez se detectaron poblaciones del quimiotipo NIV de *F. asiaticum* en trigo proveniente de las principales áreas productoras de arroz de Uruguay, siendo el primer reporte de esta especie en el país. En 2012, la mayoría de los aislamientos caracterizados, fueron identificados como *F. graminearum* (130/151), y en menor proporción se identificaron *F. asiaticum* (11), *F. cortaderiae* (7), *F. brasilicum* (2) y *F. austroamericanum* (1). Con la excepción de un único aislamiento con el quimiotipo 3ADON, y algunos aislamientos de *F. cortaderiae*,

*F. asiaticum* y *F. brasiliicum* quimiotipo NIV, el resto de los aislamientos de *F. graminearum* presentaban el quimiotipo 15ADON<sup>3</sup>.

Estos resultados coinciden con estudios previos, que han documentado el predominio de *F. graminearum* y el quimiotipo 15ADON entre los aislamientos de FE de trigo en Uruguay, Argentina y Brasil. A su vez se demostró la presencia del quimiotipo NIV, predominantemente en el área de producción de Cerro Largo en el este de Uruguay<sup>3</sup>.

En un estudio publicado en 2022, en muestras de trigo de diversas áreas productoras de Uruguay, nuevamente se demostró el predominio de *F. graminearum sensu stricto* (64,9%), como principal causal de FE en trigo, con *F. poae* (19,1%) y *F. avenaceum* (8,2%) en segundo y tercer lugar respectivamente. En menor proporción se identificaron aislamientos de *F. tricinctum* con un 4,6%. Un alto porcentaje de estos (96,4%) pertenecen al quimiotipo 15ADON y el resto al quimiotipo NIV. No se detectó el quimiotipo 3ADON<sup>14</sup>.

Anualmente en Uruguay, INIA realiza informes de calidad e inocuidad (contenido de DON) de trigo, cuyo objetivo es caracterizar anualmente la zafra de trigo y generar datos históricos, para conocer como es la producción de nacional, identificar tendencias de cambio en la producción a través del tiempo, y producir información confiable y de mayor calidad al momento de toma de decisiones agrícolas, operativas y/o comerciales<sup>54</sup>.

La evaluación del contenido de DON es uno de los principales parámetros indicadores de calidad del trigo. En el año 2012 se registró el mayor contenido de DON, con un promedio de 6200 µg/kg, seguido por 2340 µg/kg en 2019, 2280-2290 µg/kg en el período 2013/2014 y 1340 µg/kg en 2009<sup>54</sup>.

## **1.8 Métodos de detección y cuantificación de micotoxinas**

Para definir el perfil de micotoxinas circulantes asociadas a FE, además de la caracterización de los quimiotipos, es necesaria la caracterización química de los metabolitos en las muestras<sup>50</sup>.

La determinación de micotoxinas es un desafío debido a la complejidad de las matrices alimentarias, la dificultad de obtención de muestras homogéneas, y la necesidad de métodos con bajos límites de detección y cuantificación<sup>55</sup>.

La mayoría de los métodos analíticos requieren pasos previos de extracción del analito de la muestra de interés, seguidos de pasos de limpieza del extracto (clean-up) y/o de concentración, previo a su análisis instrumental final <sup>55</sup>.

La Unión Europea, establece guías que proporcionan un sistema de garantía y control de calidad armonizado, garantizando la comparabilidad de los resultados analíticos, logrando precisiones aceptables, evitando falsos positivos o negativos, apoyando el cumplimiento e implementación específica de la norma ISO/IEC 17025 (estándar de acreditación). Además de los criterios para validación de métodos analíticos, estas guías establecen lineamientos para el muestreo, transporte, trazabilidad y almacenamiento de las muestras <sup>56,57</sup>.

### **1.8.1 Muestreo**

El muestreo es un paso fundamental en la obtención de resultados representativos relacionados con el contenido de micotoxinas, dado que las mismas se encuentran generalmente distribuidas de forma heterogénea. Es por esto que la Unión Europea, establece criterios generales que deben cumplirse para un correcto muestreo. En particular, el Reglamento N°401/2006 de la Comisión Europea (CE), establece los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios <sup>58</sup>. Este reglamento establece las siguientes definiciones:

Lote: cantidad identificable de un producto alimenticio, entregada en una vez y que presenta características comunes como el origen, la variedad, el tipo de envase, el envasador, el expedidor o el marcado.

Sublote: parte de un lote más grande designada para aplicar en ella el método de muestreo. Cada sublote deberá estar separado físicamente y ser identificable.

Muestra elemental: cantidad de material tomada en un único punto del lote o sublote. En la medida de lo posible, las muestras elementales se tomarán en distintos puntos del lote o sublote.

Muestra global: agregación de todas las muestras elementales tomadas del lote o sublote.

Muestra de laboratorio: muestra destinada al laboratorio.

Muestras idénticas: garantizan el cumplimiento de la normativa, con fines comerciales (defensa) o de referencia (arbitraje), tomándose de la muestra homogeneizada global.

Se establece que la toma de muestra debe ser realizada por personal autorizado por el Estado miembro, adoptando las medidas necesarias para garantizar su seguridad al realizar el muestreo. Todo lote debe ser analizado por muestreo separado, dividiendo grandes lotes en sublotes que serán muestreados por separado. Se debe tener precaución durante el muestreo y la preparación de las muestras para evitar toda alteración que pueda afectar el contenido de micotoxinas, influyendo en determinación analítica o invalidando la representatividad de las muestras globales <sup>58</sup>.

Dada la diversidad de formas de comercialización de los productos alimenticios (granel, en contenedores, envases individuales, etc.), el método de muestreo deberá poder aplicarse a todas ellas. Para muestreo de los lotes comercializados en envases individuales, como sacos, bolsas o envases para la venta al por menor, se puede calcular la frecuencia de muestreo (n) tomando en cuenta el peso del lote, muestra elemental, muestra global y peso del envase individual <sup>58</sup>.

$$n = \frac{\text{peso del lote (kg)} \times \text{peso de la muestra elemental(kg)}}{\text{peso de la muestra global(kg)} \times \text{peso de un envase individual(kg)}}$$

Los métodos de muestreo se establecen para distintas matrices. En el caso particular de los cereales y productos a base de estos, el método es aplicable para el control oficial de los contenidos máximos establecidos para la aflatoxina B1, las aflatoxinas totales, la ocratoxina A y las toxinas de *Fusarium* <sup>58</sup>.

Como se mencionó previamente, el número de muestras elementales se establece de acuerdo con el tamaño del lote. La muestra elemental deberá tener un peso aproximado de 100 g. A mayor tamaño de lote, mayor número de muestras elementales serán necesarias para conformar la muestra global <sup>58</sup>.

### **1.8.2 Transporte**

En cuanto al acondicionamiento y transporte de las muestras, el Reglamento N°401/2006 de la Comisión Europea (CE) establece que cada muestra debe ser colocada en un recipiente limpio, de material inerte, que ofrezca una protección adecuada contra la contaminación y el deterioro que pudiera resultar del transporte. Se tomarán todas las precauciones necesarias para evitar cualquier modificación de la composición de la muestra que pudiera ocurrir durante el transporte o el almacenamiento <sup>58</sup>.

Para su uso oficial, cada muestra tomada se precintará en el lugar de muestreo y se identificará según las disposiciones vigentes en el Estado miembro. De cada toma de muestras deberá establecerse un acta que permita identificar sin ambigüedad cada lote y que indique la fecha y el lugar del muestreo, así como toda información adicional que pueda resultar útil al analista <sup>58</sup>.

### ***1.8.3 Preparación de las muestras y procesamiento***

Uno de los primeros pasos del análisis es la molienda, que constituye uno de los procedimientos más empleados de pre-tratamiento de muestras. La molienda permite mejorar la eficiencia de la extracción en productos con bajo contenido de humedad, como cereales, especias, hierbas secas. Se recomienda la obtención de tamaños de partícula pequeños, de preferencia menores a 1 mm. Es de esperar que tanto el procesamiento como la preparación de la muestra no generen un efecto significativo sobre el contenido de los analitos presentes en la muestra. Por esto, la molienda debe llevarse de forma tal, que no se genere calentamiento para evitar la pérdida o alteración de los analitos. La trituración de la muestra debe garantizar que la misma sea lo suficientemente homogénea para garantizar que la variabilidad del submuestreo es aceptable <sup>56</sup>.

### ***1.8.4 Procedimientos de extracción***

La extracción de los analitos de la muestra es un previo al análisis instrumental en la mayoría de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de micotoxinas en matrices alimentarias <sup>59</sup>. Múltiples parámetros pueden afectar tanto la estabilidad del analito como la eficiencia de la extracción. Dentro de ellos se encuentran el tipo de procesamiento de la muestra, solvente utilizado, relación solvente/agua y muestra, pH del medio de extracción, tipo de agitación, entre otros <sup>56</sup>.

La elección de las condiciones de análisis dependerá de las propiedades químicas del analito a analizar y el tipo de matriz por lo que deben realizarse ensayos de recuperación y estos deben permanecer consistentes durante la aplicación de la metodología en cuestión <sup>59</sup>.

Una tendencia en desarrollo es la de la Química Verde Analítica, motivada por el deseo de que el análisis químico sea más respetuoso con el medio ambiente. Los principios clave son, entre otros, la reducción de residuos y el uso de disolventes más seguros. Una forma de reducir la cantidad de sustancias químicas empleadas es mediante la reducción del tamaño de la muestra. Esto implicaría una reducción del

volumen de extracción, manteniendo una alta proporción solvente/muestra <sup>60</sup>. Es por esto que la tendencia actual en el análisis de contaminantes es desarrollar métodos miniaturizados, que utilicen una baja cantidad de muestra, solventes y material de laboratorio descartable.

### **1.8.5 Limpieza de la muestra (clean-up)**

Luego de la extracción, la solución (extracto) obtenido, suele requerir otros tratamientos previos a su análisis en el sistema cromatográfico. Algunos ejemplos de estos son: pasos de limpieza o dilución, necesarios para disminuir las interferencias de la matriz, y así disminuir la cantidad de co-extractivos que puedan interferir a la hora del análisis y/o reducir la vida útil de los instrumentos. Estos pasos permitirían mejorar la selectividad y robustez de las técnicas <sup>56</sup>.

En general, las técnicas de clean-up emplean diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los analitos, como polaridad, solubilidad, tamaño molecular, para separar los analitos de interés de los contaminantes. Sin embargo, esto puede llegar a ser una limitación en métodos multi-residuos, donde los analitos buscados presenten diferencias relevantes en estas propiedades <sup>56</sup>.

Si bien numerosos métodos analíticos cuentan con pasos clean-up, en algunos no son necesarios, como por ejemplos métodos de tamizaje (screening) como los inmunoabsorbentes ligados a enzimas, dispositivos de flujo lateral y ensayos de biosensores <sup>59</sup>.

Por otro lado, los procesos de concentración de los extractos pueden provocar la precipitación de componentes de la matriz, así como procesos de dilución con solventes de diferente polaridad pueden disminuir la solubilidad de los analitos <sup>59</sup>.

### **1.8.6 Métodos de extracción y purificación**

Dentro de las estrategias empleadas para purificación o clean-up en la determinación de micotoxinas en muestras de cereales, se encuentran la extracción en columnas de extracción en fase sólida (SPE), columnas de inmunoafinidad, columnas de intercambio iónico y extracción sólida-líquida <sup>59</sup>.

Los solventes empleados con mayor frecuencia para la extracción de micotoxinas son metanol/agua y acetonitrilo/agua, acetona acidificada y acetato de etilo/acetonitrilo/agua. La adición de agua al solvente mejora la eficiencia de extracción de productos de baja humedad (cereales, frutas secas), estimulando a los

granos a hincharse, ayudando a la liberación de las micotoxinas a la fase orgánica<sup>56,59</sup>.

El acetonitrilo tiene una gran capacidad para extraer moléculas de diferentes polaridades y evitando la extracción de materiales lipófilos, como las grasas. En matrices como cereales se ha observado un mejor desempeño con proporciones de agua y mezcla de acetonitrilo/ácido fórmico (80:20, v/v). El empleo de acetonitrilo, así como de ácido fórmico mejoran el rendimiento analítico<sup>61</sup>.

Para asegurar el contacto adecuado entre solventes y muestra, varias técnicas físicas pueden ser empleadas para la mezcla, favoreciendo a su vez la extracción, como ser el uso de agitadores mecánicos tipo vortex, shaker o agitación manual<sup>59</sup>.

### *Método QuEChERS*

QuEChERS (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) es una metodología de extracción sólida-líquida de preparación de muestras, reportada por primera vez en 2003. A partir de ese año, numerosas variantes de esta metodología han sido reportadas para el análisis de diversas matrices e innumerables contaminantes químicos. El procedimiento implica una extracción inicial con acetonitrilo, procedido por un paso de adición de una mezcla de sales. Las principales sales empleadas son cloruro de sodio (NaCl) y sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), aunque según el tipo de QuEChERS otras sales como acetato de sodio, citrato de sodio, entre otros han sido reportadas. El extracto obtenido luego se purifica por medio de una extracción dispersiva en fase sólida (d-SPE) para disminuir las interferencias de la matriz<sup>62,63</sup>.

Este método permite el procesamiento de numerosas muestras simultáneamente, utiliza baja cantidades de solvente, materiales y espacio de laboratorio<sup>62,63</sup>.

### **1.8.7 Método instrumental**

Diversas estrategias analíticas han sido reportadas para la detección de micotoxinas, que han ido evolucionando con el fin de determinar el mayor número de ellas simultáneamente<sup>64-67</sup>.

Los diversos métodos pueden dividirse, a grandes rasgos, en dos categorías, métodos de tamizaje y métodos confirmatorios.

### 1.8.7.1 Métodos de tamizaje

Los métodos de tamizaje son aquellos que nos permiten la detección de analitos de forma rápida, en situaciones donde una toma de decisión en el momento es necesaria, como ser en silos y fábricas, pudiendo ser adaptados para su uso en campo. La mayoría de estos métodos se basan en principios inmunológicos, usando anticuerpos específicos para las micotoxinas de interés <sup>55</sup>.

En general, estos métodos son de tipo cualitativo, indicando presencia o ausencia del analito problema, pero se han desarrollado a su vez una gran variedad de pruebas rápidas semicuantitativas o cuantitativas <sup>59</sup>.

Estas técnicas tienen como ventajas, la velocidad de obtención de resultado, preparación de muestra sencilla y bajo costo de análisis. El principal inconveniente de estas técnicas es la confiabilidad, pudiendo informarse falsos positivos. Es por esto que estos análisis deben ser procedidos por técnicas confirmatorias que verifiquen el resultado <sup>59</sup>.

El método más extendido es el Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas o ELISA (del inglés enzyme-linked immunosorbent assay), el cual puede ser semi cuantitativo o cuantitativo. Dentro de las variaciones de ELISA, el ensayo competitivo es de los más empleados, siendo una de las limitaciones de este ensayo las señales generadas por las toxinas relacionadas estructuralmente o la interferencia por la matriz, ya sea aumentando o disminuyéndola <sup>59</sup>.

Son alternativas rápidas y económicas, no requiriendo pasos posteriores de clean-up luego de la extracción, pudiendo determinarse un alto número de muestras por ensayo. Uno de los requisitos fundamentales para este tipo de pruebas es la especificidad de los anticuerpos empleados, es por ello que el principal inconveniente de esta técnica es la reactividad cruzada con micotoxinas estructuralmente similares, siendo necesario frente a resultados positivos, su posterior confirmación por otros métodos <sup>28</sup>. El DON no es la excepción, donde anticuerpos generados contra el DON, tienen una fuerte reactividad cruzada con el 3ADON, 15ADON o ambos, e incluso con D3G <sup>59</sup>.

Otras técnicas de tamizaje empleadas son la cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography, TLC), pruebas de tira reactiva, inmunoensayo polarización de fluorescencia (FPIA), ensayos de inmunofiltración y ensayos de biosensores <sup>59</sup>.

La detección de un analito mediante una técnica de tamizaje, sólo se puede informar de forma provisoria, siendo necesario un posterior análisis confirmatorio, mediante el empleo de un método cuantitativo validado. Si el analito no es detectado, el resultado se informa como menor a límite de detección de tamizaje (screening detection limit, SDL) <sup>56</sup>.

#### *Validación de métodos de tamizaje*

La validación de un método de tamizaje basado en un SDL puede centrarse en la detectabilidad del analito. Se debe realizar una validación inicial que involucre por lo menos 20 muestras, representando los grupos de productos básicos, fortificadas en el SDL estimado <sup>56</sup>.

Cuando el método de cribado está destinado únicamente a ser utilizado como un método cualitativo, no hay requisitos en cuanto a la recuperación de los analitos. Para determinar la selectividad, se deben de verificar los posibles falsos positivos empleando muestras “blanco”, no fortificadas. El SDL del método de screening cualitativo es el nivel más bajo en el que un el analito ha sido detectado en al menos 95 % de las muestras <sup>56</sup>.

#### **1.8.7.2 Métodos confirmatorios**

Se consideran métodos confirmatorios a aquellos que me permiten identificar y confirmar, de forma precisa, los analitos de interés. Aquellas muestras que arrojen resultados positivos en los métodos de tamizaje deben confirmarse mediante estos métodos <sup>59</sup>.

En general, los métodos más empleados son los que utilizan cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (HPLC), acoplado a diversos detectores específicos. Dentro de los detectores normalmente usados se encuentran para GC el detector de ionización en llama (FID), captura de electrones (CE), ultravioleta (UV), para HPLC el de arreglo de diodos (DAD) y fluorescencia. El detector universal que en la actualidad es el más utilizado acoplado tanto a GC como HPLC es el espectrómetro de masas (MS) <sup>59</sup>.

La mayoría de los métodos para detección de micotoxinas se basan en HPLC, acoplado a múltiples detectores, aunque la espectrometría de masas es probablemente el método analítico más empleado. Tiene como ventaja sobre los métodos convencionales, la capacidad de medir una amplia variedad de metabolitos

simultáneamente, a concentraciones bajas, produciendo resultados exactos y precisos<sup>59</sup>.

Las micotoxinas modificadas eluden la detección dado que los cambios en su estructura pueden disminuir la eficiencia de su extracción por cambios en la polaridad o alterar las zonas de reconocimiento de anticuerpos (epítopes) en técnicas inmunológicas<sup>17,30</sup>. O también, debido a las similitudes estructurales con la micotoxina libre, pueden detectarse junto con esta, como es el caso de algunos inmunoensayos, por reactividad cruzada<sup>20</sup>.

Para el estudio de las micotoxinas modificadas se pueden emplear enfoques directos, mediante el uso de estándares, o enfoques indirectos, basados en la conversión de una micotoxina modificada en la micotoxina original, por ejemplo, conversión a DON para la determinación de D3G. La desventaja del enfoque directo es la falta de estándares analíticos necesarios para realizar la cuantificación, son pocos los estándares comerciales disponibles y son de alto costo<sup>28,67</sup>.

## **1.9 Guías para la validación de métodos analíticos**

Los métodos analíticos validados son aquellos que han sido sometidos a una evaluación de desempeño en la cual se han determinado características tales como veracidad (recuperación), precisión o precisión intermedia a partir de la repetitividad y la reproducibilidad, robustez, límite de cuantificación, linealidad y efecto matriz<sup>68</sup>.

Es un requisito para cuerpos de acreditación, así como la verificación de su rendimiento durante análisis de rutina, empleando controles de calidad analíticos y la validación continua del método<sup>56</sup>.

### **1.9.1 Parámetros de validación de métodos analíticos**

Una validación es llevada a cabo al finalizar el desarrollo de un método o previo a la introducción de una nueva metodología al análisis de rutina. Se distingue entre validación inicial de un método analítico cuantitativo, y validación de la extensión del alcance de un método ya existente, cuando se incluyen nuevos analitos y/o matrices. A su vez se llevan a cabo verificaciones continuas (on-going validation) del desempeño del método durante el análisis de rutina de laboratorio<sup>56</sup>.

Los parámetros definidos por el Documento SANTE/11312/2021 son la linealidad, el efecto matriz, límites de cuantificación (LOQ), selectividad, especificidad, veracidad,

precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y robustez, así como parámetros de identificación de analito, como el tiempo de retención y la relación de iones (ion ratio, IR).

A continuación, se definen los parámetros de validación de metodologías mencionados.

Exactitud: Es definida como el grado de concordancia entre el resultado analítico obtenido y el valor de referencia aceptado. Se mide a través de materiales de referencia certificados o participación en ejercicios de intercomparación.

Veracidad: Se define como la concordancia entre el valor promedio esperado (recuperación media) y el valor de referencia aceptado (valor verdadero). La medida de la veracidad normalmente se expresa como "sesgo". Lo medimos como el porcentaje de recuperación.

Recuperación: La proporción de analito que queda al final de la determinación luego de la adición de estándares a una muestra en blanco (muestra que se conoce no contiene niveles detectables de los analitos) previo a la extracción.

El proceso de adición de estándares a una muestra blanco es también denominado fortificación, donde se adiciona a una matriz blanco, concentraciones conocidas del analito o analitos de interés, en por lo menos dos niveles de concentración, el límite de reporte y un nivel más alto.

Las recuperaciones medias de la validación inicial deben estar dentro del rango 70-120%. Para verificaciones continuas de la conformidad del método analítico, se puede utilizar, para recuperaciones individuales, el rango de 60-140%.

Precisión: Hace referencia al grado de concordancia de los resultados analíticos obtenidos mediante pruebas independientes en las condiciones establecidas. Se evalúa a partir de la repetitividad y reproducibilidad.

Repetitividad: La precisión (desviación estándar) de la medición de un analito, generalmente obtenido de la recuperación o análisis de materiales de referencia, obtenidos utilizando el mismo método en la misma muestra en un solo laboratorio durante un período corto de tiempo durante el cual no existen las diferencias entre los materiales, equipos empleados y/o analistas involucrados. Un método analítico cuantitativo debe ser capaz de proporcionar valores con una repetitividad asociada

RSDr ≤ 20%, para todos los analitos dentro del alcance del método. Manteniéndose el criterio para verificaciones continuas de la conformidad del método analítico.

Reproducibilidad: La precisión (desviación estándar) de la medición de un analito, normalmente mediante recuperación o análisis de materiales de referencia, obtenidos empleando el mismo método en varios laboratorios, por diferentes analistas, o durante un período en el cual pueden existir diferencias en los materiales y equipos utilizados.

Robustez: Es la capacidad de método analítico de permanecer inalterado frente a pequeñas variaciones en los parámetros operacionales del método.

Límite de cuantificación (LOQ): El más bajo nivel de concentración o masa del analito que ha sido validado con una precisión y veracidad aceptable mediante la aplicación de la método analítico completo y criterios de identificación.

Selectividad: Se refiere a la capacidad de la extracción, limpieza, derivatización, el sistema de separación y especialmente el detector para discriminar entre el analito y otros compuestos.

Especificidad: La capacidad del detector para proporcionar señales que identifiquen efectivamente el analito.

Linealidad: La capacidad del método de proporcionar resultados experimentales, dentro de un rango determinado, proporcionales a la concentración del analito.

Efecto matriz: Se refiere al efecto atribuido a uno o más compuestos que pueden extraerse de la muestra junto con el analito, pudiendo generar un aumento o disminución de la respuesta del detector en comparación con la producida por soluciones en solvente del analito. La presencia o ausencia de tales efectos puede demostrarse por la diferencia de respuesta del estándar en extracto de matriz y estándar en solvente. El efecto matriz para un determinado analito se evalúa mediante la comparación de la curva de calibración en matriz (matrix-matched) con la pendiente de la curva de calibración en solvente, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto Matriz (\%)} = \left[ \left( \frac{\text{pendient en curva matrix matched}}{\text{pendiente de la curva en solvente}} \right) - 1 \right] \times 100$$

**Ecuación 1 - Determinación del efecto matriz en porcentaje**

Frente a métodos en los que se observe efecto matriz para una determinada combinación matriz/analito, la cuantificación debe realizarse mediante curvas de calibración en matriz o patrones isotópicamente marcados.

### **1.9.2 Criterios para la identificación y confirmación del analito**

Para identificar y confirmar los analitos evaluados, las guías SANTE para la identificación de micotoxinas 12089/2016 estipula los requisitos necesarios desde el punto de vista cromatográfico y de espectrometría de masas <sup>57</sup>.

#### **1.9.2.1 Requisitos para la cromatografía**

El tiempo de retención (tR) del analito en el extracto debe coincidir con el del estándar, ya sea empleando curva de calibración en solvente o matriz, tenga una tolerancia de  $\pm 0.2$  minutos.

#### **1.9.2.2 Requisitos para espectrometría de masas (MS)**

Para la detección por espectrometría de masas, se requiere la correcta selección de transiciones específicas para el analito, debiendo incluir, de ser posible, el ion molecular, o aductos de este, para la medición e identificación. La identificación se debe basar en los picos cromatográficos para dos o más transiciones específicas de analito. En general, los iones de  $m/z$  mayores a 100 son más selectivos para identificación.

Los picos deben tener similar forma de pico, superponerse uno con otro, y debe mantenerse la relación de abundancia con respecto al estándar empleado. Las intensidades relativas de iones o ion ratio (IR), definido como la respuesta del pico con menos área, dividida por la respuesta del pico de mayor área, debe estar dentro del  $\pm 30\%$  relativo, al promedio obtenido para los estándares de la misma corrida.

Estos criterios pueden a su vez ajustarse de acuerdo con los distintos modos de detección de espectrometría de masas, ya que de ellos depende el grado de selectividad y especificidad, y con ello, la confianza en la identificación.

## **1.10 Proyecto INNOVAGRO**

En el marco del Proyecto Innovagro Inocuidad FSA\_I\_2017\_1\_139442 se planteó el estudio de la FE en varios aspectos, como ser la incidencia de las diferentes especies y quimiotipos causales de la enfermedad en nuestro país, la sensibilidad de los aislamientos obtenidos a fungicidas comerciales registrados para su uso en trigo,

y la interacción de las cepas de hongo con diferentes cultivares de trigo con reacción diferencial a FE. Además, se planteó evaluar el nivel de residuos de fungicidas y contenido de micotoxinas en los distintos ensayos realizados.

En base a esto, se planteó este trabajo de tesis en el cual se desarrollaron estrategias analíticas para el estudio de las micotoxinas asociadas a FE, empleando HPLC-MS/MS, enfocando la búsqueda de micotoxinas a los Tricotecenos tipo B (DON, 15ADON, 3ADON, NIV) y ZEA, dado su prevalencia en este tipo de cultivo.

### **1.11 Hipótesis**

Se podrá desarrollar un método analítico multiresiduo adecuado para la evaluación del perfil de micotoxinas asociadas a la Fusariosis de la Espiga, en los cultivos de trigo nacional.

## **2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

El objetivo de esta tesis es aplicar estrategias analíticas al estudio de las micotoxinas asociadas a Fusariosis de la Espiga en el trigo cultivado en el país.

### **2.1 Objetivo general**

Desarrollar y validar una estrategia analítica para la detección y cuantificación de micotoxinas asociadas a Fusariosis de la Espiga en trigo, y su aplicación para la caracterización de muestras asociadas al proyecto Innovagro, utilizando como principal herramienta la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem.

### **2.2 Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de esta propuesta son:

1. Desarrollar un método analítico para la detección de micotoxinas en granos de trigo y determinar las cifras de mérito de la metodología optimizada.
2. Caracterizar las micotoxinas derivadas de la población de *Fusarium* circulante en el país en la zafra 2018.
3. Caracterizar las interacciones entre cepas del CEFG y diferentes genotipos de trigo en cuanto a la producción de micotoxinas en ensayos controlados.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Equipos**

##### ***3.1.1 Sistema instrumental analítico***

Se emplearon dos equipos en distintos estadios del proyecto de tesis. En primera instancia el análisis cromatográfico fue realizado en un equipo HPLC (Agilent Technologies 1200 series, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (ABSciex API3200), con fuente de ionización por electrospray (ESI), en modo negativo. Posteriormente, se continuó en un HPLC (Agilent Technologies 1200 series, EE. UU.) acoplado a un híbrido, triple cuadrupolo trampa lineal (4000 QTRAP LC-MS/MS, SCIEX Instruments, Foster City, CA) operando en modo ESI, tanto negativo como positivo (Imagen 1). Los cromatogramas se adquirieron en el Analyst software v 1.7 (SCIEX).

##### ***3.1.2 Otros equipos***

Para la molienda de granos de trigo se empleó una licuadora Osterizer de 3 velocidades, modelo 4126 (Sunbeam Products, Inc, EE. UU.). Otros equipos empleados fueron: balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204-S/FACT (Mettler Toledo, EE. UU.), baño de ultrasonido Daihan modelo WUC-A02H (Daihan Scientific Co., Seul, Corea), agitador orbital shaker Labotecgrup modelo HZ-82 (Labotecgrup, China), vortex Wise Mix modelo VM-10 (Wisd Laboratory Equipment, Alemania), rotador multitubo Barnstead modelo 4632-1 (Barnstead International, EE. UU.).

Se utilizó agua ultrapura (18,2 MΩ cm) para la extracción de las muestras y fases móviles, obtenida de un sistema de agua ultra pura Arium Mini (Sartorius, Alemania) y un sistema de agua ultra pura Direct-Q3 de Millipore (Billerica, MA).



*Imagen 1 - HPLC (Agilent Technologies 1200 series) acoplado a un híbrido, triple cuadrupolo con trampa lineal (4000 QTRAP LC-MS/MS)*

### **3.2 Materiales y reactivos**

Los estándares de DON, 15ADON, 3ADON, NIV y ZEA, con pureza de 99,47%, 99,0%, 99,69%, 99,35% y 99,88% respectivamente, fueron adquiridos en Fermentek Ltd (Israel).

Acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) grado HPLC fueron comprados en J.T. Baker (México), el ácido fórmico y ácido acético (HAc) glacial de grado analítico fueron adquiridos en Merck (Alemania). El formiato de amonio fue adquirido de Sigma Aldrich (EE. UU). Sulfato de magnesio anhidro ( $MgSO_4$ ) y citrato de sodio dihidrato ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) provienen de Carlos Erba Reagents S.A.S (Alemania), el cloruro de sodio (NaCl) de grado biotecnológico fue comprado de Amresco (EE. UU.), y el citrato de sodio sesquihidrato ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ ) fue obtenido de Scharlab (España).

Se utilizó nitrógeno industrial de Linde (Uruguay). Todas las muestras para inyectar en el HPLC-MS/MS fueron filtrados por un filtro de 0,22  $\mu m$  de 13 mm de diámetro, de material fluoruro de polivinilideno (PVDF) obtenidos de Waters (EE. UU.).

### **3.3 Preparación de estándares**

Los estándares de las micotoxinas a evaluar fueron reconstituidos con MeOH hasta una concentración de 5000 mg/L para DON, 15ADON, 3ADON y NIV, y concentración de 10000 mg/L para ZEA, fraccionadas y conservadas a  $-20^\circ C$ . Se prepararon

soluciones intermedias de trabajo de 10 mg/L y 1 mg/L a partir de las soluciones madre, empleando MeOH como solvente.

### **3.4 Muestras de Trigo**

Las muestras de trigo obtenidas en el marco del proyecto Innovagro fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología de INIA La Estanzuela.

#### **3.4.1 Muestras de trigo zafra 2018**

Se recibieron muestras de 200 g de granos de trigo correspondientes a 71 muestreos de diferentes cultivares, colectados de campo, durante la zafra de 2018, en colaboración con cooperativas agrícolas y compañías situadas en siete localidades diferentes del área productora del país.

Estas 71 muestras se distribuyen entre los departamentos de Soriano (28), Florida (15), San José (9), Río Negro (8), Colonia (5), Paysandú (4) y Florida (2).

Las muestras pertenecen a varios cultivares de trigo con diferentes características, siendo el principal el Algarrobo (28), seguido por G 2375 (11), G 6.28 (11), Curupay (9), Bag 11 (4), SYN 200 (3), G 2366, G 6.38, K. Nutria cada uno con 2 muestras. Por último, se obtuvo una única muestra de los cultivares G 2433, G 6.81, G 6.87, G 6.88, Nogal, SYN 211 y SYN 300.

#### **3.4.2 Muestras de trigo provenientes de ensayos de manejo de FE**

Se recibieron muestras de 200 g de granos de trigo correspondientes a ensayos dirigidos, realizados en Colonia en los años 2018 y 2019 en INIA La Estanzuela como parte de la tesis de posgrado de Leydi Sevillano. Estos ensayos fueron realizados para evaluar el efecto de distintas formas de manejo de la FE (resistencia del cultivar, aplicación de fungicidas y momento de aplicación de estos), en el nivel de micotoxinas (correspondiente a esta tesis) y residuos de fungicidas (tesis de L. Sevillano).

El trigo fue sembrado en parcelas de 4x1 m, para cada tratamiento a evaluar, incluyendo muestras testigo. Para la inoculación de las espiguillas de trigo se preparó una mezcla de aislados monospóricos de *F. graminearum sensu stricto*, potencialmente productores de 15ADON. Estos aislados habían sido identificados y corroborados molecularmente por la Cátedra de Microbiología de Facultad de Química, seleccionándose 12 especies, que según pruebas de agresividad realizadas en INIA, algunos de los aislados eran muy agresivos.

Dos cultivares de trigo, uno susceptible (INIA Don Alberto o IDA) y otro moderadamente resistente (Génesis 6.87 o 2387), fueron inoculados en las espiguillas centrales de la espiga. Los tratamientos antifúngicos consistieron en mezclas de fungicidas, SWING PLUS (metconazol + epoxiconazol) y PROSARO (protioconazol + tebuconazol), considerados de alta eficiencia para el control de la FE. Las dosis recomendadas para trigo son: 1,5 L/ha de SWING PLUS (metconazol + epoxiconazol) y de 0,75 L/ha para PROSARO (protioconazol + tebuconazol). Dichos fungicidas, fueron aplicados en tres momentos, inicio de la floración (antesis), mitad de antesis y llenado de grano (3/4 de grano acuoso). Estos corresponden al momento de aplicación Z61, Z65 y Z71 respectivamente según escala de Zadoks.

Los ensayos fueron realizados en distintas temporadas del año. El ensayo Colonia 1 2018 fue caracterizado como temporada de baja enfermedad, mientras que los ensayos Colonia 1 y 2 2019 fueron caracterizados como temporadas de alta y moderada enfermedad respectivamente. La determinación de nivel de enfermedad se realizó mediante el índice de fusariosis de la espiga (IFE), el área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (siglas en inglés, AUDPC) y por el porcentaje peso/peso de granos con síntomas en muestra de 25g, según la comisión canadiense (Fusarium Damaged Kernel o FDK%).

Procedencia	Número de muestras
Colonia 1 2018	31
Colonia 1 2019	56
Colonia 2 2019	28
Zafra 2018	71

**Tabla 6** - Número y procedencia de las muestras analizadas en la investigación.

### 3.4.3 Conservación de las muestras

Previa homogeneización, los granos de trigo se molieron en una licuadora Osterizer, durante 45 segundos a la velocidad más alta, hasta obtener un tamaño de partícula similar a la harina. Se trasvasó a doble bolsa de nylon con cierre hermético rotulada con identificación de la muestra y conservadas a -20°C, hasta su análisis.

## 3.5 Métodos analíticos evaluados

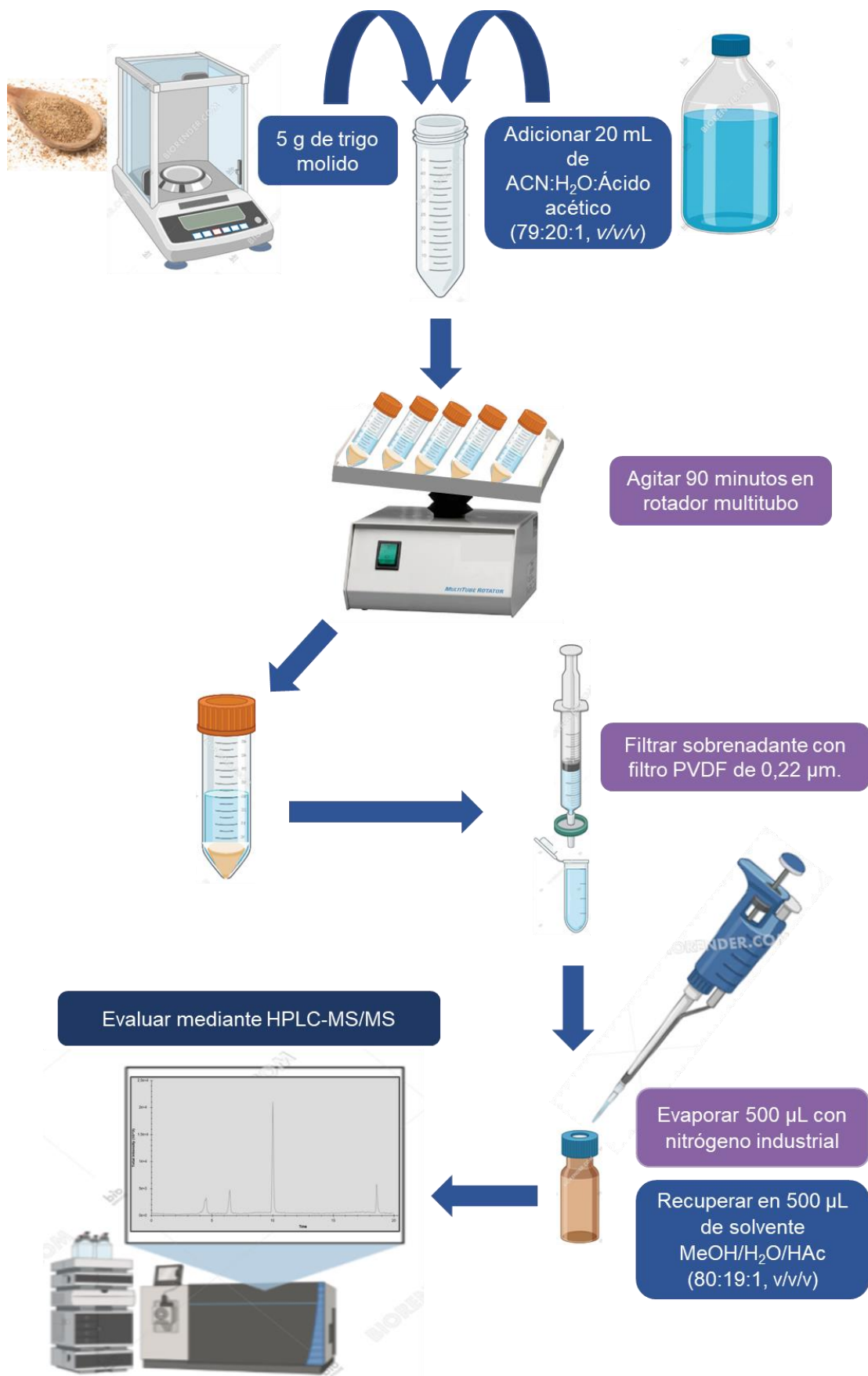
### 3.5.1 Método 1

El desarrollo del método 1 está basado en el método propuesto por Michael Sulyok y colaboradores <sup>69</sup>, posteriormente optimizado y validado para 295 metabolitos provenientes de hongos y bacterias por Malachová y colaboradores en el año 2014 <sup>67</sup>. Consiste en un método HPLC-MS/MS tipo “dilute and shoot”, multi-analito, en cuatro tipos de matrices de distinta complejidad: puré de manzana (alto contenido de agua), avellanas (alto contenido de grasas), maíz (representando cereales y matrices con alto contenido de almidón) y pimiento verde (materias primas con matriz compleja). El método fue adaptado a la matriz seleccionada para este estudio, a los analitos de interés y la disponibilidad de equipamientos en el laboratorio. En la figura 9 se presenta un esquema de trabajo correspondiente al método 1, describiendo los pasos del trabajo de laboratorio.

#### 3.5.1.1 Extracción

A 5 g de muestra contenidos en un tubo de polipropileno de 50 mL, se añadieron 20 mL de solvente de extracción (ACN/H<sub>2</sub>O/HAc, 79:20:1, v/v/v). Se agitó durante 90 minutos empleando un rotador multitubo. Se decantó por gravedad durante 15 minutos. Un volumen de 2 mL de los extractos es filtrado empleando un filtro de PVDF de 0,22 µm. De este último se transfirieron 500 µL con pipeta automática a viales de HPLC y se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno industrial suave y constante. Se reconstituyó en igual volumen con MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (80:19:1, v/v/v) empleando un agitador vortex por 2 minutos. El extracto se inyectó en el cromatógrafo sin otro tratamiento adicional.

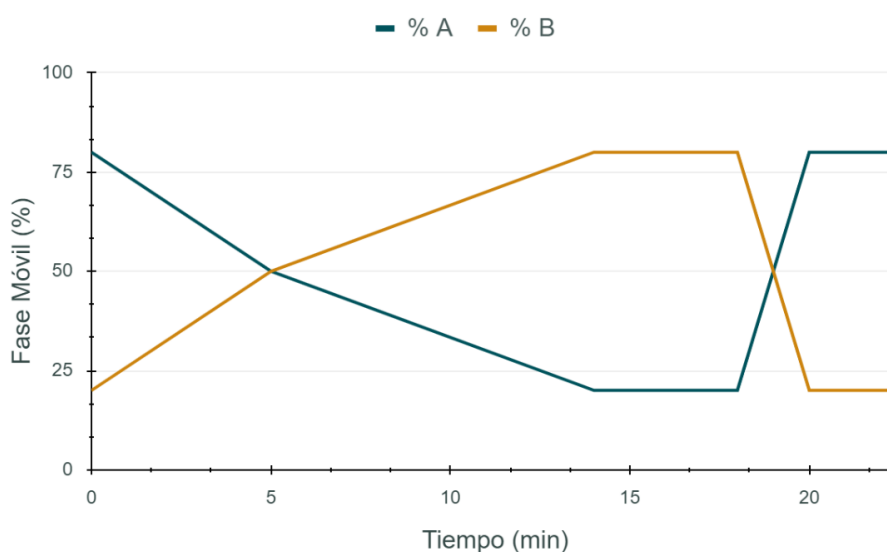
En la figura 9 se muestra el esquema de trabajo para el método 1.



**Figura 9 - Esquema de trabajo de método 1.**

### 3.5.1.2 Condiciones cromatográficas

Para la separación cromatográfica se empleó una columna C18 de fase reversa (100 mm x 4,6 mm x 3,0  $\mu$ m, Phenomenex, EE. UU.), en un equipo HPLC Agilent serie 1200 acoplado a un detector ABSciex API3200. El método cromatográfico está basado en reporte de Malachová y colaboradores <sup>67</sup>. Las fases móviles son: fase A, MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (10:89:1, v/v/v); fase B MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (97:2:1, v/v/v). Se empleó un gradiente de elución de las fases móviles a un flujo de 600  $\mu$ L/min, por un tiempo de corrida de 22,5 minutos, siguiendo el esquema de elución presentado en la Figura 10. La temperatura del horno fue de 20  $\pm$  0,2 °C y el volumen de inyección de 10  $\mu$ L.



**Figura 10** - Gradiente de elución del método 1.

### 3.5.1.3 Condiciones de analizador de masas

Se empleó el modo de Monitoreo de Reacciones Múltiples, o por su nombre en inglés Multiple Reaction Monitoring (MRM), en polaridad negativa para la detección de las transiciones correspondientes a las distintas micotoxinas. La configuración de la fuente de ESI fue la siguiente: Gas Cortina 18 psi, Gas de Colisión 4, Voltaje de Electrospray - 4500 V, Temperatura 450°C, Gas Fuente de Iones 1, 35 psi, Gas Fuente de Iones 2, 50 psi.

### 3.5.1.4 Control de Calidad método 1

Como control de calidad se empleó una muestra blanco fortificada con estándares de las cinco micotoxinas a una concentración de 4 mg/kg (1000  $\mu$ g/L en extracto), para

evaluar cambios de intensidad de la señal en el tiempo. El mismo fue inyectado cada 10 determinaciones.

#### **3.5.1.5 Miniaturización del método 1**

Para la validación, se realizó una miniaturización del método, empleando 1 g de muestra en un volumen de 4 mL de solvente de extracción, siguiendo el ejemplo proporcionado por el método del artículo de referencia <sup>67</sup>.

#### **3.5.1.6 Validación método 1**

La validación del método fue realizada siguiendo el protocolo de validación generado por el laboratorio de Química Bioanalítica, y posteriormente según la norma DG SANTE, Documento No. SANTE 12682/2019 <sup>70</sup>, evaluándose los parámetros descritos a continuación.

Veracidad: La veracidad fue evaluada mediante la adición de cantidades conocidas de mezcla de estándares a muestra blanco, en tres niveles de concentración, cada uno por triplicado; 2, 4 y 6 mg/kg correspondiente a 500, 1000 y 1500 µg/mL en extracto.

Se procedió a la fortificación de muestras blanco, mediante la adición a la misma de una mezcla de estándares de las cinco micotoxinas, dejando evaporar el solvente durante toda la noche, siguiendo los lineamientos del método de referencia <sup>67</sup>. Luego se procedió a la extracción de las muestras y evaluación del extracto, para determinar el porcentaje de recuperación.

Precisión instrumental: Mediante la inyección del punto medio de la curva de calibración en matriz, por quintuplicado y calculando su RSD% se evaluó la precisión instrumental.

Repetitividad: Para la precisión del método se realizaron 5 extracciones independientes de una muestra blanco adicionada con una concentración de 4 mg/kg (1000 µg/L en extracto) de mezcla de estándares. Se calculó el RSD% de la respuesta obtenida en el instrumento (áreas).

Linealidad: La linealidad fue evaluada mediante 3 curvas de calibración independientes en solvente, así como por curvas de calibración en matriz en el rango de 100 a 2000 µg/L. Para la curva en matriz, se extrajo una muestra blanco con el método desarrollado y al extracto obtenido se le agregó un volumen definido de

extracto de matriz de diferentes concentraciones de las soluciones de estándares en solvente.

**Efecto matriz:** De la relación entre las pendientes de las curvas de calibración en solvente y matriz, se calculó el porcentaje de efecto matriz, según la Ecuación 1 (ver la sección 1.9.1).

**LOQ:** De acuerdo con la guía SANTE, se establecen como la menor concentración en la cual se observa una precisión con  $RSD \leq 20\%$  y una recuperación entre 70 y 120%. Este ensayo no pudo ser realizado para este método por un inconveniente en el instrumento utilizado, comenzado entonces una colaboración con DQL usando el 4000 QTRAP para el desarrollo del método 2.

### **3.5.2 Método 2**

Realizado en colaboración con el DQL, Cenur Litoral Norte en Paysandú. El método<sup>13</sup> había sido evaluado previamente para el análisis de fungicidas, ZEA y DON, extendiéndose en este trabajo de tesis para los otros 3 compuestos de interés; NIV, 3ADON y 15ADON. Una vez optimizados los compuestos se procedió a la evaluación del desempeño de dicha metodología y posteriormente a su validación.

#### **3.5.2.1 Extracción**

Consiste en un método de QuEChERS citrato modificado<sup>13</sup>. A 2 g de trigo molido se le adicionaron 10 mL de una solución de extracción conteniendo ACN/H<sub>2</sub>O/ácido fórmico (80/19/1, v/v/v). Se agitó manualmente por 1 minuto. Se añadieron las sales MgSO<sub>4</sub> anhidro (3,6 g), NaCl (0,9 g), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,9 g) y C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·1.5H<sub>2</sub>O (0,45 g), agitándose manualmente por 3 minutos. A continuación, se agitó mediante shaker orbital horizontal a 250 r.p.m por 15 minutos, dejando reposar por 20 minutos en posición vertical. Un volumen de 2 mL del sobrenadante fue filtrado empleando un filtro de PVDF de 0,22 µm. Se realizó una toma de 500 µL para evaporación a sequedad con nitrógeno industrial a un flujo constante, que se recuperó en 200 µL de solución de MeOH/0,1% ácido fórmico en H<sub>2</sub>O (80:20, v/v).

Para muestras que presentaron un alto contenido de DON, se repitió el análisis realizando una dilución del extracto de 1000 veces. Para ello, se evaporaron 50 µL de extracto de la muestra y se recuperaron en 1000 µL de solución de MeOH/0,1% ácido fórmico en H<sub>2</sub>O (80:20, v/v). En la figura 11 se presenta un esquema de trabajo correspondiente al método 2, describiendo los pasos del trabajo de laboratorio.

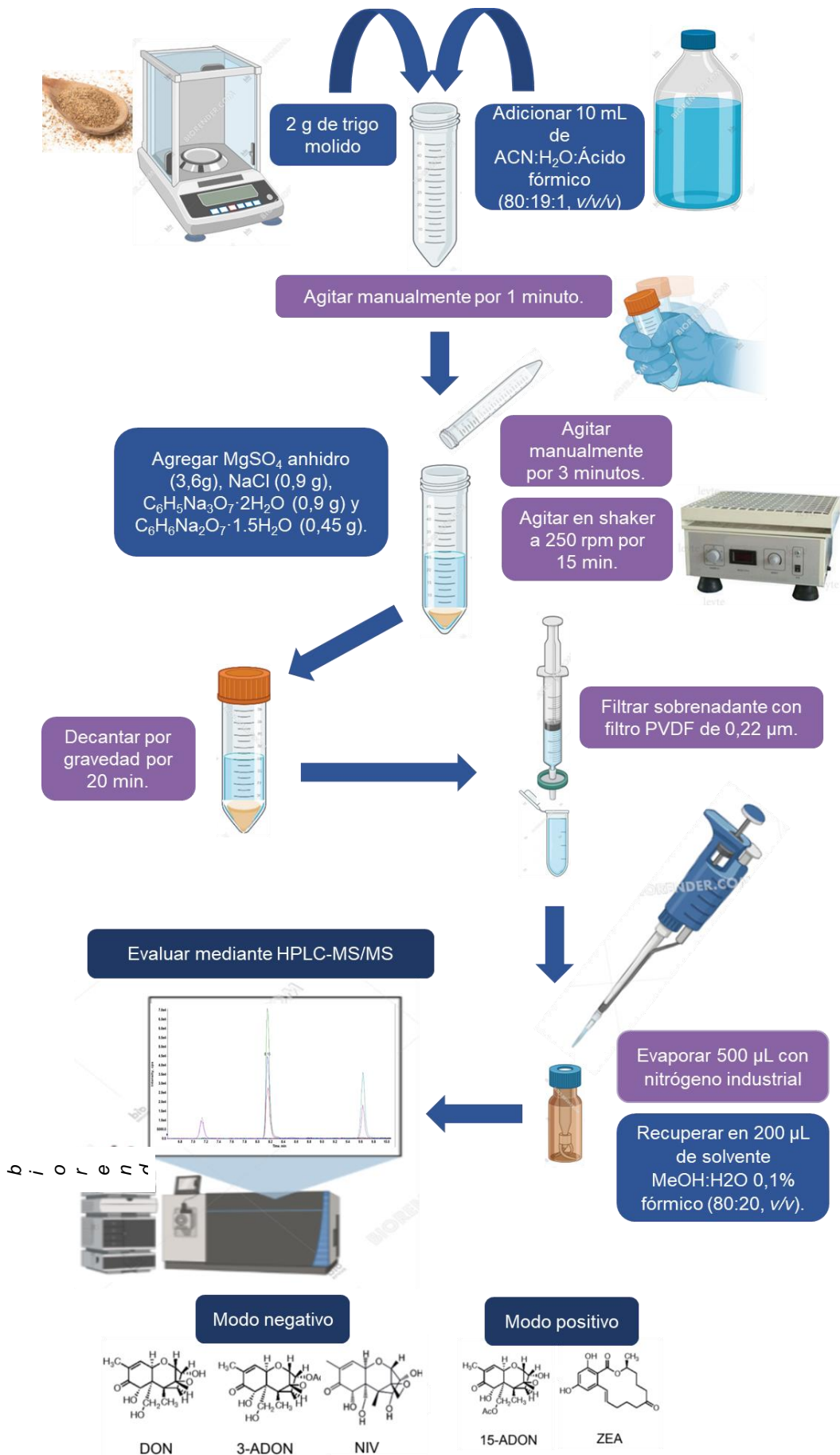


Figura 11 - Esquema de trabajo del método 2.

### 3.5.2.2 Condiciones cromatográficas

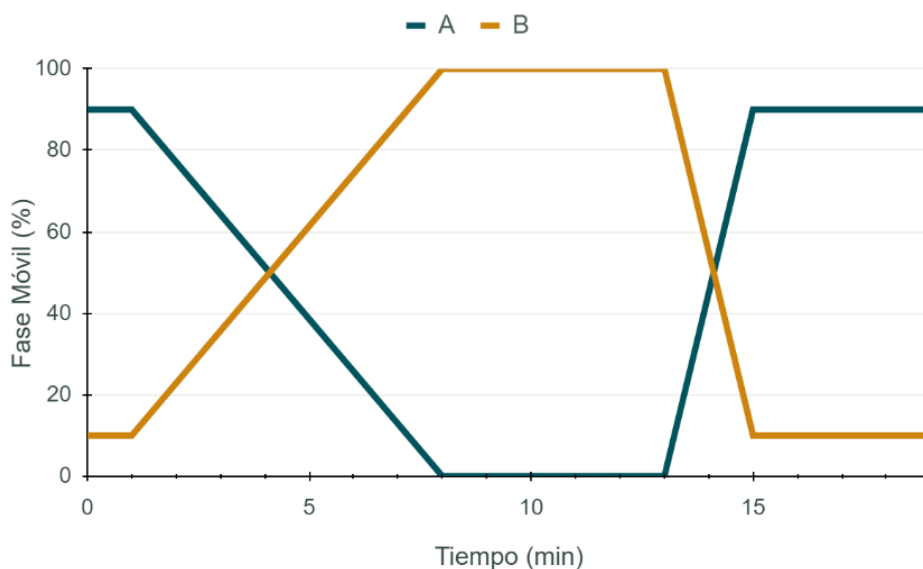
La separación cromatográfica se realizó en una columna C-18 de fase reversa (Agilent Eclipse XDB-C18 de 150 × 4,6 mm y 3,5 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), usando un gradiente de elución de fases móviles. Se empleó un sistema 4000 QTRAP LC-MS/MS para la determinación de las cinco micotoxinas mediante dos métodos; en modo positivo se evaluaron ZEA y 15ADON, en modo negativo se evaluaron DON, NIV y 3ADON.

#### Modo positivo: ZEA y 15 ADON

Fase móvil A, H<sub>2</sub>O/MeOH (98:2 v/v) con 5 mM formiato de amonio, 0,1% ácido fórmico, Fase móvil B MeOH/H<sub>2</sub>O (98:2 v/v) con 5 mM formiato de amonio, 0,1% ácido fórmico. Se realizó un gradiente de elución de fases móviles según la Figura 12, con un flujo de 600 µL/min por 19 minutos. El volumen de inyección fue 5 µL y la temperatura de la columna 20 °C.

#### Modo negativo: DON, NIV, 3ADON

Fase móvil A, agua con 5 mM acetato de amonio, 0,1% ácido acético, Fase Móvil B, MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5 v/v) con 5 mM acetato de amonio, 0,1% ácido acético. El gradiente de fases móviles fue igual al modo en positivo (Figura 12), con un flujo de 600 µL/min por 19 minutos. El volumen de inyección fue 5 µL y la temperatura de la columna 20 °C.



**Figura 12** - Gradiente de elución para el método 2.

### **3.5.2.3 Condiciones de analizador de masas**

#### *Modo positivo: ZEA y 15 ADON*

La configuración de la fuente ESI fue la siguiente: Gas cortina 20 psi, Fuente de Ion Spray 5500 V, Temperatura 500°C, Gas Fuente Iones 1 50 psi, Gas Fuente Iones 2 50 psi, ihe ON.

#### *Modo negativo: DON, NIV, 3ADON*

La configuración de la fuente ESI es la siguiente: Gas cortina 20 psi, Fuente de Ion Spray - 4500 V, Temperatura 500°C, Gas Fuente Iones 1 50 psi, Gas Fuente Iones 2 50 psi, ihe ON.

### **3.5.2.4 Control de calidad**

Junto con las muestras se procesaron bajo las mismas condiciones y el procedimiento analítico desarrollado, un blanco de muestra, un blanco de reactivo, muestras blanco fortificadas con concentración de 100 µg/kg para NIV, ZEA, 15ADON, 3ADON y 2500 µg/kg para DON, por triplicado.

### **3.5.2.5 Validación método 2**

Para la validación del método, se siguieron los criterios de acuerdo con las guías de la Unión Europea para la identificación de micotoxinas, la norma SANTE No. 12089/2016 <sup>57</sup>, así como el Documento No. SANTE/11312/2021 para la validación de métodos analíticos <sup>56</sup>. Se evaluaron veracidad (% recuperación), precisión (reproducibilidad intermedia y repetitividad), límite de cuantificación, linealidad y efecto matriz.

Para evaluar veracidad, LOQ y precisión intermedia, se realizaron fortificaciones en varios niveles de concentración. Se evaluaron tres niveles de concentración para NIV, 15ADON y 3ADON (35, 50 y 100 µg/kg) y dos niveles para DON y ZEA (100 y 250 µg/kg). Posteriormente se evaluó DON a 2500 µg/kg.

Identificación y confirmación: Para detectores de MS/MS de tipo triple cuadrupolo, trampa de iones, Q-trap, Q-TOF y Q-Orbitrap, se requiere para la identificación, ya sea mediante modo de adquisición de monitoreo de reacciones seleccionadas

(selected reaction monitoring o SRM) o monitoreo de reacciones múltiples (multiple reaction monitoring o MRM), un número mínimo de 2 o más iones productos, con una relación señal/ruido mayor a 3. Los picos de los iones de los analitos deben solaparse completamente, con un ion ratio dentro del  $\pm 30\%$  relativo al promedio de los estándares de calibración de la misma corrida.

El ion ratio (IR), calculado como la relación entre las áreas de las transiciones, se determina según la fórmula presentada a continuación.

$$\text{Relación de áreas (IR)} = \frac{\text{área de transición de confirmación}}{\text{área de transición de cuantificación}} < 1$$

***Ecuación 2 - Cálculo de la relación de áreas de iones productos para la identificación de analitos mediante MS/MS.***

El tiempo de retención entre los analitos y los estándares de calibración medidos en la misma secuencia, podrán tener una tolerancia de  $\pm 0,2$  minutos.

Recuperación: La veracidad del método se evaluó mediante la fortificación de 5 réplicas de la masa de muestra blanco optimizada, a niveles de concentración conocidos de estándares (35, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para 15ADON, 3ADON y NIV, y 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para ZEA y DON). Estas muestras fueron posteriormente analizadas mediante el método de extracción y HPLC-MS/MS propuesto. El valor de recuperación fue calculado como el porcentaje de la relación entre la concentración experimental determinada y la concentración teórica esperada.

El porcentaje de recuperación fue calculado tomando como 100% la concentración de micotoxina esperada en vial (valor esperado), contra el valor de concentración obtenido de la interpolación del área del pico del analito problema en la curva de calibración.

Muestra blanca: La misma consiste en una muestra o porción de extracto que se sabe no que tiene niveles detectables de los analitos de interés. En este caso, la muestra blanco empleada contenía cantidades de DON muy por debajo del límite de cuantificación.

Fortificación: Se basa en la adición de un volumen de solución estándar a las concentraciones seleccionadas, conteniendo las cinco micotoxinas de interés, a los 2

gramos de muestra blanco. Luego de homogeneización por vortex, se esperaron 15-20 minutos antes de proceder con la extracción de las muestras.

**Repetitividad:** Para la evaluación de la repetitividad del método, se fortificaron 5 réplicas para cada uno de los niveles seleccionados a evaluar. A partir de las áreas obtenidas, se calculó el %RSD.

La repetitividad del instrumento se determinó mediante la inyección por quintuplicado de una solución de la curva de calibración en solvente de concentración 125 µg/L, calculándose el %RSD a partir de las áreas obtenidas.

A partir del promedio y la desviación estándar de las recuperaciones se calcula el %RSD según la ecuación siguiente:

$$\%RSD = \frac{\text{desviación estándar de las recuperaciones}}{\text{promedio de las recuperaciones}} \times 100$$

### **Ecuación 3 - Cálculo de la desviación estándar relativa en porcentaje**

**Reproducibilidad:** La reproducibilidad del método se evaluó a partir del análisis realizado por otro operador, siguiéndose el procedimiento previamente indicando, calculándose el %RSD asociado.

**Linealidad:** Se realizaron curvas de calibración tanto en solvente como en extracto de matriz. Para la curva en solvente se empleó MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) con 0,1% fórmico, evaluándose en el rango de 20 a 500 µg/L para NIV, ZEA, 15 ADON y 3ADON con seis puntos de curva, y de 20 a 2500 µg/L para DON, con ocho puntos de curva.

Para la curva en matriz (matrix-matched), se preparan las mismas concentraciones que en solvente, empleando un volumen fijo de extracto de matriz blanco y estándares en solvente. Se realiza este procedimiento para cada uno de los puntos de la curva de calibración.

A partir del área de los picos obtenidos mediante MS/MS de la transición de cuantificación, se grafica área vs concentración empleando Office Excel®. Se obtienen comportamientos lineales del tipo (y= ax + b), obteniéndose a su vez el coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>).

La desviación de las concentraciones retro calculadas de los estándares de calibración o por sus siglas en inglés BCC (back calculated concentration), se

calcularon mediante la ecuación presentada a continuación, partir de la curva de calibración matrix matched en la región relevante. El valor del BCC no debe superar el  $\pm 20\%$ .

$$BCC(\%) = \frac{\text{concentración medida} - \text{concentración verdadera}}{\text{concentración verdadera}} \times 100$$

**Ecuación 4** - Cálculo de las concentraciones retro calculadas (back calculated concentration) en porcentaje.

LOQ: Se tomó como LOQ a la menor concentración de fortificación, en la cual se obtiene una recuperación entre 70 y 120%, con un  $\%RSD \leq 20$ , de acuerdo con la definición de SANTE/11312/2021.

Efecto matriz: Se evaluó el efecto matriz mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración en solvente y matriz, para cada analito, de acuerdo con la Ecuación 1.

### **3.5.3 Comparativa del método 2 con ELISA AgraQuant DON**

De las muestras correspondientes al ensayo Colonia 1 2019, se seleccionaron 20 muestras para una comparación entre los resultados obtenidos por el método HPLC-MS/MS y resultados obtenidos mediante el kit de ELISA AgraQuant DON test <sup>71</sup>.

El AgraQuant DON test emplea una técnica de ELISA cuantitativa para la detección de DON. El rango de cuantificación es de 250 a 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con un límite de detección de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Los resultados obtenidos mediante ELISA AgraQuant DON test, fueron realizados como parte del ensayo de INIA y tesis de posgrado de Leydi Sevillano.

Las muestras seleccionadas fueron aquellas cuya concentración determinada por el ELISA estaban dentro del rango de cuantificación de la técnica.

## **3.6 Tratamiento de datos**

### **3.6.1 Análisis de las muestras**

Una vez determinado el rango lineal, las concentraciones en las muestras fueron calculadas a partir de la interpolación del área obtenida para la transición de

cuantificación, en la curva de calibración correspondiente a cada corrida en donde se inyectó la muestra.

El valor de concentración obtenido corresponde a la concentración en vial. Por lo que, teniendo en cuenta el factor de concentración del método, la concentración obtenida debe afectarse por un factor de 1,6 para las muestras concentradas, y de un factor de 80 para las diluidas, obteniéndose finalmente la concentración en la muestra. Se presenta el procedimiento de los cálculos realizados en el Anexo I.

### ***3.6.2 Tratamiento estadístico***

Para evaluar la relación entre los distintos tipos de cultivar, departamento de siembra y contenido de DON en las muestras de trigo, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA), ejecutada en el programa Office Excel®.

Para la evaluación por cultivar se establecieron cuatro grupos distintos, tomando aquellos con mayor número de muestras; Algarrobo (grupo 1,  $n=20$ ), Curupay (grupo 2,  $n=9$ ), G 2375 (grupo 3,  $n=11$ ) y G 6.28 (grupo 4,  $n=11$ ). Se tomó como hipótesis nula que no existen diferencias significativas entre los cultivares con respecto al contenido de DON, y como hipótesis alternativa, que si hay diferencias significativas.

En cuanto a la evaluación estadística por departamento, se tomaron todos los datos, conformando 7 grupos distintos, uno por cada departamento, planteándose las mismas hipótesis nula y alternativa que para los cultivares.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Métodos

#### 4.1.1 Optimización del Método 1

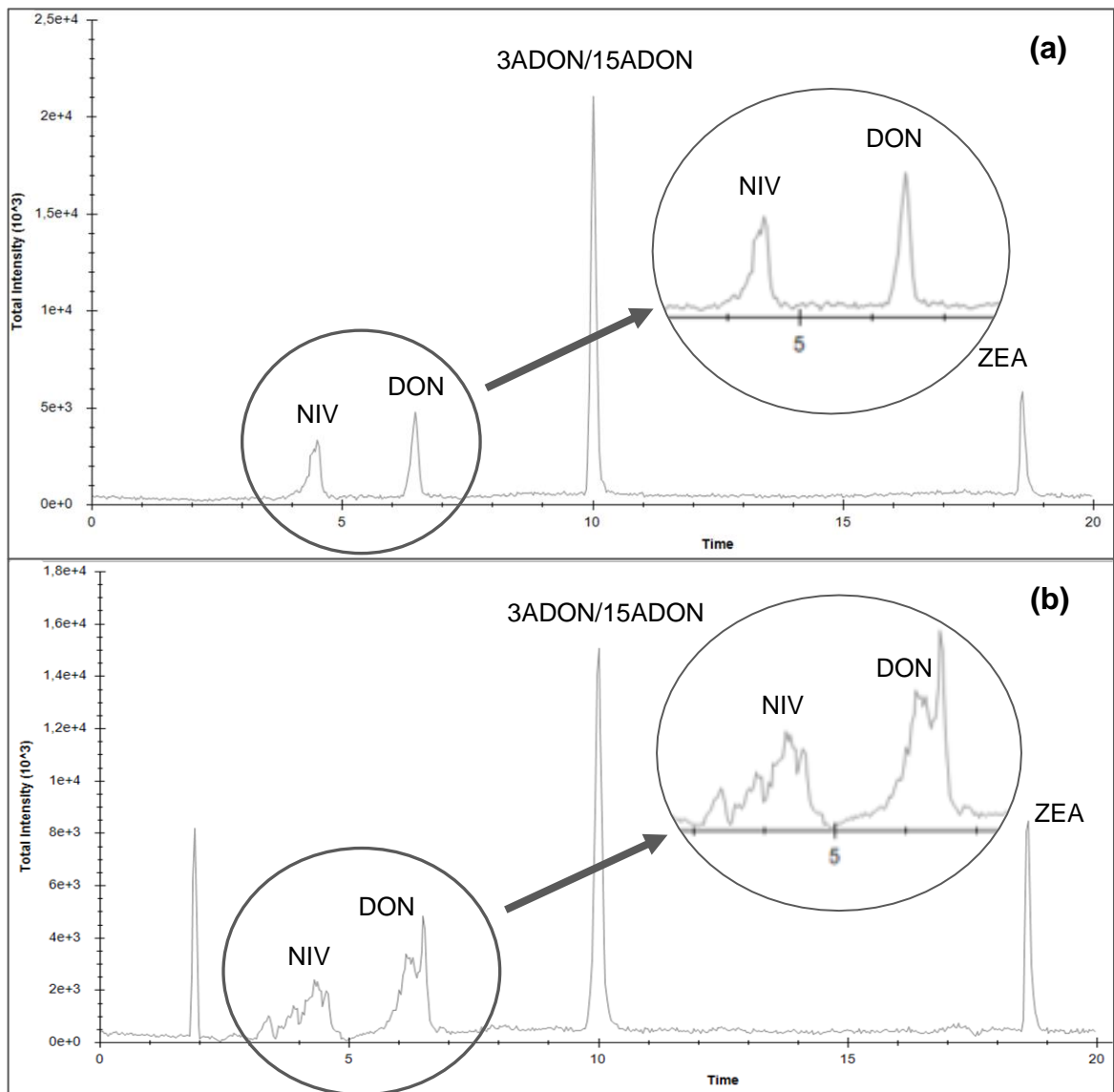
Esta metodología fue seleccionada dada la simplicidad de su proceso de extracción y su aplicación en diversas matrices, en múltiples publicaciones científicas, que permitieron considerarlo un método adecuado <sup>20,72,73</sup>. El mismo fue ajustado a las condiciones de trabajo y los analitos de interés para este estudio.

Las modificaciones realizadas con respecto al método de referencia en el proceso de extracción se debieron a la necesidad de adaptarse a los equipos disponibles en el laboratorio.

##### 4.1.1.1 Método cromatográfico

El método de separación instrumental se evaluó empleando estándares de micotoxinas en MeOH. Dado que es un método multianalito, se adaptó el método original de Malachová y colaboradores <sup>67</sup>, a los analitos de interés. Tomando como base el método cromatográfico descrito por los autores mencionados, se optimizó el flujo a uno adecuado a la columna empleada, de menor tamaño de partícula que la del método de referencia. Se adaptó la temperatura de la columna, el volumen de inyección y el gradiente de la fase móvil para permitir una buena separación de los analitos y una anchura de picos aceptable.

El método cromatográfico fue inicialmente evaluado en un instrumento de tipo trampa de iones (Bruker Esquire 6000), con ionización electrospray (ESI), en modo negativo, acoplado a un HPLC (Agilent Technologies 1200), donde se realizaron las optimizaciones mencionadas. Por avería del espectrómetro de masa, se continuó trabajando en un equipo HPLC (Agilent Technologies 1200 series) acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (ABSciex API3200), en modo ESI, al cual se trasladó el método cromatográfico previamente evaluado. En la figura 13 se pueden observar la corriente total de iones o TIC (por sus siglas en inglés, total ion current), para una mezcla de estándares evaluados a una concentración de 500 µg/L, tanto en solvente como en matriz. Con excepción de 15ADON y 3ADON que co-eluyen, el método cromatográfico permitió la separación de todas las micotoxinas.



**Figura 13** - TIC de mezcla de estándares a una concentración de 500 µg/L vs tiempo (a) en solvente, (b) en matriz.

Durante la evaluación cromatográfica inicial se observó que las formas de los picos de NIV y DON (Figura 13), eran anchos y aserrados, principalmente el NIV, el cuál es el primero en eluir. Esto podría atribuirse a la diferencia de fuerza electrópica del solvente de extracción (ACN) y la fase móvil (MeOH). En cromatografías de fase reversa, el ACN es considerado un eluyente fuerte en comparación con el MeOH, eluyendo los compuestos de forma rápida cuando es empleado en la fase móvil. En este caso, los extractos conteniendo los analitos se encontraban en solución de 79% de ACN mientras que la fase móvil inicial contenía 20% de MeOH.

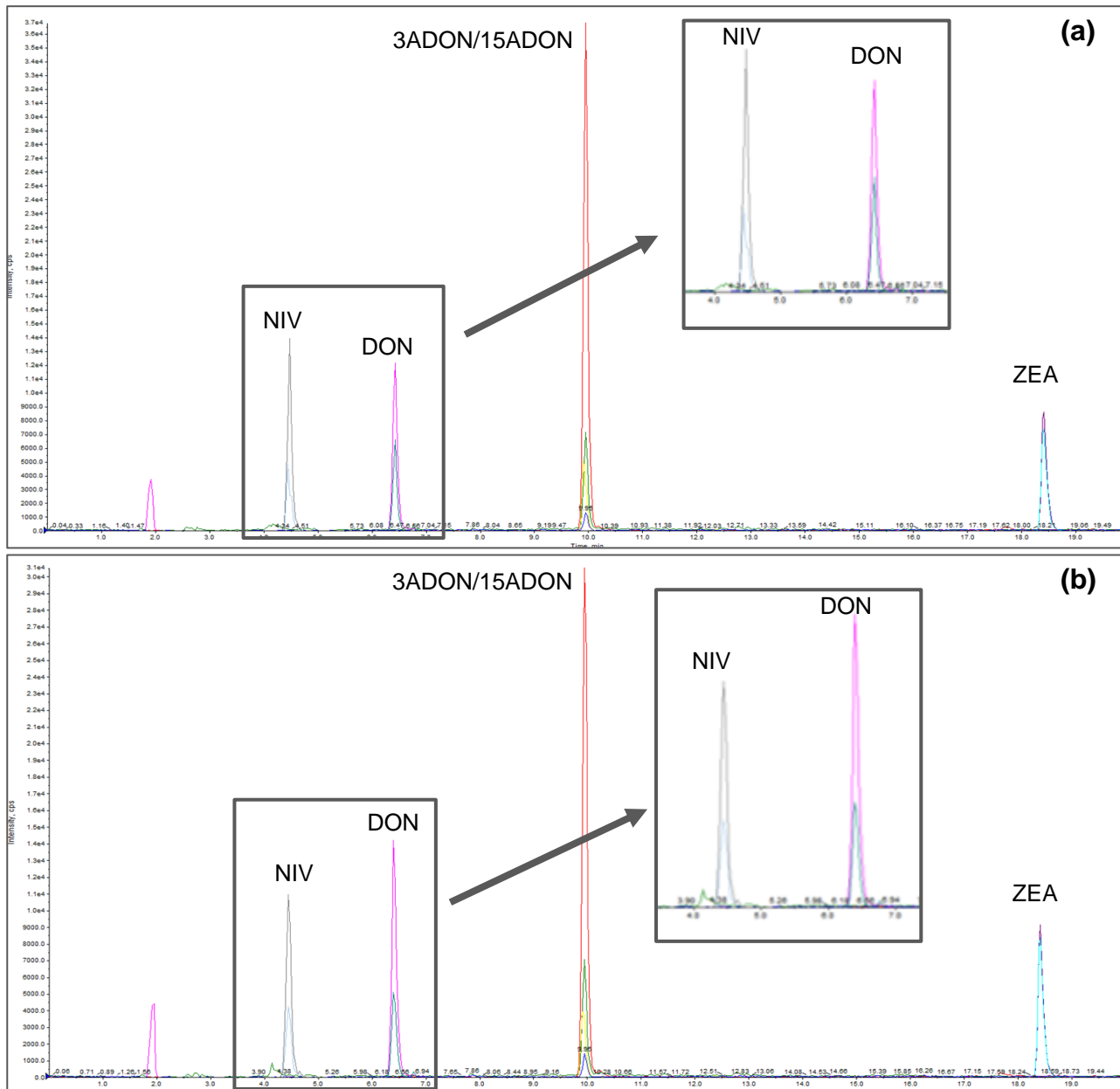
Para resolver esta situación se plantearon dos alternativas, una de ellas fue realizar una dilución al medio con un solvente con menor concentración de ACN (según método de referencia), y la otra, cambiar el solvente de la muestra a MeOH.

En el método original <sup>67</sup>, luego de la extracción, se realiza una dilución al medio del extracto empleando un solvente de dilución (ACN/H<sub>2</sub>O/HAc, 20:79:1 v/v/v), el cual disminuye la concentración de ACN previo a su inyección. Para corroborar, se realizó dilución de muestras fortificadas con el solvente de dilución mencionado, no observándose mejoras en la forma de los picos.

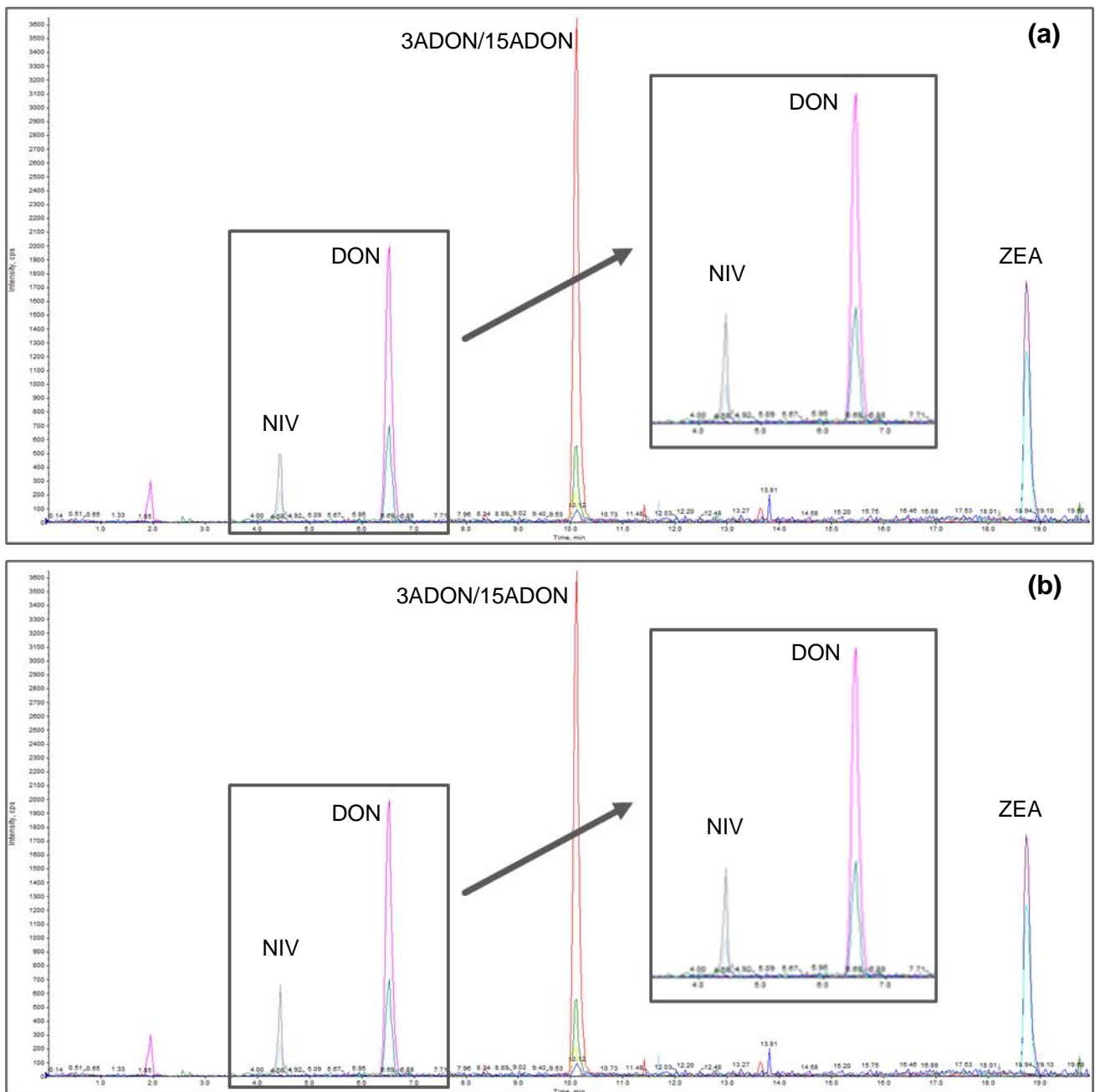
El cambio de solvente a uno tal que fuera similar a las condiciones iniciales de la corrida (20% MeOH) fue empleado. A muestras fortificadas, luego de la obtención del extracto, se evaporó a sequedad con nitrógeno industrial. Se recuperó la muestra en dos soluciones distintas, MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (20:79:1, v/v/v) y MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (50:49:1, v/v/v). En la figura 14 se muestran los resultados de los cromatogramas producto del cambio de solvente.

En estas condiciones, se obtuvieron picos de forma y ancho adecuados, pero se observó que, a estas concentraciones de MeOH, quedaba material en suspensión y adherido a las paredes del vial. Se adicionó más MeOH hasta que todo el material quedara disuelto, determinándose que el porcentaje de MeOH tenía que estar entre 80-90%.

La evaluación empleando como solventes MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (80:19:1, v/v/v) y MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (90:9:1, v/v/v), permitió observar picos de forma y ancho adecuado (Figura 15), sin obtener material en suspensión ni adherencia en las paredes del vial. Dado que entre 80% y 90% de MeOH no hubo diferencias de apreciables en la forma de los picos, se optó trabajar con la composición 80% de MeOH, por ser la más cercana a condiciones cromatográficas iniciales.



**Figura 14** - Cromatograma de mezcla de estándares de concentración 1000 µg/L en solvente con (a) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (20:79:1, v/v/v) y, (b) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (50:49:1, v/v/v).



**Figura 15** - Cromatograma de mezcla de estándares de concentración 1000  $\mu\text{g/L}$  en solvente con (a) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (80:19:1, v/v/v) y (b) MeOH/H<sub>2</sub>O/HAc (90:9:1, v/v/v).

#### 4.1.1.2 Parámetros del analizador de masas

Para la detección por MS/MS, se evaluaron parámetros como la intensidad de la señal, forma de los picos, fragmentación y determinación de fragmentos característicos.

Cuatro de las cinco micotoxinas a evaluar (DON, NIV, 3ADON y ZEA), de acuerdo con la bibliografía, se observan de forma adecuada en modo de adquisición de iones negativos. El 15ADON, en cambio, se observa mejor en modo positivo. Se pueden formar varios iones según la composición de la fase móvil y los solventes de extracción utilizados, según se detalla en la Tabla 7. Con la intención de desarrollar un método que se lleve a cabo en una sola corrida, se procedió a la optimización del 15ADON en modo negativo.

Micotoxina	Fórmula	PM	[M-H] <sup>-</sup>	[M+Ac] <sup>-</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296	295	355	297	319	335
NIV	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	312	311	371	313	335	51
15ADON	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338	337	397	339	361	377
3ADON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	338	337	397	339	361	377
ZEA	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	318	317	377	319	341	357

**Tabla 7** - Fórmula, peso molecular (PM) y principales iones precursores formados durante la ionización para los tricotecenos tipo B y ZEA. Ac=acetato.

La optimización fue realizada mediante la inyección directa de estándares a la fuente de ionización mediante el sistema FIA (del inglés, Flow Injection Analysis), sin separación cromatográfica previa.

Para las micotoxinas DON, NIV, 3ADON y ZEA se realizó la optimización automática de la fragmentación, obteniéndose varios fragmentos de los cuales se seleccionaron los dos de mayor intensidad. La optimización para el 15ADON se realizó de forma manual, dado que, al realizar la optimización de forma automática, no se obtuvieron resultados aceptables.

Se seleccionaron dos transiciones para las micotoxinas DON (355,2/59; 355,2/265), NIV (371/56; 371/281,3) y ZEA (319,1/62,9; 319/275), la de mayor intensidad para realizar la cuantificación, y la que le sigue en intensidad como transición de confirmación.

Los isómeros 15ADON y 3ADON tienen el mismo m/z del ion precursor. Dado que tienen un fragmento mayoritario en común, se evaluó para el 3ADON tres fragmentos (397/59,2; 397/307,4; 397/337,1), incluyendo el fragmento en común, y para el 15ADON uno sólo de sus fragmentos (337/173,1), el cual no se encuentra entre los

fragmentos del 3ADON. A partir de los resultados de la optimización dificultosa del 15ADON en modo negativo, se eligió una mayor cantidad de fragmentos para 3ADON, con la intención de distinguirlo de su isómero.

En la Tabla 8, se encuentran las condiciones optimizadas de cada transición para los analitos que incluyen: el potencial de desagrupamiento o declustering potential (DP), el potencial de entrada o entrance potential (EP), energía de colisión o collision energy (CE) y el potencial de salida de la celda de colisión collision cell exit potential (CXP).

Analito	Ion precursor (m/z)	Iones producto	tR (min)	IR	DP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)	
<b>NIV</b>	[M+Ac] <sup>+</sup>	371	<b>59</b>	4,46	0,39	-30	-11	-10	0	
			281,3						-14	-2
<b>DON</b>	[M+Ac] <sup>+</sup>	355,2	<b>59</b>	6,49	0,41	-45	-2	-32	-36	
			265						-28	-2.00
<b>15ADON</b>	[M-H] <sup>-</sup>	337	<b>173,1</b>	9,99	-	-47,81	-8,11	-14,39	-18,2	
<b>3ADON</b>	[M+Ac] <sup>+</sup>		<b>59,2</b>		0,13				-22	-2
			337,1	9,99		-20	-3,5	-20	-10	-10
			307,4		0,06				-20	-2
<b>ZEA</b>	[M-H] <sup>-</sup>	319,1	<b>62,9</b>	18,57	0,80	-85	-10,5	-48	-62	0
			275						-34	-20

**Tabla 8** - Ion precursor, iones productos, tiempos de retención (tR), ion ratio (IR) y condiciones de voltaje en el espectrómetro de masas para método 1. Se marca en negrita la transición de cuantificación.

#### 4.1.2 Validación preliminar del método 1

En base a protocolos desarrollados por el laboratorio de Química Bioanalítica se comenzó el proceso de validación. Se obtuvieron valores preliminares de recuperación, precisión, linealidad y efecto matriz. No se pudo realizar la validación completa de acuerdo con este documento por avería del equipo en uso.

En la tabla 9 se presenta un resumen de los resultados obtenidos.

Recuperación: Se evaluaron tres concentraciones de mezcla de estándares, de 2, 4 y 6 mg/kg. Se obtuvieron recuperaciones promedio de 51% para NIV, 41% para

DON, 130% para el 3ADON, 138% para 15ADON y 154% para ZEA, a todos los niveles de concentración seleccionados.

Precisión instrumental: Evaluada como el %RSD de la inyección por quintuplicado del punto de concentración 1000 µg/L de la curva de calibración en matriz. Con excepción de la ZEA, el resto de los analitos arrojaron valores cercanos o menores al 10%. Se obtuvieron valores de %RSD de 11% para 15ADON, 2% para el 3ADON y DON, y de 7% para NIV. El valor de %RSD obtenido para la ZEA fue de 19%.

Repetitividad: El %RSD del método evaluada a partir de fortificaciones por quintuplicado de concentración de 4 mg/kg, dio como resultado valores de 9% para 15ADON, 7% para 3ADON y DON, 10% para NIV y 8 para ZEA.

Linealidad: Las curvas de calibración, tanto en solvente como matriz, presentaron linealidad en el rango de concentración evaluado de 100 a 2000 µg/L, con coeficientes de correlación entre 0,98 y 0,99 para todos los analitos.

Efecto matriz: La evaluación del efecto matriz fue realizada mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración tanto en solvente como matriz empleando la Ecuación 1. El efecto matriz fue similar en todos los niveles de concentración evaluados, siendo el %EM de 5% para 15ADON, -14% para 3ADON, -35% para DON y NIV, y -41% para ZEA. Teniendo en cuenta estos resultados, se emplearon curvas de calibración matrix-matched para la cuantificación.

LOQ: Para la determinación del LOQ instrumental se tomó el valor más bajo de la curva de calibración de 100 µg/L. Teniendo en cuenta la veracidad, el LOQ del método sería estimado en 2 mg/kg.

A excepción de la recuperación (que no se pudo evaluar) y el LOQ, los resultados obtenidos para la validación de este método estuvieron dentro de los criterios establecidos. La continuación del ajuste del método, con una nueva evaluación de los parámetros fue suspendida por rotura del equipo.

Analito	R <sup>2</sup> MM	RSD% instrumental	RSD% método	LOQ µg/L	%Rec	Ion Ratio	EM%
NIV	0,99	7	10	100	50	0,39	-35
DON	0,99	2	7	100	41	0,41	-35
3ADON	0,99	2	7	100	130	0,13	-14
15ADON	0,99	11	9	100	138	-	5
ZEA	0,98	19	8	100	154	0,8	-41

**Tabla 9** - Resultados preliminares de la validación del método 1 para las cinco micotoxinas evaluadas, expresándose linealidad en matriz (R<sup>2</sup> MM), repetitividad (%RSD) instrumental y del método, límite de cuantificación (LOQ), porcentaje de recuperación (%Rec), ion ratio (IR), porcentaje de efecto matriz (%EM).

### 4.1.3 Optimización del método 2

Este método fue previamente empleado por el grupo de trabajo de la Dra. Lucía Pareja en el DQL, quienes evaluaron el mismo para pesticidas y las micotoxinas DON y ZEA, en cebada y trigo <sup>13</sup>. Se procedió a una extensión del alcance del método para incluir a las micotoxinas 15ADON, 3ADON y NIV, volviendo a evaluar a su vez DON y ZEA.

#### 4.1.3.1 Método cromatográfico

El método instrumental se evaluó empleando estándares de micotoxinas en MeOH. Se realizó la optimización del método cromatográfico en cuanto columna, fases móviles y temperatura de la columna, manteniendo el flujo, gradiente de fases móviles y condiciones de MS constante, tanto en modo positivo como negativo de adquisición (Tabla 10). Se determinaron los LOQ instrumentales para los analitos evaluados empleando estándares diluidos en MeOH:H<sub>2</sub>O 0,1% fórmico (1:1). Los mismos fueron de 20 µg/kg para 3ADON, 15ADON y NIV, 30 µg/kg para ZEA y 50 µg/kg para DON.

Se seleccionaron el método A para ZEA y 15ADON y el método D para DON, NIV y 3ADON. Al igual que en la evaluación del método 1, se presentaron dificultades en la optimización del NIV, observándose nuevamente picos de forma inadecuada, anchos y aserrados. Dada la experiencia previa con esta micotoxina en el método 1, se evaluó la redisolución del extracto de las muestras con MeOH 80%, mejorando de esta forma la visualización del analito, obteniéndose picos adecuados para su análisis. Se logró obtener un método cromatográfico que permitió la separación de las micotoxinas.

Modo positivo		Métodos		
Condiciones	A	B	C	
Fase móvil A	H <sub>2</sub> O/MeOH (98:2, v/v) con 5mM formiato de amonio, 0,1 % ácido fórmico.	H <sub>2</sub> O con 5 mM acetato de amonio, 0,1 % ácido acético.	H <sub>2</sub> O con 0,1 % ácido fórmico	
Fase móvil B	MeOH/H <sub>2</sub> O (98:2, v/v) con 5mM formiato de amonio, 0,1 % ácido fórmico.	MeOH/H <sub>2</sub> O (95:5 v/v) con 5 mM acetato de amonio, 0,1% ácido acético	ACN	
Volumen de inyección (µL)	5	5	5	
Tamaño de partícula columna C18 Eclipse XDB (µm)	3,5	3,5	5	
Temperatura de columna (°C)	20	30	45	
Modo negativo		Métodos		
Condiciones	D	E	F	
Fase móvil A	H <sub>2</sub> O con 5 mM acetato de amonio, 0,1 % ácido acético	H <sub>2</sub> O con 0,1 % ácido fórmico	H <sub>2</sub> O con 0,1 % ácido fórmico	
Fase móvil B	MeOH/H <sub>2</sub> O (95:5 v/v) con 5 mM acetato de amonio, 0,1% ácido acético	ACN	MeOH con 0,1% ácido fórmico	
Volumen de inyección (µL)	5	5	5	
Tamaño de partícula columna C18 Eclipse XDB (µm)	3,5	5 µm	3,5	
Temperatura de columna (°C)	20	20	40	

**Tabla 10** - Condiciones evaluadas en la optimización cromatográfica del método 2.

#### 4.1.3.2 Parámetros de espectrometría de masa

La optimización de las condiciones MS fueron realizadas de forma manual. Se inyectaron las soluciones de los estándares individuales de una concentración de 100 µg/L a una velocidad de 10 µL/min en solución ACN/H<sub>2</sub>O 0,1% ácido fórmico (1:1, v/v),

optimizándose dos transiciones para cada analito. Se trabajaron en modos de adquisición de iones positivo para 15ADON (339,1/137; 339,1/321,4) y ZEA (319,2/301; 319,2/283,1); en modo de iones negativos para DON (355/59; 355/295,3), 3ADON (397/59,1; 397/337,1) y NIV (371,2/281; 371,2/311). La transición de mayor intensidad para cada uno de los analitos fue la seleccionada para realizar la cuantificación, la segunda transición como confirmatoria. Los resultados de los voltajes optimizados tanto en modo positivo como negativo se encuentran en las tablas 11 y 12 respectivamente, presentándose en la Figura 16 los cromatogramas correspondientes.

Analito	Ion precursor (m/z)	Iones producto	IR	tR (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
<b>15ADON</b>	$[M+H]^+$	<b>137</b>	0.73	9,6	53	5	23
		321,4			78	12	18
<b>ZEA</b>	$[M+H]^+$	<b>301</b>	0.92	11,8	72	6	17
		283,1					15

**Tabla 11** - Ion precursor, iones producto, ion ratio (IR), tiempo de retención (tR) y condiciones de voltaje en el espectrómetro de masas para modo positivo, del método 2.

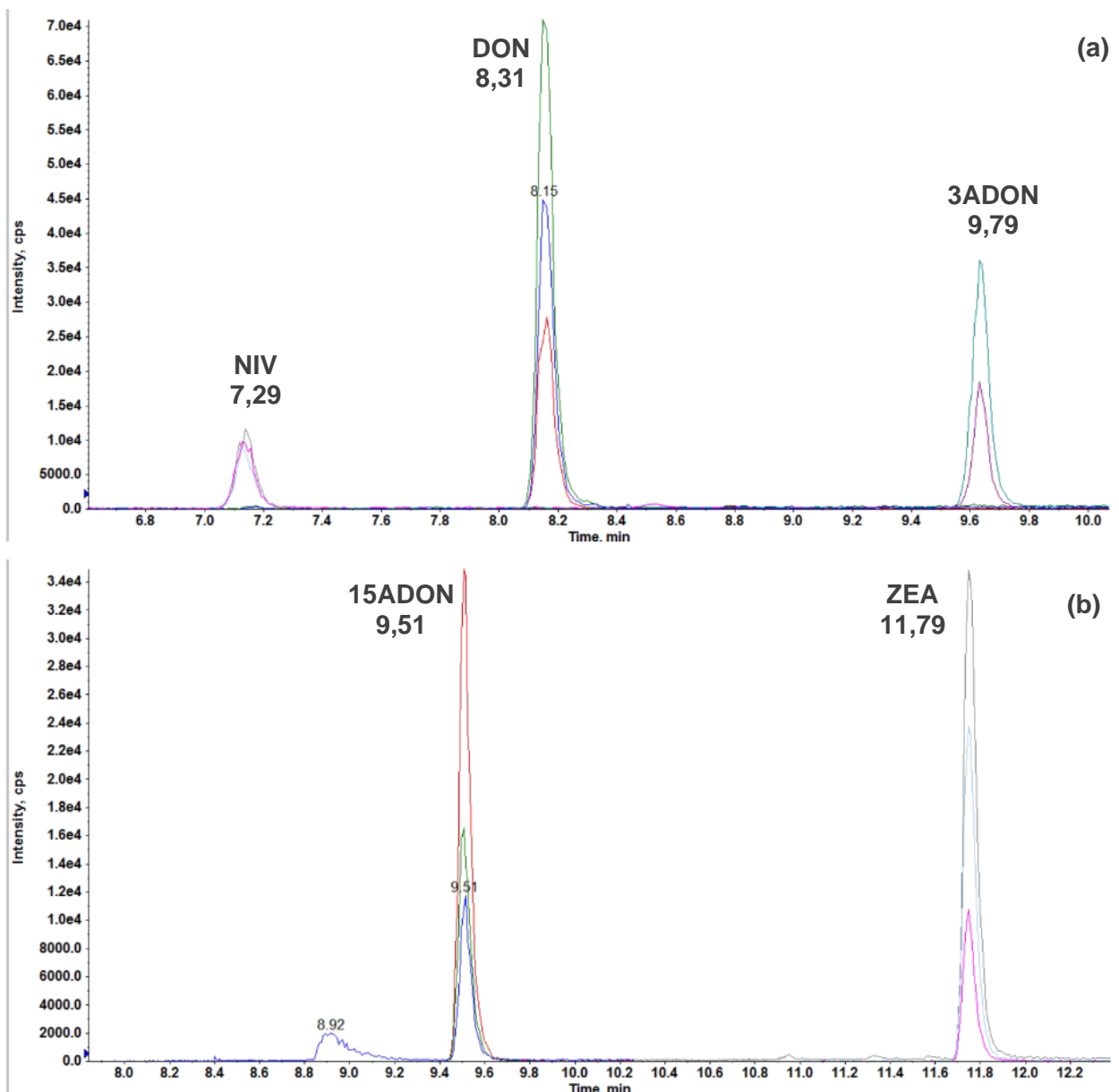
Se marca en negrita la transición de cuantificación.

Analito	Ion precursor (m/z)	Iones producto	IR	tR (min)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
<b>DON</b>	$[M+Ac]^-$	<b>59</b>	0,40	8,2	-40	-3	-48
		295,3					-14,86
<b>NIV</b>	$[M+Ac]^-$	<b>281</b>	0,58	7,2	-40	-4	-25
		311					-12
<b>3ADON</b>	$[M+Ac]^-$	<b>59,1</b>	0,28	9,7	-42	-4	-59
		337,1			-20		-10

**Tabla 12** - Ion precursor, iones producto, ion ratio (IR), tiempo de retención (tR) y condiciones de voltaje en el espectrómetro de masas para modo negativo del método 2.

Se marca en negrita la transición de cuantificación.

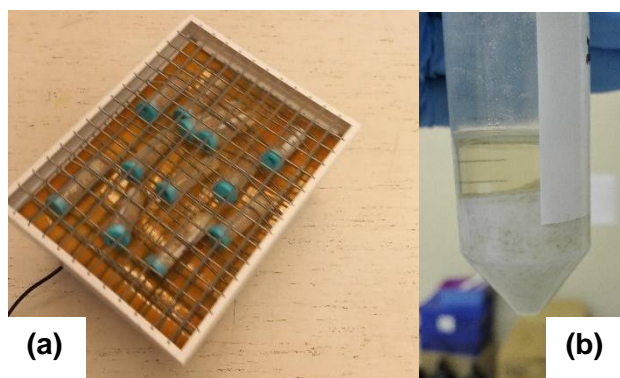
Los isómeros 3ADON y 15ADON no logran resolverse cromatográficamente con los métodos HPLC, aun empleando columnas eficientes. Como ha sido reportado en la literatura en los grupos de investigación con más experiencia en la temática, se analiza el 3ADON en modo negativo y el 15ADON en modo positivo. Esto permite en principio separar las señales para cuantificar cada isómero por separado. Sin embargo, para confirmar estos resultados, se requiere un método que permita separarlos cromatográficamente, lo cual podría lograrse usando una técnica de cromatografía líquida de alta resolución o UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). En la literatura más reciente, se han desarrollado métodos con UPLC para lograr su separación <sup>74</sup>. Los métodos desarrollados en esta tesis fueron siguiendo los lineamientos de trabajos anteriores, trabajando en los dos modos de adquisición.



**Figura 16** - TIC de mezcla de estándares a una concentración de 500 µg/L en solvente, en modo negativo (a) y positivo (b), correspondientes al método 2.

#### 4.1.3.3 Método de extracción

Las modificaciones realizadas con respecto a la metodología, al igual que en el método 1 se debieron a la necesidad de adaptarse a los equipos disponibles en el laboratorio. La única adaptación del procedimiento original fue la centrifugación final, dejando sedimentar por gravedad, obteniendo un sobrenadante límpido, como se puede observar en la Imagen 2.



**Imagen 2** – (a) Shaker orbital horizontal, (b) tubo de muestra post decantación por gravedad con sobrenadante límpido.

Una vez separado el extracto este fue sujeto de un cambio de solvente previo al análisis por HPLC-MS/MS para obtener picos de forma y ancho adecuados. Se evaporó el solvente de extracción con un flujo constante de nitrógeno industrial, con posterior recuperación en MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) con 0,1% ácido fórmico. Se tomaron 500 µL del extracto que una vez evaporados, fueron recuperados en 200 µL del solvente seleccionado, obteniéndose una buena sensibilidad de las señales encontradas.

En el caso de DON, en la mayoría de las muestras el contenido fue mucho mayor al esperado inicialmente, por lo que fue necesario realizar diluciones de los extractos para su correcta cuantificación en el rango de linealidad del método. Luego de diversas pruebas utilizó un factor de dilución 1:20 (50 µL de extracto recuperado en 1000 µL de solvente).

#### **4.1.4 Validación del método 2**

Para la validación de este método se tomó como referencia la guía de la SANTE Documento No SANTE/11312/2021 <sup>56</sup>. A pesar de que esta guía no está planteada para micotoxinas, se utilizó como referencia al momento de la validación por ser una sumamente exigente para alimentos. Además, se tuvieron en cuenta los criterios sugeridos por la guía SANTE/12089/2016 para la identificación de estos compuestos.

Para evaluar la recuperación y LOQ del método, se seleccionaron las concentraciones de 35, 50 y 100 µg/kg para 15ADON, 3ADON y NIV, y las concentraciones 100 y 250 µg/kg para ZEA y DON. Los niveles de concentración

fueron seleccionados teniendo en cuenta los límites máximos permitidos según la regulación nacional, y el nivel de contaminación estimado en las muestras.

Los niveles que se evaluaron son los más bajos posibles seleccionados en función de las menores concentraciones observadas en las muestras. Este método, pese a utilizar una baja cantidad de muestra y no tener clean-up permite detectar concentraciones bajas de micotoxinas, estando por debajo de los límites máximos permitidos según el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional.

Identificación y confirmación: Se obtuvieron dos transiciones para cada analito, los cuales coinciden en su tiempo de retención con el criterio  $\pm 0,2$  min con los del estándar, y sus picos se solapan completamente. Presentan un ion ratio dentro del  $\pm 30\%$  al promedio de los estándares de calibración de la misma corrida (Anexo II). En la Figura 17 se puede observar una comparación de los cromatogramas de un estándar en matriz a una concentración de 500  $\mu\text{g/L}$  con una muestra positiva a las cinco micotoxinas (muestra 5 zafra 2018), indicando a su vez los IR correspondientes.

Recuperación (%Rec): El valor de recuperación se calculó como el porcentaje de la relación entre la concentración experimental y la concentración teórica esperada, fue de 70-74% para DON, 84-109% para NIV, 85-111% para 3ADON, 100-108% para 15ADON y 92-116% para ZEA.

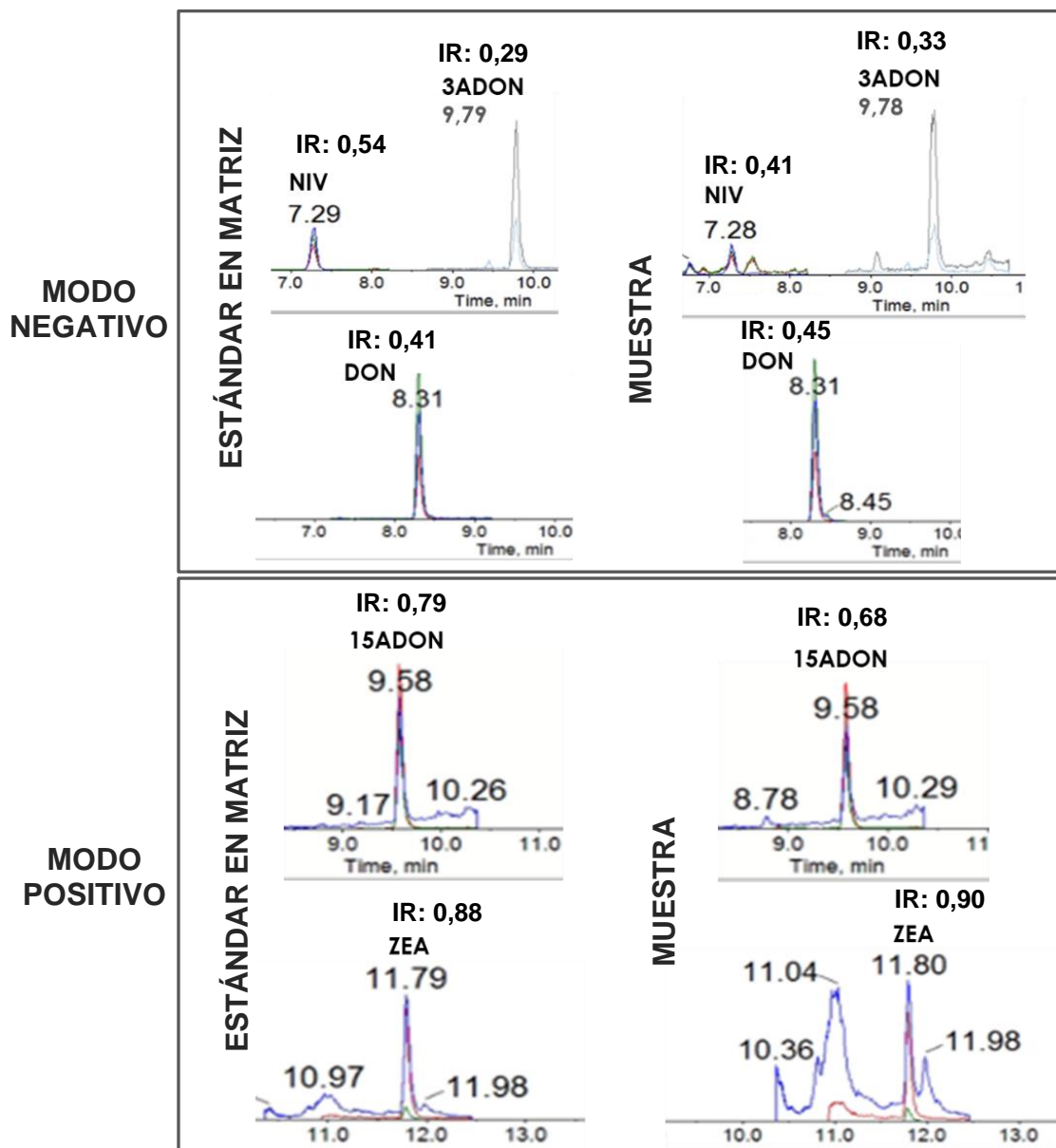
Repetitividad: A partir de las concentraciones obtenidas de la fortificación de 5 réplicas, se calculó el %RSD. El mismo fue de 8% para DON en todas las concentraciones evaluadas, de 3-10% para NIV, 3-5% para 3ADON, 4-7% para 15ADON y 7% para ZEA.

La repetitividad del instrumento determinada por la inyección por quintuplicado del punto de 250  $\mu\text{g/L}$  de la curva de calibración en solvente, arrojó un %RSD entre 1 y 5% para todas las micotoxinas.

Reproducibilidad: Se evaluó la reproducibilidad empleando un segundo operador, bajo las mismas condiciones de ensayo, a los mismos niveles de concentración, observándose %RSD similares a los obtenidos por el primer operador y aceptables según los criterios de validación establecidos.

Linealidad: Se obtuvieron coeficientes de correlación de 0,99 para todos los analitos, tanto en solvente como en matriz. Se realizó el cálculo del %BCC para todos los analitos oscilando entre -4 y 6 para DON, -12 y 11 para NIV, -9 y 8 para 3ADON, -

15 y 12 para el 15ADON y -12 y 10 para la ZEA, en el rango de concentraciones evaluado. Estos resultados cumplen con los requisitos sugeridos de diferencia de  $\pm 20\%$  entre la concentración verdadera y la calculada.



**Figura 17** - Comparación de TIC de mezcla de estándares en matriz a una concentración 500  $\mu\text{g/L}$ , con una muestra positiva a las cinco micotoxinas, indicando sus IR correspondientes.

**LOQ:** Fue definido como el menor valor de concentración en el cual se obtuvo una recuperación entre 70 a 120% con un  $\text{RSD}\% \leq 20$ . Tanto para DON y ZEA, el LOQ fue de 100  $\mu\text{g/kg}$ , observándose recuperaciones de 74 y 116%, con  $\text{RSD}\%$  de 8 y 7% respectivamente. Para NIV, 3ADON y 15ADON, el menor valor evaluado de 35  $\mu\text{g/kg}$

fue definido como su LOQ, obteniéndose recuperaciones de 109, 111 y 108%, con RSD% de 14, 3 y 4% respectivamente.

Efecto matriz: Fue calculado mediante la relación entre las pendientes de las curvas en solvente y en matriz. A pesar de que el método no incluye un paso de clean-up, el %EM de las micotoxinas fue bajo (-5% para DON, 0,2% para 15ADON, 6% para NIV, -6% para ZEA), con excepción del 3ADON, el cual presentó una supresión de la señal de -17%. Estos resultados indican ausencia de efecto matriz según guías internacionales (SANTE/11312/2021 y SANTE/12089/2016). Desde el punto de vista instrumental las interferencias debidas al efecto matriz no constituirían un problema al momento de la cuantificación de los analitos en estudio.

La Tabla 13 muestra los datos experimentales correspondientes a la validación del método 2, mostrándose los %Rec para los distintos niveles de fortificación, %RSD, %EM, coeficiente de correlación ( $R^2$ ) para las curvas en solvente y en matriz, LOQ, tanto instrumental como del método, y los parámetros de identificación de los analitos, tR e IR. Los mismos parámetros evaluados por el operador 2 se presentan en la Tabla 14.

A partir de los resultados de la validación, podemos decir que el método 2 cumple con los requisitos establecidos por las guías de referencia, SANTE/11312/2021 y SANTE/12089/2016, pudiendo ser aplicado para la detección y cuantificación de las cinco micotoxinas evaluadas, en muestras reales.

Micotoxina	Nivel (µg/kg)	%Rec	%RSD	IR	tR (min)	LOQi (µg/kg)	LOQ µg/kg	%EM	R <sup>2</sup> MM	R <sup>2</sup> ste
<b>DON</b>	100	74	8	0,40	8,2	50	100	-5	0,9977	0,9989
	250	70	8							
<b>NIV</b>	35	109	14	0,58	7,2	20	35	6	0,9912	0,9994
	50	98	3							
	100	84	7							
<b>3ADON</b>	35	111	3	0,28	9,7	20	35	-17	0,9959	0,9995
	50	85	3							
	100	96	5							
<b>ZEA</b>	100	116	7	0,92	11,8	30	100	-6	0,9932	0,9993
	250	92	7							
<b>15ADON</b>	35	104	4	0,73	9,6	20	35	0,2	0,9898	0,9998
	50	100	3							
	100	101	7							

**Tabla 13** – Resultados de la validación del método 2 para las cinco micotoxinas evaluadas, expresándose porcentaje de recuperación (%Rec), repetitividad (%RSD) según nivel de concentración evaluado, ion ratio (IR), tiempos de retención (tR), límite de cuantificación instrumental y del método (LOQi y LOQ), porcentaje de efecto matriz (%EM) y linealidad tanto en matriz (R<sup>2</sup> MM) como en solvente (R<sup>2</sup> ste).

Micotoxina	Nivel (µg/kg)	%Rec	%RSD	IR	tR (min)	%EM	R <sup>2</sup> MM	R <sup>2</sup> ste
<b>DON</b>	100	101	19	0,84	8,2	-22	0,9985	0,9981
	1000	66	15					
<b>3ADON</b>	35	102	4	0,37	9,7	-17	0,9997	0,9966
	50	100	5					
	100	94	14					
<b>NIV</b>	50	108	6	0,68	7,1	-5	0,9951	0,9953
	100	95	3					
	250	62	14					
<b>ZEA</b>	100	80	19	0,9	11,8	-5	0,9993	0,9984
	35	96	5					
<b>15ADON</b>	50	88	11	0,57	9,5	3	0,9994	0,9991
	100	103	2					

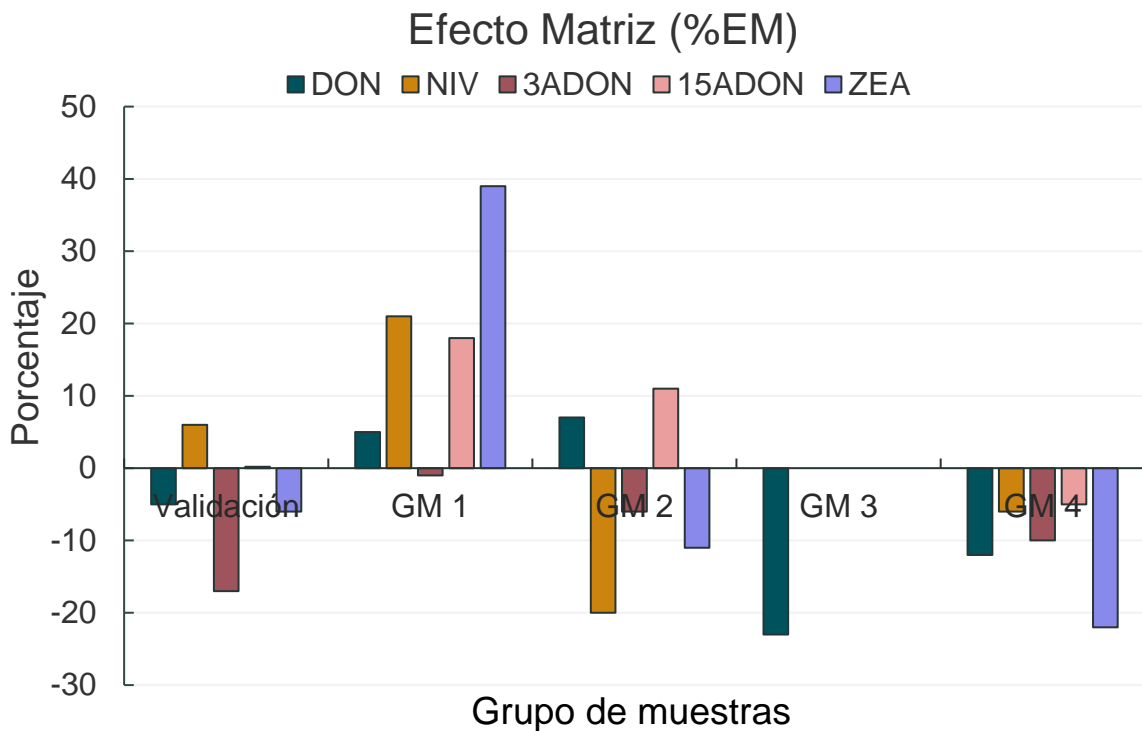
**Tabla 14** - Resultados del Operador 2 para las cinco micotoxinas evaluadas, expresándose porcentaje de recuperación (%Rec), repetitividad (%RSD) según nivel de concentración evaluado, ion ratio (IR), tiempos de retención (tR), límite de cuantificación (LOQ), porcentaje de efecto matriz (%EM) y linealidad tanto en matriz (R<sup>2</sup> MM) como en solvente (R<sup>2</sup> ste).

#### **4.1.5 Control de Calidad método 2**

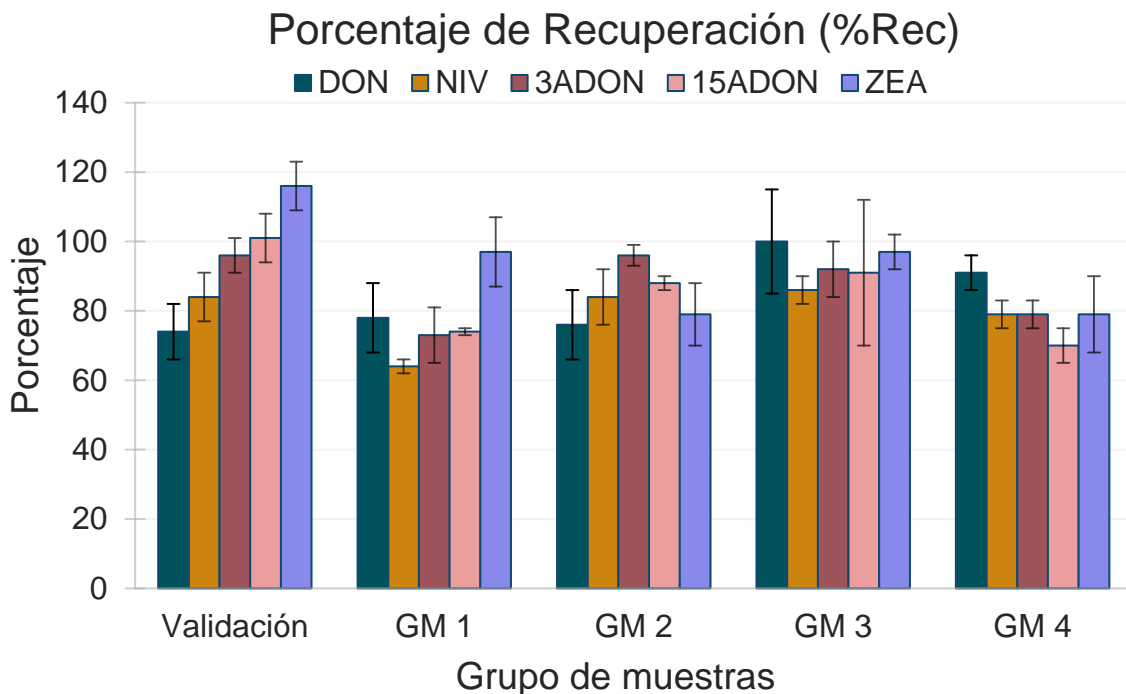
Los controles de calidad fueron evaluados junto con las muestras en cada uno de los ensayos. Se evaluaron blancos, tanto de muestras como blancos de reactivos, y muestras blanco fortificadas a concentraciones conocidas, por triplicado, para corroborar que el método se mantenga dentro de los parámetros adecuados.

Se evaluaron la %Rec, %RSD, linealidad de las curvas de calibración tanto en solvente como en matriz, verificando con estas últimas que no hubiera grandes variaciones en el efecto matriz. La linealidad se mantuvo dentro de los rangos de concentración evaluados, para solvente y matriz, pero a partir de estos se observó variabilidades del %EM (Figura 18) con respecto a los obtenidos durante la validación, incluso entre los distintos ensayos, tanto de supresión como aumento de la señal. A modo de compensación, las cuantificaciones fueron realizadas en una curva en matriz (matrix-matched), ya que, por costos y disponibilidad, no se cuenta con estándares marcados isotópicamente. A lo largo de los distintos ensayos, los parámetros de %Rec y %RSD (Figura 19), se mantuvieron dentro de los criterios aceptables según las guías DG SANTE para análisis de rutina <sup>56</sup>, estando dentro del 60-140% los %Rec y %RSD  $\leq 20\%$ .

En Anexo II se presentan los resultados del control de calidad para los grupos de muestras evaluados. Dichos grupos se denominan: GM1, a las muestras 1 a 28 de la Temporada 1 2019; GM2 a las muestras 29 a 56 de la Temporada 1 2019 y las muestras 100 a 127 de la Temporada 2 2019; GM3 a 39 muestras de zafra 2018 y GM4 a las muestras restantes de zafra 2018.



**Figura 18** - Comparación del %EM obtenido en la validación y los ensayos posteriores, para las micotoxinas evaluadas. GM= grupo de muestras.



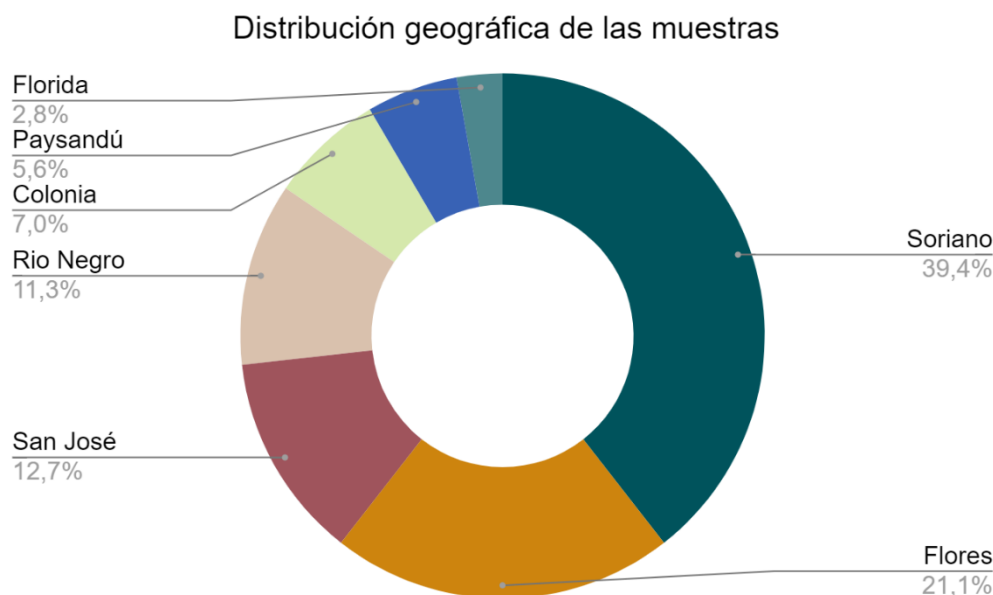
**Figura 19** - Comparación del porcentaje de recuperación (%Rec) entre la validación y los ensayos posteriores, para las micotoxinas evaluadas, y sus desviaciones estándar relativas (%RSD) indicadas como barras de error. GM= grupo de muestras.

## 4.2 Evaluación de micotoxinas derivadas de la población de *Fusarium* circulante en el país en la zafra 2018.

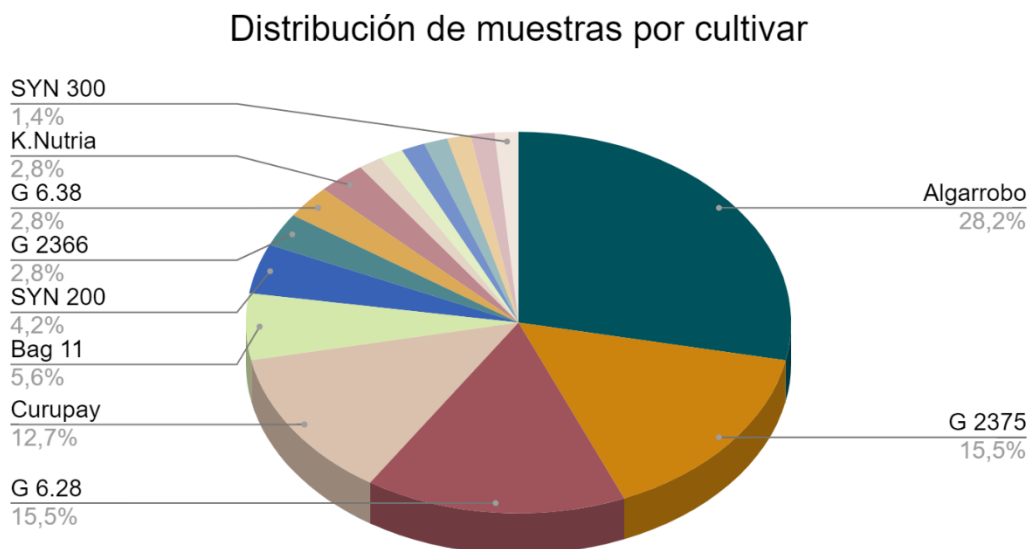
Las 71 muestras correspondientes a la zafra 2018 fueron evaluadas mediante el método 2, para la detección y cuantificación de las micotoxinas propuestas.

La distribución geográfica de las muestras, así como de los distintos cultivares, son las que se muestran en las figuras 20 y 21 respectivamente, presentándose los resultados obtenidos del análisis de micotoxinas en la Tabla 15. En el Anexo III se proporciona la tabla de resultados extendida, incluyendo la identificación de las especies de hongos aisladas en la muestra y el quimiotipo detectado asociado.

Las muestras de trigo fueron evaluadas por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, con el fin de identificar los hongos presentes en las mismas, así como su quimiotipo. La mayoría de los aislamientos pertenecen al CEEG (64,9%), siendo *F. graminearum* la especie predominante (64,3%), seguida de *F. cortaderiae* (0,4%) y *F. austroamericanum* (0,2%). El segundo más predominante fue *F. poae* (19,1%) seguido de *F. avenaceum* (8,2%), *F. tricinctum* (4,6%) y *F. pseudograminearum* (2,6%). *F. proliferatum*, *F. heterosporum*, *F. scirpi* y *F. cf. incarnatum* también fueron aislados en una proporción menor (0,6%) de los granos de trigo <sup>14</sup>.



**Figura 20** - Representación gráfica de la distribución de las muestras de acuerdo con el departamento.



**Figura 21** - Representación gráfica de la distribución de las muestras de acuerdo con el cultivar

#### **4.2.1 Detección de micotoxinas**

La evaluación de los datos se realizó tomando en cuenta para DON el límite máximo de 1000 µg/kg en harinas de trigo, de acuerdo con Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional, el cual coincide con el límite máximo tolerado para trigo integral según la Resolución RDC N°7 de Brasil. El mismo límite fue tomando como referencia para sus variables acetiladas (3ADON y 15ADON), así como para el NIV, quienes no presentan regulación propia. Para ZEA, se toma como límite máximo el establecido por la Resolución RDC N°7 de Brasil para harinas de trigo integral, el cual es de 200 µg/kg.

Un código de colores fue generado para mejorar la visualización de los datos, donde el color verde representa no detectado (ND), el naranja representa un resultado superior al LOQ instrumental pero menor al LOQ del método (<LOQ), y el rosa indica un resultado cuantificable y por encima de los límites máximos establecidos, mencionados en el párrafo anterior.

Muestra	Cultivar	Departamento	Concentración (µg/kg)				
			DON	3ADON	NIV	ZEA	15ADON
1	G 2375	Soriano	532	ND	ND	ND	ND
2	G 2433	Soriano	ND	ND	ND	ND	ND
3	G 2375	Soriano	ND	ND	ND	ND	ND
4	Curupay	Soriano	738	ND	ND	ND	ND
5	Algarrobo	Soriano	1305	ND	37	ND	ND
7	Algarrobo	Soriano	4062	ND	ND	1809	ND
8	Algarrobo	Soriano	714	ND	ND	ND	ND
9	Algarrobo	Río Negro	459	ND	ND	ND	ND
10	Algarrobo	Río Negro	179	ND	ND	ND	ND
11	Algarrobo	Flores	604	ND	ND	ND	ND
12	Algarrobo	Paysandú	350	ND	48	ND	ND
13	Algarrobo	Paysandú	783	ND	<LOQ	ND	ND
14	Algarrobo	Soriano	1894	ND	<LOQ	<LOQ	ND
15	Algarrobo	Soriano	10507	ND	ND	5193	ND
16	Algarrobo	Soriano	1720	ND	ND	ND	ND
17	Algarrobo	Soriano	881	ND	39	ND	ND
18	Algarrobo	Soriano	5298	67	ND	1852	ND
19	Algarrobo	Soriano	3289	ND	ND	726	ND
20	Algarrobo	Soriano	1873	ND	ND	ND	ND
21	Algarrobo	Río Negro	525	ND	ND	ND	ND
22	Algarrobo	Flores	1827	ND	<LOQ	ND	ND
23	Curupay	Río Negro	283	ND	ND	ND	ND
25	Curupay	Paysandú	208	ND	ND	ND	ND
26	Curupay	Paysandú	ND	ND	ND	ND	ND
28	Curupay	Colonia	850	<LOQ	49	ND	ND
29	Curupay	Soriano	649	ND	ND	ND	ND
30	Curupay	Soriano	345	ND	ND	ND	ND
31	Curupay	Colonia	461	ND	ND	104	ND
32	Curupay	Colonia	102	ND	ND	ND	ND
34	SYN 200	Río Negro	<LOQ	ND	ND	ND	ND
35	SYN 200	Soriano	261	ND	ND	ND	ND
36	SYN 211	Soriano	352	ND	ND	ND	ND
37	SYN 300	Soriano	<LOQ	ND	ND	ND	ND
38	SYN 200	Soriano	<LOQ	ND	ND	ND	ND
40	Bag 11	Río Negro	ND	ND	ND	ND	ND
41	K. Nutria	Colonia	ND	ND	ND	ND	ND
42	Bag 11	Colonia	ND	ND	ND	ND	ND
43	Algarrobo	Soriano	409	ND	ND	ND	ND
44	K. Nutria	Soriano	419	ND	ND	ND	ND
45	G 6.28	Flores	ND	ND	ND	ND	ND
46	G 6.81	Flores	<LOQ	ND	ND	ND	ND

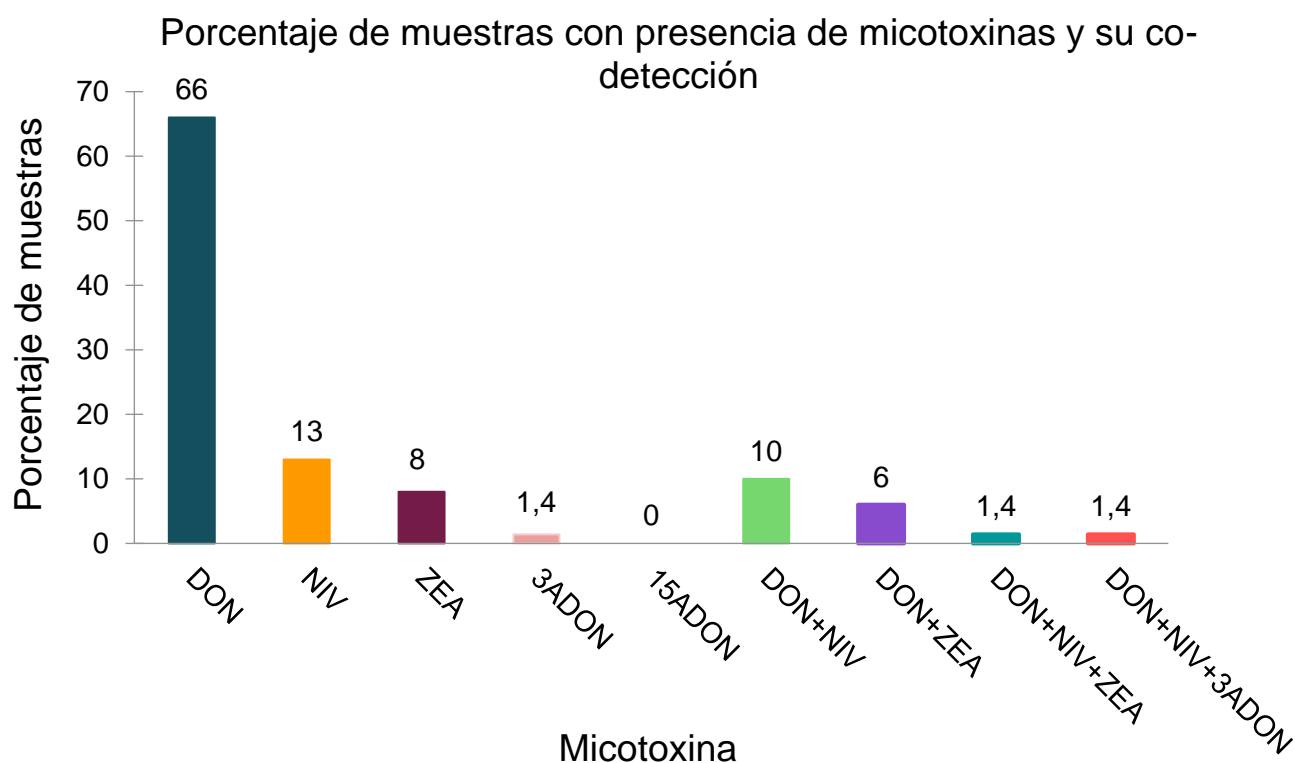
47	Bag 11	Flores	1153	ND	ND	ND	ND
48	Bag 11	Flores	<LOQ	ND	ND	ND	ND
49	G 6.28	Flores	662	ND	ND	ND	ND
50	G 6.28	San José	<LOQ	ND	66	ND	ND
51	Nogal	Flores	1423	ND	ND	ND	ND
52	G 6.28	Flores	320	ND	ND	ND	ND
53	G 6.28	Flores	ND	ND	ND	ND	ND
54	G 6.38	Flores	176	ND	ND	ND	ND
55	G 6.38	Flores	ND	ND	ND	ND	ND
56	G 6.28	Flores	103	ND	ND	ND	ND
57	G 6.28	Flores	213	ND	ND	ND	ND
58	G 6.28	Flores	ND	ND	ND	ND	ND
60	G 2375	San José	ND	ND	ND	ND	ND
61	G 6.28	San José	264	ND	ND	ND	ND
62	Algarrobo	San José	944	ND	44	ND	ND
63	G 2375	San José	ND	ND	ND	ND	ND
64	G 6.28	San José	ND	ND	ND	ND	ND
65	G 2375	San José	1384	ND	55	ND	ND
66	G 2375	San José	ND	ND	ND	ND	ND
67	G 2375	San José	141	ND	ND	ND	ND
69	G 2375	Florida	<LOQ	ND	ND	ND	ND
70	Algarrobo	Florida	ND	ND	ND	ND	ND
71	G 2375	Soriano	ND	ND	ND	ND	ND
72	G 6.28	Soriano	797	ND	31	ND	ND
73	G 2366	Soriano	798	ND	ND	ND	ND
74	G 2375	Soriano	1123	ND	ND	ND	ND
77	G 2375	Soriano	130	ND	ND	ND	ND
78	G 6.87	Soriano	ND	ND	ND	ND	ND
80	G 6.88	Río Negro	ND	ND	ND	ND	ND
81	G 2366	Río Negro	8711	ND	61	3399	ND

**Tabla 15** - Resultados del análisis de micotoxinas de las muestras correspondientes a la zafra de cultivo de trigo 2018, indicando el cultivar y departamento de siembra asociadas a las mismas. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras con concentraciones superiores a los límites máximos establecidos (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

Del total de 71 muestras evaluadas, el 66% (47/71) presentaron DON en un rango entre 102 y 10507 µg/kg. En 9 de las muestras, representando un 13%, se cuantificó NIV en concentraciones entre 31 y 66 µg/kg, mientras que ZEA se encontró en concentraciones entre 104 y 5193 µg/kg en un 8% de las muestras. En cuanto a las

variables acetiladas, se encontró 3ADON en una única muestra con una concentración de 67 µg/kg, no se detectó 15ADON.

Se observó a su vez la contaminación con más de una micotoxina (Figura 22), en 10% de las muestras se encontraron DON y NIV, en un 6% DON y ZEA, y a su vez, una muestra presentó DON+ZEA+NIV, y otra DON+NIV+3ADON.



**Figura 22** - Porcentaje de muestras con presencia de micotoxinas y su co-detección en las muestras analizadas.

#### 4.2.1.1 DON y variantes acetiladas

Los resultados de este estudio revelan un claro predominio de la micotoxina DON como contaminante de granos de trigo en nuestro país, con valores que superan los límites máximos establecidos para harinas de trigo por el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional, en el 20% de las muestras. Las mismas muestras superan los límites máximos establecidos para harinas de trigo en Brasil, Argentina y EE. UU. y un 11% de las muestras también superan los límites establecidos por la UE para trigo duro de 1750 µg/kg.

Este resultado es consistente con lo esperado, dada la presencia de esta micotoxina, de forma anual, en los cultivos de trigo en el país. Las concentraciones

son variables año a año, formando parte de la Evaluación de Calidad e Inocuidad de Trigo, realizado por el MGAP para la determinación de la concentración de DON <sup>75</sup>. En el relevamiento correspondiente al informe de la zafra 2017/2018 <sup>76</sup>, la concentración media obtenida para esta micotoxina fue de 580 µg/kg, mientras que la obtenida por este experimento fue de 1314 µg/kg. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diferencias en el muestreo, así como en el método analítico empleado para su determinación, siendo el método empleado por el MGAP, una prueba cuantitativa de ELISA (Veratox® DON 5/5) <sup>76</sup>.

En cuanto a las variables acetiladas de DON, no se detectaron muestras con 15ADON en las condiciones evaluadas y una única muestra presentó 3ADON en bajas concentraciones. Si bien es consistente que las formas acetiladas se encuentren ausentes o con menor frecuencia en comparación a DON, la presencia de una muestra con 3ADON, cuando dicho quimiotipo no fue detectado en las muestras llama la atención, indicando la necesidad de realizar otros estudios para verificar el hallazgo.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Palacios y colaboradores<sup>38</sup>, en muestras de trigo duro provenientes de la principal zona de producción de Argentina, en los años 2012 a 2014. El DON fue la micotoxina predominante en un rango entre 50 µg/kg y 9480 µg/kg, con un 30% de las muestras con valores por encima del máximo establecido por el reglamento de la UE. Estos rangos son similares a los encontrados en este ensayo, con un menor porcentaje de muestras por encima de la regulación mencionada. A su vez, reportaron la detección de 3ADON y 15ADON, en niveles bajos de concentración.

En muestras de trigo uruguayo recolectadas en los años 2001 y 2002, se detectó DON en concentraciones que variaron entre 1300 y 13000 µg/kg y 1600 y 19000 µg/kg, respectivamente <sup>77</sup>.

Tomando en cuenta la diversidad de huéspedes de las especies asociadas a FE, se ha reportado contaminación con DON en granos de cebada y maíz, a concentraciones comparables a las obtenidas en este estudio. En cebada, a partir de 89 muestras de granos provenientes de la región noroeste de Uruguay, durante la temporada de crecimiento 2016/2017, DON fue detectado en el 90% de las muestras en un rango de concentración entre <LOQ y 3740 µg/kg, con un 31% de muestras excediendo el límite máximo de 1250 µg/kg en grano establecido por la UE <sup>78</sup>. En maíz, en muestras recolectadas de la principal zona productora al suroeste de

Uruguay, en los años 2018 ( $n=94$ ) y 2019 ( $n=58$ ), se detectó DON en el 52 y 46% de las muestras respectivamente. Las concentraciones variaron en el rango de 59 a 2471  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 2018 y entre 59 y 922  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en 2019 <sup>79</sup>.

Estos resultados concuerdan con el riesgo alto de exposición a DON a través del consumo de granos contaminados, demostrando la relevancia de los monitoreos y relevamientos del perfil micotoxigénico circulante asociado a la FE, para mantener la inocuidad alimentaria.

#### **4.2.1.2 ZEA**

La presencia de ZEA fue detectada en un 8% de las muestras, con un 7% en concentraciones entre 726 y 5193  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Si bien la ZEA no está regulada en trigo en nuestro país, si lo está en maíz, con un límite máximo de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , según el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional y en trigo integral en la regulación de Brasil (Tabla 4). Las concentraciones encontradas exceden entre 4 a 25 veces el límite establecido, indicando un riesgo elevado asociado al consumo de trigo contaminado con esta micotoxina, por sus características estrogénicas y potenciales efectos nocivos en la salud humana y animal <sup>21,27</sup>.

En 2009 y 2010, Calori-Dominguez y colaboradores reportaron en muestras de trigo provenientes de las regiones productoras de Brasil una incidencia de ZEA de 85% y 27%, respectivamente. La concentración media fue mayor en 2009 (142  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) que en 2010 (22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), mientras que reportes previos para la región habían demostrado ausencia de esta micotoxina <sup>80</sup>.

En granos de cebada nacional, los resultados difieren de los observados en este estudio, donde el 9% de las muestras presentaron ZEA, con una concentración entre 46 y 131  $\mu\text{g}/\text{kg}$  <sup>78</sup>.

Los resultados observados en este estudio son similares a los encontrados por Palacio y colaboradores, en maíz uruguayo donde en el año 2018 se detectó ZEA a una concentración entre 30 y 2522  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sin embargo, en el 2019 se observaron niveles de concentración menores entre 30 y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  <sup>79</sup>.

En Brasil, un relevamiento realizado por Oliveira y colaboradores en los años 2012 y 2013 detectó contaminación de maíz por ZEA en el 73,6% de las muestras analizadas con concentraciones de hasta 5088  $\mu\text{g}/\text{kg}$  <sup>73</sup>. Estudios previos realizados en Brasil habían determinado contaminaciones de ZEA en 95% de las muestras, con concentraciones entre 1,8 y 99,0  $\text{mg}/\text{kg}$  <sup>81</sup>. Esto no coincide con los hallazgos de

Oliveira, donde se determinó una menor frecuencia de muestras con micotoxina, pero con niveles de contaminación de ZEA mayores <sup>73</sup>.

La variación de resultados de un año a otro y de acuerdo con el cultivo, podrían indicar la influencia de las condiciones climáticas en la producción de esta toxina, y de la distribución de las especies productoras de ZEA.

Los resultados de ZEA en los granos de trigo analizados, constituye, hasta donde tenemos conocimiento, el primer reporte de esta micotoxina en este cereal. Considerando que nuestro país no ha establecido un nivel máximo para este contaminante en trigo sería necesario realizar monitoreos en las diferentes regiones productivas y en diferentes zafras para generar información que permita diagnosticar la necesidad de fijar dichos límites.

#### **4.2.1.3 NIV**

Otro hallazgo importante es la presencia de NIV en un 13% de las muestras. No hay regulaciones establecidas para esta micotoxina, pero como se mencionó en el Capítulo Introducción, su toxicidad es mayor a la de DON <sup>5,27</sup>. Si bien las concentraciones detectadas fueron bajas, entre 31 y 66 µg/kg, estos resultados demuestran la potencial aparición de cultivos contaminados con esta micotoxina, en particular en momentos donde las condiciones favorezcan a las especies productoras de NIV frente a otras.

En Uruguay, no se tiene constancia de reportes previos de NIV en trigo en el país, constituyendo este estudio un punto de partida para futuros relevamientos del contenido de esta micotoxina. Recientemente fue reportado en muestras de maíz, donde se detectó con una prevalencia de 5% y en un rango de concentración de 50 a 84 µg/kg<sup>79</sup>.

A nivel regional, se reportó NIV en Brasil, para muestras de trigo provenientes de las mayores regiones productoras del país en 2009, un 50% de muestras con valores de NIV superior a 100 µg/kg, alcanzando concentraciones de hasta 1329 µg/kg <sup>80</sup>.

A nivel mundial, los reportes de contaminación de trigo con NIV corresponden principalmente a países europeos. Entre 2009 y 2010, en Italia, el trigo recolectado presentó casi 100% de prevalencia con concentraciones entre 348 y 652 µg/kg. En Suecia los niveles de contaminación de trigo con NIV oscilaron entre 39 a 111 µg/kg, entre 2009 y 2011 <sup>82</sup>.

La detección de NIV en cultivos de trigo nacional, así como reportes regionales de concentraciones variables de la misma, llegando a concentraciones que superan los 1000 µg/kg, contribuyen a la necesidad de implementación de esta micotoxina en los programas de monitoreo, así como al establecimiento de regulaciones para la misma tanto nacional como mundial.

#### **4.2.1.4 Co-detección**

Los resultados de este estudio muestran co-detección de ZEA o NIV con DON en todas las muestras, con la excepción de una muestra donde sólo NIV fue detectado (Figura 22). Esto es consistente con hallazgos relevados en la bibliografía.

En varios de los estudios previamente mencionados, se reportó la co-detección de DON y ZEA, DON y NIV, así como de las tres micotoxinas, en muestras de trigo. En Brasil, se reportó para los años 2009 y 2010, porcentajes de co-detección para DON+NIV de 3,8% y 11%, DON+ZEA de 11% y 14%, y ZEA+DON+NIV, de 74% y 12% respectivamente <sup>80</sup>. En el 2008, en el sur de Brasil se detectaron tanto DON como NIV, co-ocurriendo predominantemente en todas las localidades <sup>83</sup>.

#### **4.2.2 Evaluación por cultivar**

Se evaluaron 16 cultivares de trigo, los cuales presentan diferente susceptibilidad a la FE, variando desde susceptibles a moderadamente resistentes.

A partir de los datos de la Tabla 16, se desprende que los cultivares con moderada susceptibilidad, presentan el mayor número de muestras con presencia de micotoxinas y concentraciones elevadas de DON. A su vez, estos presentaron niveles aumentados de ZEA y co-detección de las micotoxinas DON, ZEA y NIV.

Hay excepciones, como el cultivar G 2366, el cual es moderadamente resistente a FE, pero presentó niveles elevados de contaminación tanto para DON como ZEA. Estos valores pueden atribuirse a un mal manejo del cultivo frente a FE, o al ser una variable menos susceptible, puede haberse retrasado el inicio de la enfermedad, pero luego de iniciada, desarrollar niveles altos de micotoxina, entre otras posibilidades. Es también importante resaltar el número de muestras reducido para este cultivar, no siendo representativo de las características de este en la evaluación de la enfermedad y contenido de micotoxinas asociado.

Un 43% de las muestras analizadas, correspondientes al cultivar mayoritario Algarrobo, presentó DON a concentraciones que superan los límites máximos

establecidos por el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional, conteniendo a su vez niveles elevados de ZEA.

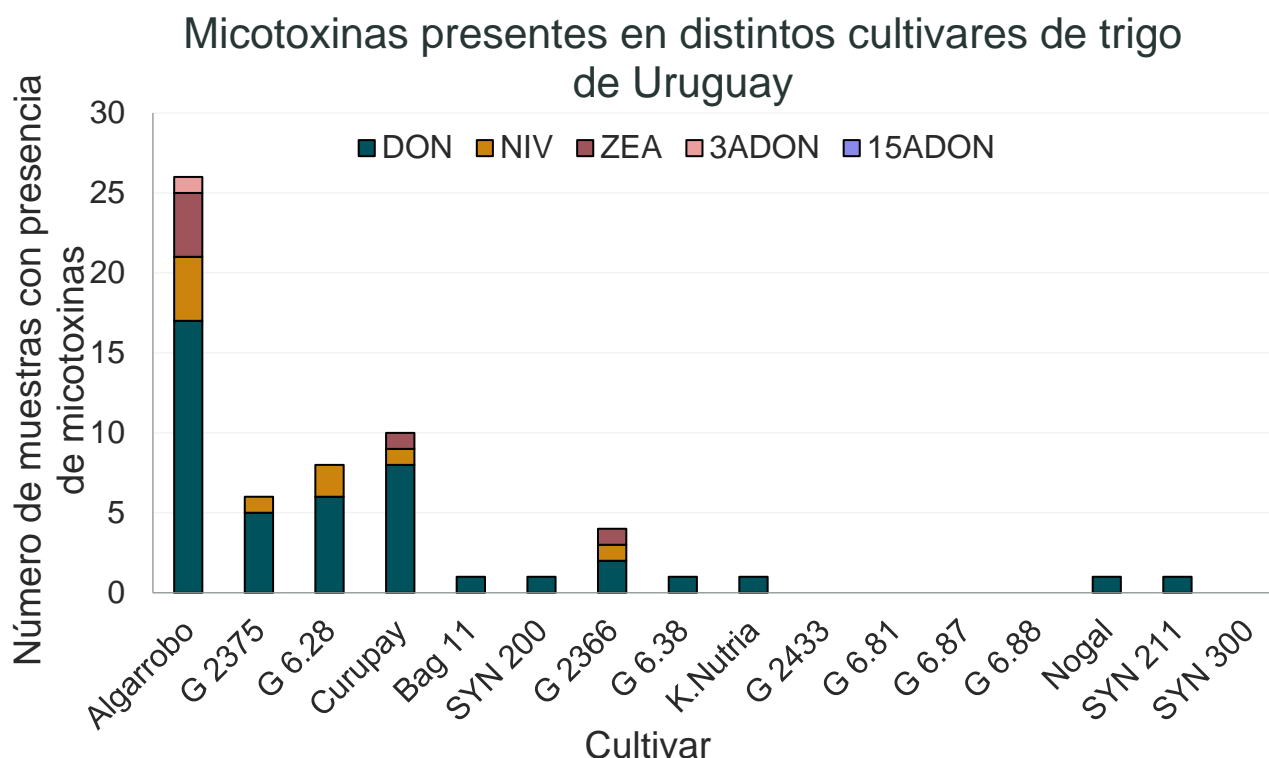
Los resultados de este estudio, si bien son preliminares y no constituyen una evaluación balanceada de los cultivares, son consistentes con hallazgos previos, donde los niveles más altos de enfermedad y contenido de DON fueron observados para los cultivares susceptibles, mientras que los moderadamente resistentes a moderadamente susceptibles tuvieron las menores incidencias y severidades de FE, con menor porcentaje de grano infectado <sup>77</sup>.

Cultivar de trigo	N° total de muestras	N° muestras con micotoxinas	Micotoxina encontrada	Rango de concentración (µg/kg)	Susceptibilidad a FE
<b>Algarrobo</b>	20	17	DON	179 - 10507	Moderada susceptible
		4	NIV	37 - 44	
		4	ZEA	726 - 5193	
		1	3ADON	67	
<b>G 2375</b>	11	5	DON	130 - 1384	Moderada resistente
		1	NIV	55	
<b>G 6.28</b>	11	6	DON	103 - 797	Moderada susceptible
		2	NIV	31 - 66	
<b>Curupay</b>	9	8	DON	102 - 850	Moderada susceptible
		1	NIV	49	
		1	ZEA	104	
<b>Bag 11</b>	4	1	DON	1153	Moderada susceptible
<b>SYN 200</b>	3	1	DON	261	Moderada susceptible
<b>G 2366</b>	2	2	DON	798 - 8711	Moderada resistente
		1	NIV	61	
		1	ZEA	3399	
<b>G 6.38</b>	2	1	DON	176	Moderada susceptible
<b>K.Nutria</b>	2	1	DON	419	Moderada resistente
<b>G 2433</b>	1	-	-	-	-
<b>G 6.81</b>	1	-	-	-	Moderado susceptible
<b>G 6.87</b>	1	-	-	-	Moderada resistente
<b>G 6.88</b>	1	-	-	-	-
<b>Nogal</b>	1	1	DON	1423	Susceptible
<b>SYN 211</b>	1	1	DON	352	Moderada susceptible
<b>SYN 300</b>	1	-	-	-	Susceptible

**Tabla 16** - Resultados de muestras de trigo de zafra 2018 ordenados con respecto al cultivar, indicando número total de muestras, número de muestras con presencia de micotoxinas, micotoxina encontrada, rango de concentración y susceptibilidad del cultivar a FE.

La Figura 23 ilustra el número de muestras en las cuales se detectó presencia de micotoxinas según el cultivar, indicando cuál de ellas fue encontrada. De los datos se desprende la mayor prevalencia de contaminación de los cultivares moderadamente susceptibles, como Algarrobo, Curupay y G 6.28, mientras que la mayoría de los

moderadamente resistentes presentaron prevalencias menores (G 2375. K. Nutria, G 6.87).



**Figura 23** - Número de muestras con presencia de micotoxinas según los distintos cultivares de trigo de Uruguay.

Se evaluaron los resultados estadísticamente empleando una prueba ANOVA, tomando los resultados obtenidos para los cuatro cultivares con mayor número de muestras, Algarrobo, Curupay, G 2375 y G 6.28. Se obtuvo un valor de F de 4.0, con un valor crítico para F de 2.8, permitiéndonos rechazar la hipótesis nula, concluyendo que existen diferencias significativas entre los cultivares de trigo con respecto al contenido de DON. Los resultados del ANOVA se presentan en el anexo IV.

#### **4.2.3 Evaluación según departamento**

El muestreo fue realizado teniendo en cuenta las zonas de nuestro país con la mayor producción de trigo. De esta forma se obtuvieron muestras de los departamentos de Soriano, Colonia, Río Negro y Paysandú que comprenden el 75% del área de cultivo además de con una menor superficie en San José, Flores y Florida.

Los datos de la Tabla 17 evidencian que el mayor número de muestras proviene de Soriano, en las cuales se detectaron cuatro de las cinco micotoxinas, con un

predominio de DON, en un rango amplio de concentraciones. El 29% de las muestras presentaron concentraciones de DON por encima de los límites máximos establecidos por el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional para harinas. Se observa también la mayor cantidad de muestras con detección de ZEA, en concentraciones elevadas, de 3 a 9 veces el límite máximo establecido por la regulación nacional. Además, en 3 de estas muestras se detectó NIV, dos de ellas junto con DON, aunque en concentraciones por debajo del límite máximo, y una fue detectada junto con DON y ZEA, ambas en concentraciones muy por encima del límite máximo (5298 µg/kg y 1852 µg/kg, respectivamente).

Localidad	N° total de muestras	N° de muestras con micotoxinas	Micotoxina	Concentración (µg/kg)
<b>Soriano</b>	28	21	DON	130-10507
		3	NIV	31-39
		1	3ADON	67
		4	ZEA	726-5193
<b>Flores</b>	15	9	DON	103-1827
<b>San José</b>	9	4	DON	141-1384
		3	NIV	44-66
<b>Rio Negro</b>	8	4	DON	179-871
		1	NIV	61
		1	ZEA	3399
<b>Colonia</b>	5	3	DON	102-850
		1	NIV	49
		1	ZEA	104
<b>Paysandú</b>	4	3	DON	208-783
		1	NIV	48
<b>Florida</b>	2	-	-	-

**Tabla 17** - Número de muestras analizadas y rango de concentración detectado para cada micotoxina según la localidad en las muestras de trigo de la zafra 2018, así como el porcentaje de muestras que superan los límites máximos establecidos por el Decreto N°155/006.

El segundo departamento en relación con número de detecciones fue Flores con un 60% de muestras con presencia de DON, 20% de las cuales contenían niveles superiores al límite máximo establecido en Uruguay <sup>48</sup>.

San José y Río Negro presentaron prevalencias similares de contaminación por DON, con un 44 y 50% cada uno. En cada caso, sólo una muestra superó el límite máximo de 1000 µg/kg. Río Negro a su vez, presentó una muestra con ZEA, con valor elevado de 3399 µg/kg, la cual se detectó en conjunto con DON a una concentración de 8711 µg/kg y NIV a 61 µg/kg. En San José, tres muestras presentaron NIV, en concentraciones bajas, dos de las cuales se detectaron junto con DON, sólo una de ellas superando el límite máximo establecido.

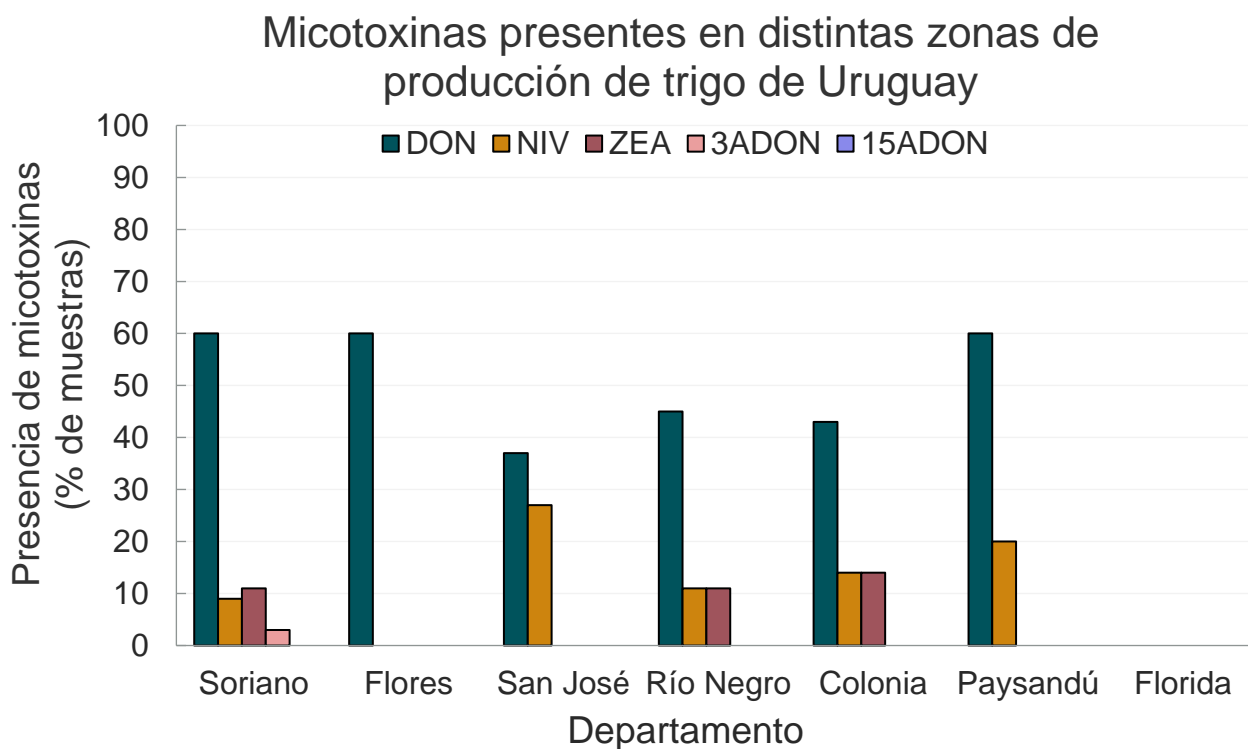
Se detectó DON en el 60 y 75% de las muestras de Colonia y Paysandú respectivamente, cumpliendo con los valores máximos establecidos por el Decreto N°155/006. En Colonia, una de las muestras donde se detectó DON presentó NIV, y otra DON y ZEA. Para Paysandú, en ninguna de las muestras se detectó ZEA, y sola una presentó NIV, en conjunto con DON.

No se detectaron micotoxinas en las 2 muestras evaluadas de Florida.

Remitiéndonos a la Tabla 15, podemos observar que el 50% de las muestras corresponden a cultivares moderadamente susceptibles (Algarrobo y Curupay). Esto se podría relacionar con los valores de micotoxinas obtenidos para ese departamento, donde prevalecen cultivos que, dadas las condiciones apropiadas, presentan susceptibilidad a la FE y producción de micotoxinas. Algo similar puede observarse en Flores, donde las concentraciones de DON que superan los límites establecidos por el Decreto N°155/006 son cultivares moderadamente susceptibles (Algarrobo y Bag 11) o susceptibles (Nogal).

La Figura 24 muestra el porcentaje de muestras en las cuales se detectó micotoxina de acuerdo con el departamento de producción, dejándose ver nuevamente el predominio de DON, y en particular la variabilidad de micotoxinas encontradas en cada uno de ellos. Como era de esperar por el número de muestras analizado, Soriano presenta una mayor variabilidad de micotoxinas detectadas, seguido por Río Negro y Colonia.

Los datos del relevamiento de micotoxinas por departamento nos permiten evaluar la distribución de estas en las distintas zonas de cultivo, previendo así potenciales contaminaciones de cultivos futuros por dichas toxinas.



**Figura 24** - Porcentaje de muestras con presencia de micotoxinas en las distintas zonas de producción evaluadas.

Dada la prevalencia del DON en las muestras evaluadas, se realizó una prueba ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre el contenido de esta micotoxina y su procedencia (ver Anexo V). Se tomaron todos los datos, conformando 7 grupos distintos, uno por cada departamento. El valor de F obtenido fue de 0,82, con un valor crítico para F de 2,2, por lo que se acepta la hipótesis nula. No hay diferencias significativas entre la localidad y el contenido de DON.

#### **4.2.4 Evaluación según quimiotipo**

Los quimiotipos evaluados por la Cátedra de Microbiología fueron 15ADON, 3ADON y NIV. Dentro de las cepas asociadas al CEFEG, al 96,4% se detectó la presencia del quimiotipo 15ADON y un 3,6% presentó el quimiotipo NIV, no detectándose el quimiotipo 3ADON. En un 17% de las muestras no se pudo determinar la presencia de un quimiotipo <sup>14</sup>.

La prevalencia del quimiotipo 15ADON, concuerda con resultados anteriores de cepas de Uruguay, así como de aislamientos de *F. graminearum* s.s. en Brasil y Argentina. En estas regiones también se ha encontrado quimiotipo NIV en trigo y cebada, con frecuencias bajas. Si bien el quimiotipo NIV se había encontrado en

investigaciones anteriores en nuestro país, no se había detectado la micotoxina en muestras de trigo <sup>3,50,77</sup>.

En las muestras que presentaron quimiotipo 15ADON, se determinaron las micotoxinas DON, ZEA y NIV, con una prevalencia de 64, 8 y 6% respectivamente, estando las concentraciones de DON por encima de límite máximo establecido por el Decreto N° 155/006, en un 17% de las muestras.

A su vez, seis muestras presentaron quimiotipo 15ADON y NIV, encontrando las micotoxinas DON y NIV en el 50% de las muestras, dos de ellas presentando co-detección. Dos de las muestras presentaron niveles de DON por encima de los límites máximos para harinas según el decreto nacional.

Las muestras a las que no se detectó ningún quimiotipo evaluado presentaron una prevalencia de 67% para DON, 25% para NIV, 17% para ZEA y 8% para 3ADON. Las concentraciones de DON superaron los límites máximos en 25% de las muestras. Dos de ellas presentaron a su vez valores elevados de ZEA. Ambas muestras pertenecen al cultivar Algarrobo y presentaron concentraciones entre 4062 y 5298 µg/kg de DON y 1809 y 1852 µg/kg de ZEA.

Quimiotipo	N ° total de muestras	Micotoxina (N ° muestras con micotoxina)
<b>15ADON</b>	53	DON (35)
		ZEA (4)
		NIV (3)
<b>15ADON+NIV</b>	6	DON (3)
		NIV (3)
<b>SIN DETERMINAR</b>	12	DON (8)
		NIV (3)
		ZEA (2)
		3ADON (1)

**Tabla 18** - Información de la cantidad de muestras según su quimiotipo, micotoxina presente y números de muestras con presencia de micotoxinas.

Estudios anteriores realizados en el país a 103 aislamientos de *F. graminearum* s.s. provenientes de muestras de trigo, identificaron 102 de las muestras con el quimiotipo 15ADON y una sola con el quimiotipo NIV. Confirmaron que los aislamientos genéticamente identificados como 15ADON, todos eran productores de DON, con 41

cepas siendo a su vez productoras de 15ADON. El aislado con genotipo NIV no produjo ninguna micotoxina en las condiciones evaluadas <sup>50</sup>.

Los resultados de la investigación mencionada en el párrafo anterior apoyan los hallazgos observados en los resultados de este trabajo, donde frente a un predominio de quimiotipo 15ADON, la micotoxina producida de forma mayoritaria fue DON.

En cuanto al NIV, la baja frecuencia de detección de este coincide con hallazgos previos en el país y la región, como se mencionó previamente. Las bajas concentraciones detectadas en este estudio podrían relacionarse a una menor agresividad de las especies productoras de esta micotoxina, en relación con las otras presentes en la muestra. No deja de ser preocupante el hallazgo de cepas productoras de NIV y su cuantificación en cultivos, dado que, bajo las condiciones adecuadas, la acumulación de NIV puede incrementarse, aumentando el riesgo al consumir alimentos contaminados con ella.

### **4.3 Evaluación de estrategias de manejo de FE y su efecto en el contenido de micotoxinas.**

Con el fin de valorar distintas formas de manejo de la FE, se plantearon ensayos a campo evaluando distintas herramientas disponibles para su control, comparando dichas estrategias en función del contenido de micotoxinas en el grano. El ensayo a campo fue realizado por investigadores de INIA, como parte de la tesis de posgrado de Leydi Sevillano. Las estrategias de manejo consideradas fueron la resistencia del cultivar de trigo a FE, la aplicación de tratamientos antifúngicos y el momento de aplicación de estos. Los ensayos fueron llevados a cabo en tres temporadas distintas (julio 2018, junio y julio 2019).

#### ***4.3.1 Muestras de Temporada 2018 (baja enfermedad)***

La temporada 2018 fue considerada de baja enfermedad, dado que las condiciones climáticas no fueron adecuadas para el desarrollo de esta. En la evaluación de las muestras se empleó el método 1, presentándose en la Tabla 19 los resultados de las 31 muestras evaluadas. Como la validación del método 1 no se pudo completar, catalogamos estos resultados como preliminares.

La micotoxina más prevalente fue el DON, presente en 21 de las muestras en un rango de concentración entre 320 y 1550  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , seguido por NIV en 13 muestras, a un nivel entre 320 y 530  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En 5 de las muestras, las concentraciones de DON estuvieron por encima del límite máximo establecido por el Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional para harinas de trigo, pero por debajo de los límites establecidos por la UE (1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) para trigo. No se detectó ZEA, 15ADON ni 3ADON.

Parcela	Cultivar	Fungicida	MOM	Concentración (µg/kg)				
				DON	3ADON	NIV	ZEA	15ADON
666	IDA	PROSARO	Z61	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND
667	2387	PROSARO	Z65	ND	ND	ND	ND	ND
668	2387	SWING PLUS	Z65	ND	ND	ND	ND	ND
669	IDA	SWING PLUS	Z61	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND
670	2387	PROSARO	Z71	ND	ND	ND	ND	ND
671	IDA	PROSARO	Z65	630	ND	380	ND	ND
672	2387	-	-	630	ND	ND	ND	ND
673	IDA	SWING PLUS	Z65	720	ND	320	ND	ND
674	2387	PROSARO	Z61	<LOQ	ND	ND	ND	ND
675	IDA	PROSARO	Z71	850	ND	530	ND	ND
676	IDA	-	-	1200	ND	<LOQ	ND	ND
677	2387	SWING PLUS	Z71	ND	ND	ND	ND	ND
678	IDA	SWING PLUS	Z71	910	ND	320	ND	ND
679	2387	SWING PLUS	Z61	ND	ND	ND	ND	ND
680	IDA	SWING PLUS	Z61	800	ND	460	ND	ND
681	2387	SWING PLUS	Z61	660	ND	ND	ND	ND
682	IDA	PROSARO	Z61	1130	ND	490	ND	ND
683	2387	SWING PLUS	Z65	320	ND	ND	ND	ND
684	2387	PROSARO	Z65	ND	ND	ND	ND	ND
685	IDA	SWING PLUS	Z71	1240	ND	380	ND	ND
686	2387	PROSARO	Z61	<LOQ	ND	ND	ND	ND
687	IDA	SWING PLUS	Z65	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND
688	IDA	PROSARO	Z65	320	ND	ND	ND	ND
689	IDA	PROSARO	Z71	700	ND	ND	ND	ND
690	2387	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
691	2387	SWING PLUS	Z71	ND	ND	ND	ND	ND
692	IDA	-	-	1550	ND	<LOQ	ND	ND
693	2387	PROSARO	Z71	<LOQ	ND	ND	ND	ND
694	IDA	PROSARO	Z71	1380	ND	ND	ND	ND
695	2387	PROSARO	Z61	ND	ND	ND	ND	ND
696	IDA	SWING PLUS	Z71	<LOQ	ND	<LOQ	ND	ND

**Tabla 19 - Resultados preliminares de la cuantificación de micotoxinas de Temporada 1 2018 según el método 1. MOM: Momento de aplicación, Z: Escala Zadoks. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras de concentración superior a los límites máximos establecidos (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).**

El cultivar susceptible (IDA) presenta mayor contenido de micotoxinas en comparación con la cepa moderadamente resistente (2387), estando dentro de lo esperado como se estableció en el capítulo anterior.

En cuanto a diferencias en el tratamiento antifúngico, las muestras que no recibieron tratamiento, con excepción de una muestra correspondiente al cultivar 2387, presentaron altos niveles de DON en comparación con las tratadas.

Para el cultivar 2387, no se detectó NIV en ningunas de las muestras, siendo DON cuantificado en concentraciones bajas para el tratamiento SWING PLUS.

Cultivar	MOM	Concentración media DON (µg/kg)		Concentración media NIV (µg/kg)	
		PROSARO	SWING PLUS	PROSARO	SWING PLUS
Génesis 6.87 (2378)	SIN	630		ND	
	Z61	<LOQ	330	ND	ND
	Z65	ND	160,00	ND	ND
	Z71	<LOQ	ND	ND	ND
INIA Don Alberto (IDA)	SIN	1375		<LOQ	
	Z61	515	350	195	180
	Z65	475	310	190	110
	Z71	977	750	265	267

**Tabla 20** - Concentraciones medias obtenidas para DON y NIV, de acuerdo con el cultivar, tratamiento antifúngico, y momento de aplicación de este (MOM) según escala de Zadoks, para las muestras de Temporada 1 del 2018, evaluadas con el método 1.

#### 4.3.2 Muestras de la Temporada 2019 (enfermedad intermedia y alta)

Un total de 84 muestras de la temporada 2019 fueron evaluadas empleando el método 2, 56 correspondientes a la temporada de alta enfermedad (temporada 1) y 28 provenientes de la temporada de enfermedad intermedia (temporada 2).

Las concentraciones de micotoxinas encontradas se presentan en las tablas 21 (temporada 1) y 22 (temporada 2), respectivamente. En ellas se exponen los resultados de acuerdo con el cultivar, tratamiento fungicida y momento de aplicación.

Parcela	Cultivar	Fungicida	MOM	Concentración (µg/kg)				
				DON	3ADON	NIV	ZEA	15ADON
1	2387	-	-	6303	108	<LOQ	405	222
2	IDA	SWING PLUS	Z61	6255	94	ND	<LOQ	157
3	2387	PROSARO	Z65	2550	ND	42	ND	87
4	2387	PROSARO	Z71	3661	80	ND	ND	125
5	IDA	-	-	20950	356	246	377	561
6	IDA	SWING PLUS	Z71	14999	313	ND	180	548
7	IDA	PROSARO	Z71	9101	236	119	ND	ND
8	IDA	SWING PLUS	Z65	6933	110	48	122	179
9	IDA	PROSARO	Z65	7030	129	ND	<LOQ	197
10	2387	SWING PLUS	Z71	3632	72	<LOQ	<LOQ	136
11	2387	SWING PLUS	Z65	1673	41	ND	ND	77
12	2387	PROSARO	Z61	3491	81	ND	ND	162
13	2387	SWING PLUS	Z61	2065	ND	ND	ND	80
14	IDA	PROSARO	Z61	5091	62	ND	ND	ND
15	IDA	PROSARO	Z61	8452	140	<LOQ	ND	250
16	IDA	SWING PLUS	Z61	7661	126	ND	<LOQ	192
17	IDA	-	-	14620	261	112	130	414
18	2387	SWING PLUS	Z61	3171	67	<LOQ	ND	133
19	2387	SWING PLUS	Z65	2342	51	ND	ND	88
20	2387	PROSARO	Z61	4839	79	ND	ND	156
21	IDA	PROSARO	Z65	6017	108	ND	<LOQ	198
22	IDA	SWING PLUS	Z65	7099	128	ND	<LOQ	238
23	2387	-	-	6642	87	ND	ND	185
24	2387	SWING PLUS	Z71	4446	60	ND	ND	130
25	IDA	SWING PLUS	Z71	9047	212	136	617	ND
26	2387	PROSARO	Z71	2579	47	ND	ND	105
27	IDA	PROSARO	Z71	11752	176	122	<LOQ	305
28	2387	PROSARO	Z65	2279	44	ND	ND	94
29	IDA	SWING PLUS	Z71	6348	ND	65	<LOQ	194
30	2387	PROSARO	Z65	2329	42	ND	<LOQ	88
31	IDA	PROSARO	Z71	16872	204	ND	263	444
32	IDA	PROSARO	Z61	10061	ND	ND	461	287
33	2387	SWING PLUS	Z71	6247	ND	<LOQ	<LOQ	227
34	IDA	-	-	26604	368	67	631	622
35	2387	PROSARO	Z71	3923	ND	<LOQ	134	150
36	2387	SWING PLUS	Z65	4965	78	ND	ND	151
37	2387	PROSARO	Z61	5951	ND	ND	ND	220
38	2387	SWING PLUS	Z61	5658	ND	ND	ND	210
39	IDA	PROSARO	Z65	10517	136	38	ND	279
40	IDA	SWING PLUS	Z61	10920	ND	ND	<LOQ	322
41	2387	-	-	3368	ND	39	ND	177
42	IDA	SWING PLUS	Z65	8262	ND	80	599	158

44	2387	SWING PLUS	Z71	2319	40	44	ND	70
45	2387	SWING PLUS	Z65	1981	<LOQ	ND	ND	71
46	IDA	SWING PLUS	Z71	12658	181	94	307	ND
47	IDA	SWING PLUS	Z65	8127	ND	<LOQ	220	171
48	IDA	SWING PLUS	Z61	9524	132	49	867	231
49	IDA	PROSARO	Z71	4210	59	ND	ND	101
50	2387	PROSARO	Z65	3619	ND	36	ND	112
51	IDA	PROSARO	Z65	8857	ND	<LOQ	ND	ND
52	2387	PROSARO	Z61	2507	ND	<LOQ	<LOQ	88
53	2387	PROSARO	Z71	1865	<LOQ	<LOQ	ND	ND
54	2387	SWING PLUS	Z61	1508	<LOQ	ND	ND	ND
55	2387	SIN	SIN	5452	80	<LOQ	ND	ND
56	IDA	PROSARO	Z61	6285	ND	66	<LOQ	ND
57	IDA	SIN	SIN	11649	ND	153	ND	207

**Tabla 21** - Resultados de la cuantificación de micotoxinas del ensayo de temporada 1 2019. ND: no detectado, MOM: Momento de aplicación, Z: Escala Zadoks. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras de concentración superior al límite máximo establecido (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

Parcela	Cultivar	Fungicida	MOM	Concentración (µg/kg)				
				DON	3ADON	NIV	ZEA	15ADON
100	IDA	PROSARO	Z65	3498	69	58	ND	101
101	2387	SWING PLUS	Z71	1700	ND	ND	ND	59
102	IDA	SWING PLUS	Z61	4961	ND	80	ND	155
103	IDA	PROSARO	Z61	5965	108	43	<LOQ	164
104	IDA	SWING PLUS	Z71	6637	ND	159	ND	170
105	2387	SWING PLUS	Z65	1458	ND	ND	ND	68
106	2387	PROSARO	Z71	1615	ND	ND	ND	64
107	2387	PROSARO	Z61	2356	ND	ND	ND	72
108	IDA	PROSARO	Z71	9264	179	108	ND	254
109	2387	-	-	3687	ND	<LOQ	ND	133
110	2387	PROSARO	Z65	920	<LOQ	ND	ND	49
111	2387	SWING PLUS	Z61	601	ND	ND	ND	<LOQ
112	IDA	SWING PLUS	Z65	2634	ND	<LOQ	ND	63
113	IDA	-	-	10473	ND	38	ND	257
114	2387	-	-	2018	44	ND	ND	56
115	2387	PROSARO	Z61	1652	ND	ND	ND	41
116	2387	SWING PLUS	Z71	1099	ND	ND	ND	38
117	IDA	-	-	9536	161	114	ND	211
118	IDA	SWING PLUS	Z65	3887	ND	<LOQ	ND	90
119	IDA	SWING PLUS	Z61	3807	ND	57	ND	95
120	IDA	PROSARO	Z65	3560	ND	49	ND	85
121	IDA	PROSARO	Z61	5350	105	171	110	146
122	2387	PROSARO	Z65	513	ND	ND	ND	<LOQ
123	2387	SWING PLUS	Z61	758	ND	ND	ND	<LOQ
124	2387	SWING PLUS	Z65	1956	47	<LOQ	ND	70
125	2387	PROSARO	Z71	2174	ND	ND	ND	82
126	IDA	PROSARO	Z71	8650	172	106	ND	249
127	IDA	SWING PLUS	Z71	2777	ND	55	<LOQ	83

**Tabla 22** - Resultados de la cuantificación de micotoxinas del ensayo de temporada 2019. ND: no detectado, MOM: Momento de aplicación, Z: Escala Zadoks. En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras de concentración superior al límite máximo establecido (1000 µg/kg para DON y 200 µg/kg para ZEA).

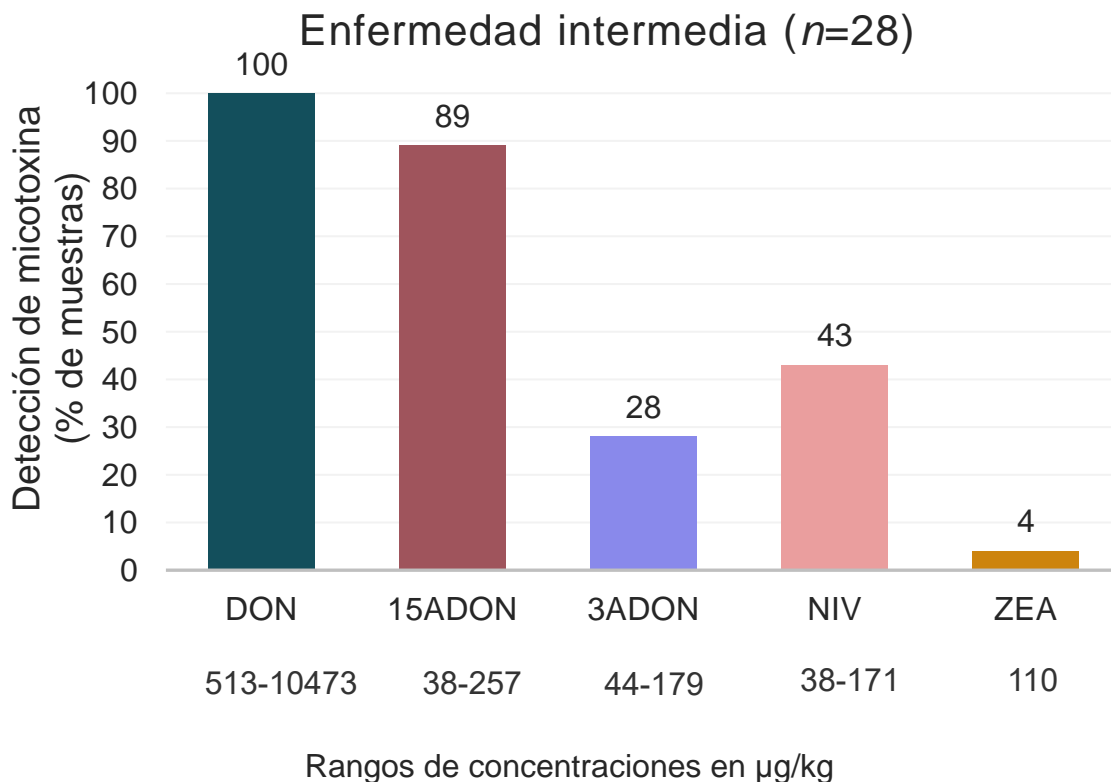
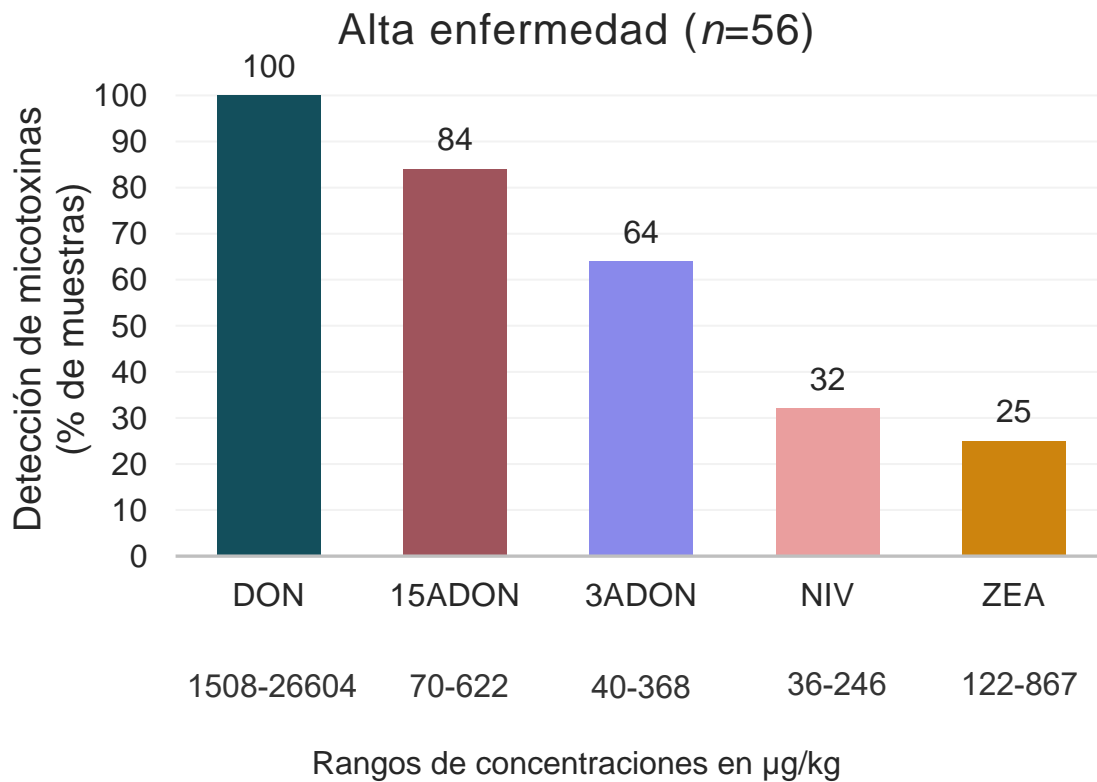
#### **4.3.2.1 Detección de micotoxinas**

En ambas temporadas se pudieron detectar las cinco micotoxinas. En la temporada de alta enfermedad se observó una prevalencia de 100% para DON, 64% para 3ADON, 84% para 15ADON, 32% para NIV y 25% para ZEA. En cuanto a la temporada de enfermedad intermedia, el porcentaje de detección fue de 100% para DON, 28% para 3ADON, 89% para 15ADON, 43% para NIV y 4% para ZEA.

Los rangos de concentración presentados en la Figura 25, permiten visualizar un nivel de contaminación más alto en la temporada de mayor enfermedad. Esta presentó concentraciones de DON por encima de 1000 µg/kg, el valor límite máximo según Decreto N°155/006 del Reglamento Bromatológico Nacional para harinas de trigo, en todas las muestras. El resto de las micotoxinas se encuentran por debajo del límite máximo establecido, con excepción de un 16% del total de muestras para ZEA, que estuvieron por encima de los 200 µg/kg.

En cuanto a la temporada de enfermedad intermedia, si bien las muestras presentaron concentraciones elevadas de DON, las concentraciones máximas son menores a las detectadas en la temporada de alta enfermedad. Aun así, un 86% de las muestras presentaron concentraciones por encima del límite máximo para DON. El resto de las micotoxinas estuvieron por debajo de los límites establecidos.

Se pudieron detectar las cinco micotoxinas en ambas temporadas de alta e intermedia enfermedad, con un alto porcentaje de co-detección en la misma muestra. En la temporada de alta enfermedad, la mayor co-detección fue entre DON y sus variables acetiladas, 15ADON y 3ADON, encontrándose éstas en un 36% de las muestras. Mientras que en la temporada de enfermedad intermedia la mayor prevalencia fue para DON y 15ADON, estando presentes en un 39% de las muestras.



**Figura 25** - Detección de las micotoxinas durante la temporada de intermedia y alta enfermedad, con sus rangos de concentración correspondiente en µg/kg.

#### ***4.3.2.2 Contenido de micotoxinas según estrategia de manejo de FE***

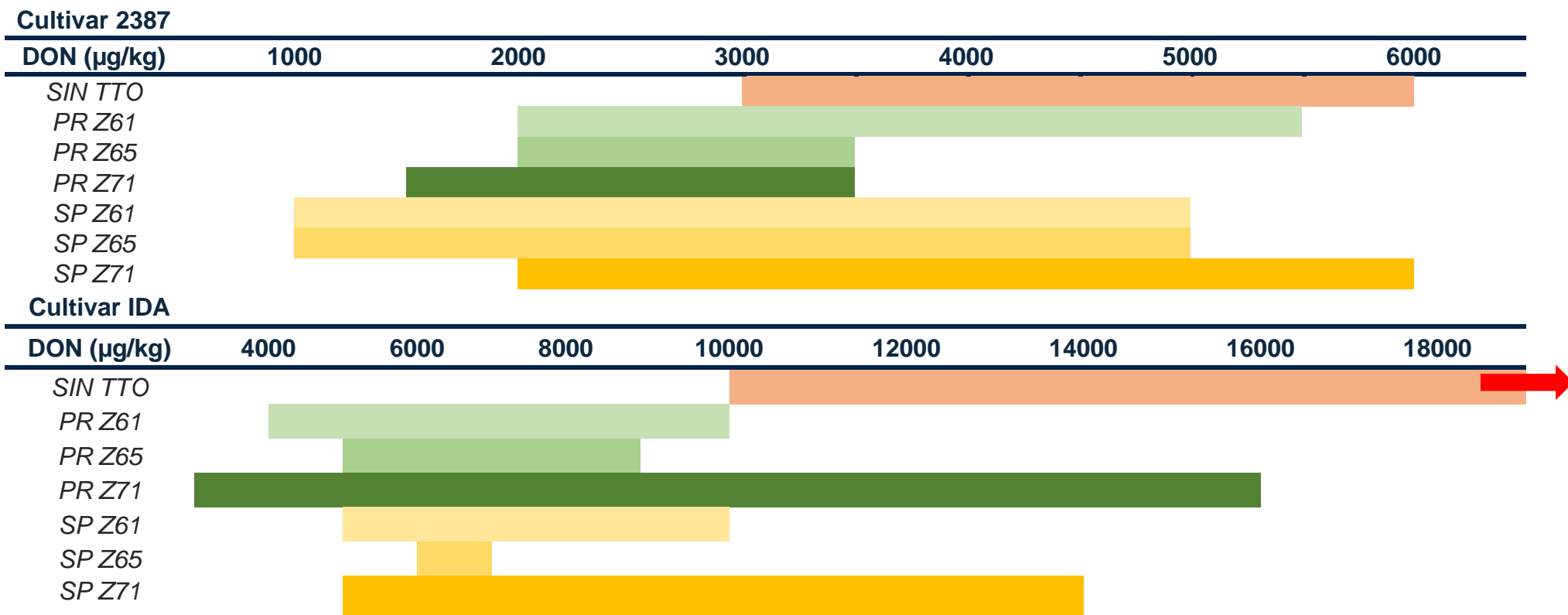
Para evaluar los efectos de las estrategias de manejo de la FE sobre el perfil de micotoxinas en granos de trigo, se realizaron los experimentos descritos en la sección 3.4.2. Los tratamientos con fungicidas empleados fueron seleccionados por ser los más recomendados en el país, siendo considerados de alta eficiencia para el control de esta enfermedad <sup>12</sup>.

A partir de la determinación de micotoxinas en las muestras obtenidas de los ensayos de manejo de FE se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 23. En ella se presentan el rango y la media de concentración de las micotoxinas detectadas en el estudio, correspondientes a la temporada de alta enfermedad, según el cultivar, el tratamiento con fungicidas y el momento de aplicación.

Todas las muestras presentaron una media de concentración de DON al menos un orden de concentración mayor que las demás micotoxinas evaluadas, seguido en concentración por la ZEA.

Cultivar	Tratamiento con fungicida	MOM	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		15 ADON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		3 ADON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		NIV ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		ZEA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
			Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango	Media	
Génesis 6.87 (2387)	Sin tratamiento	-	3368 - 6642	<b>5442</b>	149 - 222	<b>183</b>	80 - 108	<b>90</b>	39	<b>39</b>	405	<b>405</b>	
	Protioconazol + Tebuconazol (PROSARO)	Z61	2507 - 5951	<b>4197</b>	88 - 220	<b>157</b>	42 - 94	<b>74</b>	-	-	-	-	
		Z65	2279 - 3619	<b>2694</b>	87 - 112	<b>95</b>	42 - 57	<b>48</b>	36 - 42	<b>39</b>	-	-	
		Z71	1865 - 3923	<b>3007</b>	55 - 150	<b>109</b>	47 - 80	<b>65</b>	-	-	134	<b>134</b>	
	Metconazol + epoxiconazol (SWING PLUS)	Z61	1508 - 5658	<b>3101</b>	49 - 210	<b>118</b>	67 - 89	<b>78</b>	-	-	-	-	
		Z65	1673 - 4965	<b>2740</b>	71 - 151	<b>97</b>	41 - 78	<b>57</b>	-	-	-	-	
		Z71	2319 - 6247	<b>4161</b>	70 - 227	<b>141</b>	40 - 103	<b>69</b>	44	<b>44</b>	-	-	
	INIA Don Alberto (IDA)	Sin tratamiento	-	11649 - 26604	<b>18456</b>	207 - 622	<b>451</b>	133 - 368	<b>279</b>	67 - 246	<b>144</b>	130 - 631	<b>379</b>
		Protioconazol + Tebuconazol (PROSARO)	Z61	5091 - 10061	<b>7472</b>	136 - 287	<b>225</b>	62 - 140	<b>107</b>	66	<b>66</b>	461	<b>461</b>
Z65			6017 - 10517	<b>8105</b>	197 - 279	<b>218</b>	108 - 136	<b>124</b>	38	<b>38</b>	-	-	
Z71			4210 - 16872	<b>10484</b>	101 - 444	<b>283</b>	59 - 236	<b>169</b>	75 - 122	<b>105</b>	263	<b>263</b>	
Metconazol + epoxiconazol (SWING PLUS)		Z61	6255 - 10920	<b>8590</b>	157 - 322	<b>255</b>	94 - 150	<b>126</b>	49	<b>49</b>	867	<b>867</b>	
		Z65	6933 - 8262	<b>7605</b>	158 - 238	<b>186</b>	100 - 128	<b>110</b>	48 - 80	<b>64</b>	122 - 599	<b>314</b>	
		Z71	6348 - 14999	<b>10763</b>	194 - 548	<b>340</b>	79 - 313	<b>196</b>	65 - 136	<b>99</b>	180 - 617	<b>368</b>	

**Tabla 23** - Resultados del ensayo de diferentes estrategias de manejo de FE en cuanto al contenido de micotoxina para Temporada 1; el número total de muestras analizadas en cada uno de los experimentos es 4, MOM es el momento de aplicación, Z según escala de Zadoks.



**Figura 26** - Rango de concentración de DON (µg/kg) de acuerdo con el cultivar, tratamiento y momento de aplicación de fungicidas. PR= PROSARO, SP= SWING PLUS. La flecha roja indica que el rango de concentración se extiende más allá de la escala empleada.

## *Evaluación de los rangos y las medias de concentraciones de DON*

En la Figura 26 se representan los rangos de concentración de DON, según cultivar, tratamiento y momento de aplicación de fungicidas, mientras que en la Figura 27 se muestran las medias de concentración de DON.

### *Cultivares*

En relación con los cultivares se puede observar que para el cultivar IDA (el más susceptible) las medias de concentración de DON son de 2 a 3.5 veces más elevadas y presentan un rango más amplio de contaminación que para el cultivar 2387 (más resistente) cuando se comparan las mismas condiciones de tratamiento o las muestras testigo (Figuras 26 y 27). Incluso en las muestras sin tratamiento del cultivar 2387, el contenido medio de DON fue menor que para las muestras tratadas del cultivar IDA.

Las diferencias en el nivel de contaminación entre los cultivares refuerza los hallazgos observados en las muestras de la zafra 2018, donde los que tienen mayor resistencia a la infección presentaron menor contenido de micotoxinas.

### *Tratamiento con fungicidas*

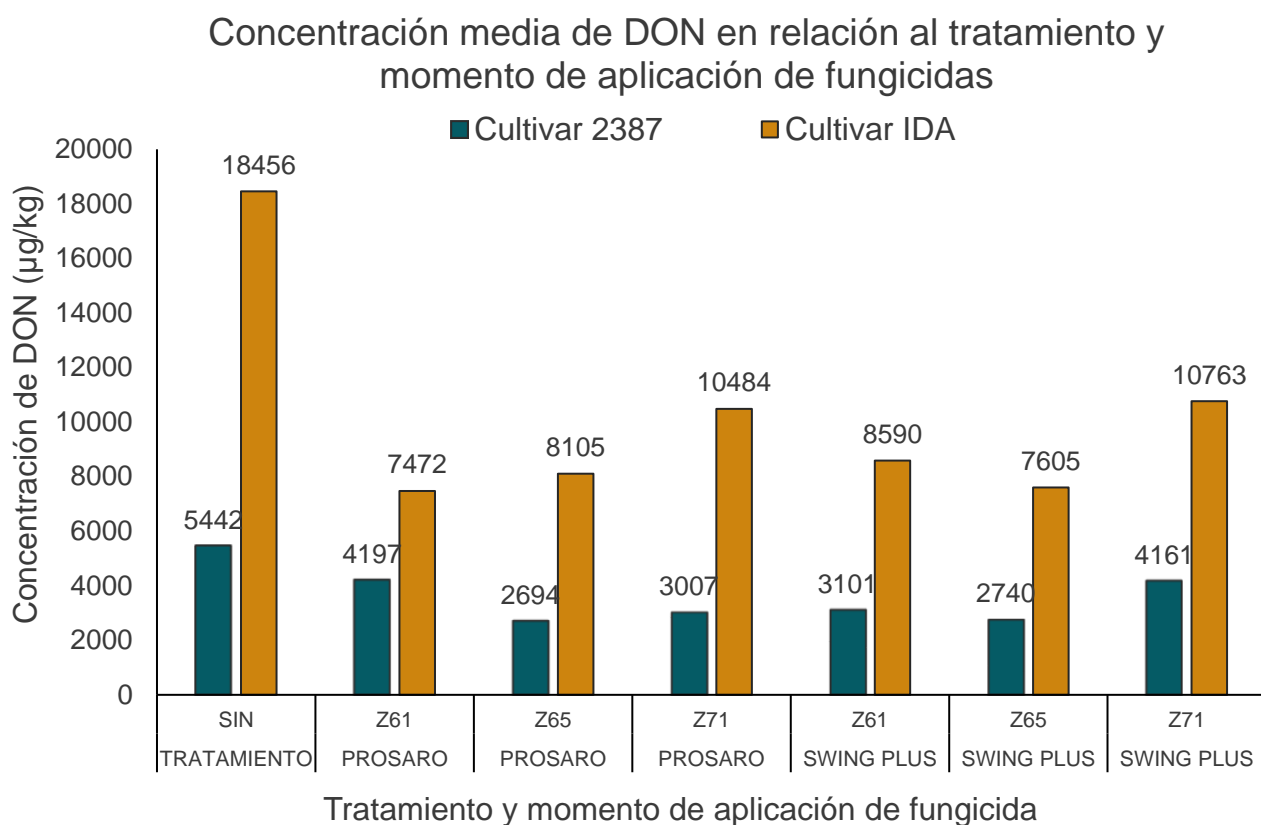
Como es esperado, las muestras sin tratamiento presentaron medias de concentraciones de DON mayores que las muestras tratadas (Figura 27).

Las muestras de trigo del cultivar IDA tratadas con fungicidas (PROSARO y SWING PLUS) presentaron rangos de concentración de DON más acotados y con valores menores con respecto a las muestras testigo. En cuanto al cultivar 2387, si bien los rangos de concentración fueron de valores menores en las muestras tratadas, estos se superponen con los rangos obtenidos para las muestras sin tratamiento. La mayoría de los resultados obtenidos presentaron niveles mínimos de DON en las muestras del cultivar IDA que se aproximan o superponen con los máximos niveles de concentración de las muestras del cultivar 2387, remarcando las diferencias de contaminación entre ambos cultivares.

### *Momento de aplicación de fungicida*

En las muestras tratadas tanto con PROSARO como SWING PLUS del cultivar IDA se aprecian rangos de concentración menores y más acotados en los momentos de aplicación Z61 y Z65. Para el día Z71 en ambos tratamientos, el rango de niveles de DON fue más amplio, abarcando además concentraciones mayores.

Para el cultivar 2387 tratado con PROSARO los momentos de aplicación Z65 y Z71 presentaron menores niveles de contaminación y un rango de concentraciones más acotado que los observados para el Z61. Para el tratamiento SWING PLUS, si bien se detectaron concentraciones menores en los días Z61 y Z65, las diferencias de contaminación con el Z71 no parecen reflejar la existencia de un momento de aplicación óptimo para este tratamiento en particular.



**Figura 27** - Comparación de la concentración media de DON con respecto a cultivar, tratamiento y momento de aplicación de fungicidas.

## ***Evaluación de los rangos y las medias de concentraciones de otras micotoxinas***

Las concentraciones de otras micotoxinas evaluadas son al menos un orden de magnitud menores que las observadas para el DON. En la Figura 28 se presentan las medias de concentración para 15ADON, 3ADON, NIV y ZEA, según cultivar, tratamiento con fungicidas y momento de aplicación de este.

Como es esperado, las muestras sin tratamiento presentan concentraciones más altas de las micotoxinas para ambos cultivares, con excepción de ZEA para el cultivar IDA. Para este cultivar susceptible, se detecta la presencia de ZEA en altas concentraciones en las muestras con los dos tratamientos.

### ***Cultivares***

El cultivar 2387 presentó medias de concentraciones más bajas de micotoxinas que el IDA, incluso no detectándose estas micotoxinas en algunas muestras. Esto está dentro de lo esperado dada la moderada resistencia a la FE que presenta dicho cultivar.

Los derivados acetilados de DON (3ADON y 15ADON), se presentaron en ambos cultivares, con rangos de concentraciones del mismo orden, pero más acotados para el cultivar 2387.

El NIV fue detectado en concentraciones bajas, en su mayoría cercanas al LOQ del método, e incluso no detectándose en algunos de los tratamientos evaluados en el cultivar 2387.

Algo similar sucede con la ZEA, la cual fue detectada únicamente en dos muestras del cultivar 2387, con una de ellas (muestra sin tratamiento), superando los límites máximos establecidos previamente (Tabla 5). En cambio, en el cultivar IDA, se detectó ZEA en un mayor rango de concentraciones en comparación con el cultivar más resistente, con medias de concentración que superan los límites máximos mencionados (Tabla 5).

### ***Tratamiento con fungicidas***

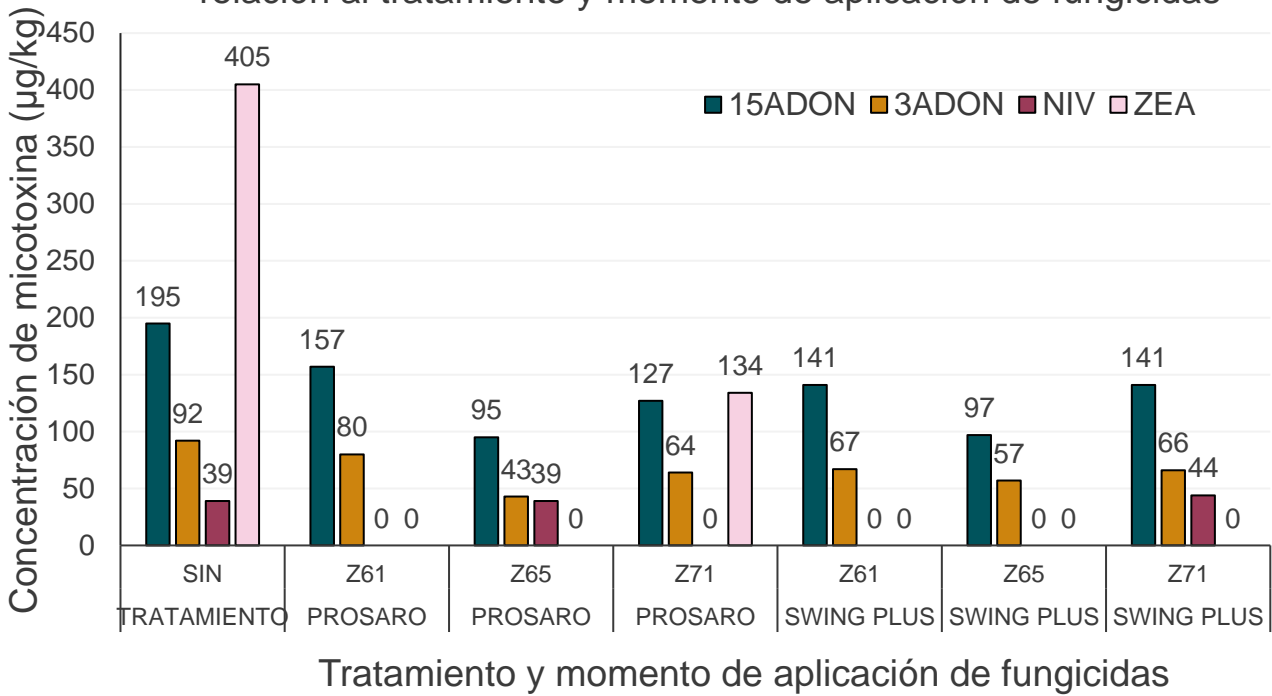
En el caso de la ZEA, los niveles de concentración más altos fueron detectados para muestras del cultivar IDA con tratamiento fungicida, superando una de ellas (SWING PLUS Z61) 2 veces los niveles observados para las muestras testigo. Para el cultivar 2387, no se detectó ZEA en las muestras tratadas, con la excepción de una muestra correspondiente al tratamiento PROSARO Z61, pero cuya concentración fue menor a la detectada en las muestras sin tratamiento.

Tanto 3ADON, 15ADON como NIV no demostraron diferencias notables en sus rangos de concentración entre los tratamientos con los dos fungicidas.

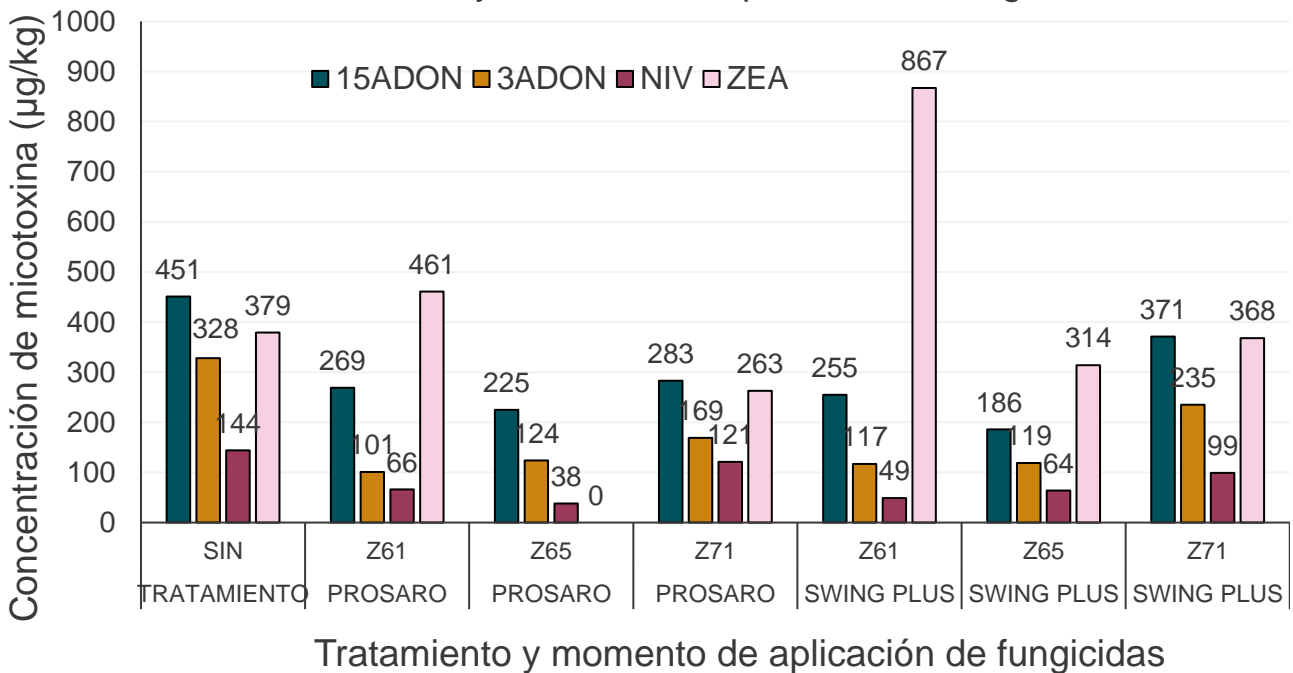
#### *Momento de aplicación*

Al igual que con los tratamientos con fungicidas, los resultados obtenidos para los diferentes momentos de aplicación no arrojaron evidencias de una mejor aptitud de uno u otro para el cultivar 2387. En el cultivar IDA, para las micotoxinas NIV, 3ADON y 15ADON puede observarse para el momento Z71 niveles de concentración de micotoxinas más altos en comparación con los otros momentos. Para la ZEA, el momento de aplicación con mayor contenido fue Z61.

Cultivar 2387 - Concentración media de micotoxina en relación al tratamiento y momento de aplicación de fungicidas



Cultivar IDA - Concentración media de micotoxina en relación al tratamiento y momento de aplicación de fungicidas



**Figura 28** - Comparativa de la concentración de 3ADON, 15ADON, NIV y ZEA, con respecto al cultivar, tratamientos antifúngicos y el momento de aplicación de estos.

### 4.3.3 Comparación resultados método 2 con ELISA AgraQuant DON

Considerando que, a nivel de producción, las técnicas de ELISA son las más empleadas para realizar el tamizaje o screening de micotoxinas, se propuso comparar los resultados de DON obtenidos a partir del método 2 mediante HPLC-MS/MS con el método ELISA AgraQuant utilizado en los ensayos agronómicos (sección 3.4.2 y 3.5.3).

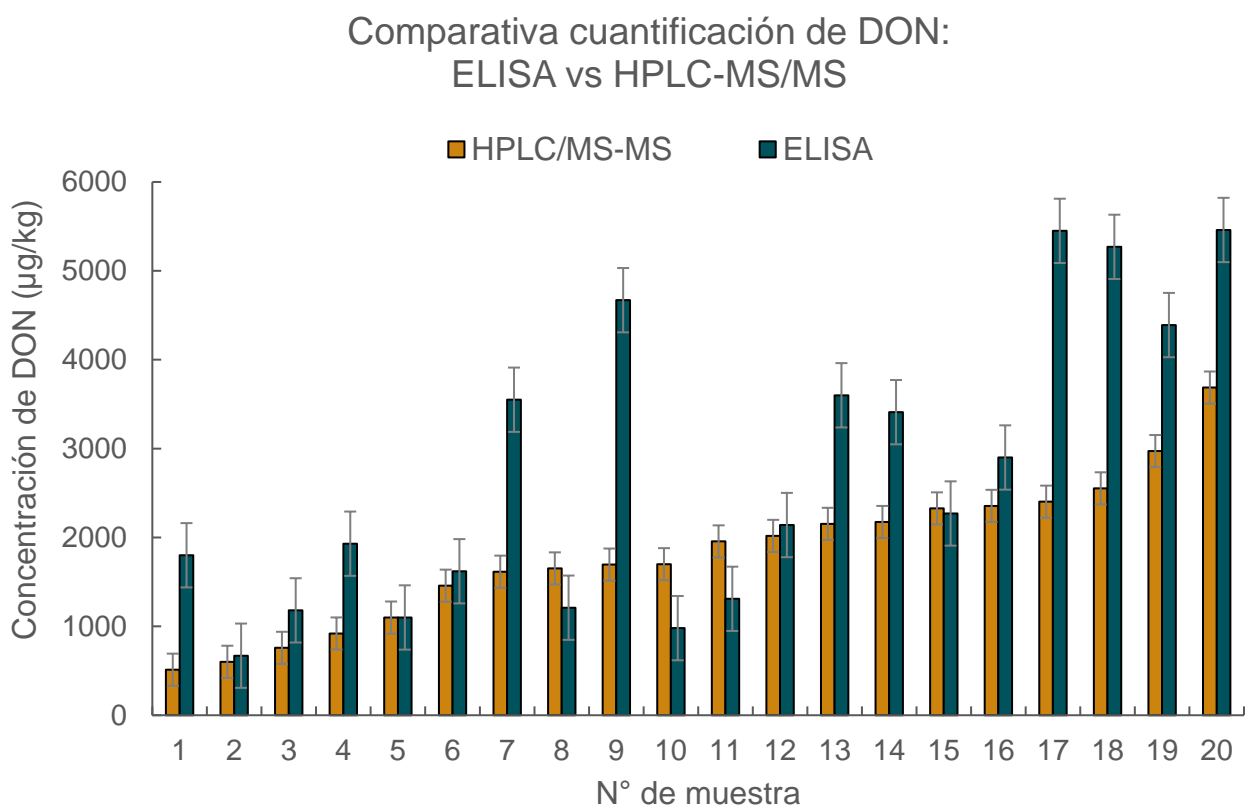
Se seleccionaron 20 muestras correspondientes al ensayo Temporada de alta enfermedad 2019, pertenecientes al cultivar 2387, cuyo resultado determinado por ELISA, estuviera dentro del rango de linealidad de esta técnica (250 a 5000 µg/kg). Los datos obtenidos para ambas técnicas se presentan en la Tabla 24.

N° muestra	DON (µg/kg)	
	HPLC/MS-MS	ELISA
1	513	1800
2	601	670
3	758	1180
4	920	1930
5	1099	1100
6	1458	1620
7	1615	3550
8	1652	1210
9	1695	4670
10	1700	980
11	1956	1310
12	2018	2140
13	2154	3600
14	2175	3410
15	2327	2270
16	2356	2900
17	2403	5450
18	2553	5270
19	2972	4390
20	3687	5460

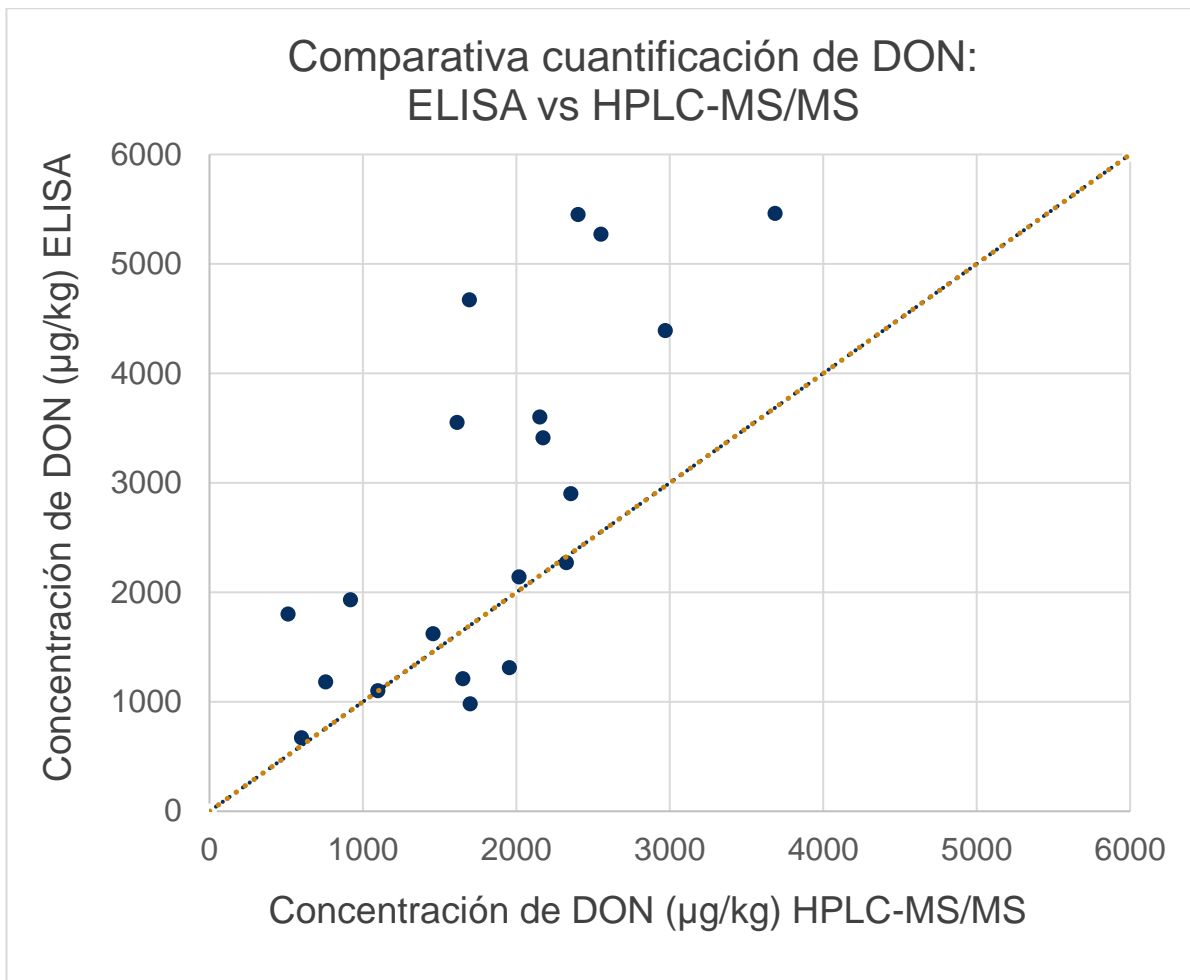
**Tabla 24** - Resultados de concentraciones de DON obtenidos para 20 muestras de cultivar 2387 obtenidos mediante HPLC-MS/MS y ELISA.

En las Figuras 29 y 30 se presentan los resultados obtenidos para ambas técnicas, en niveles de concentración creciente según el valor obtenido por HPLC-MS/MS utilizado como valor de referencia. De ella se desprende una variación notable entre los resultados de ambas técnicas, con una sobreestimación de las concentraciones de DON en la mayoría de las muestras mediante el método de ELISA.

Teniendo en cuenta que la técnica de ELISA es empleada como una técnica de screening, se mantiene su utilidad en este contexto, siempre que posteriormente los valores elevados de concentración sean confirmados mediante una técnica de mayor exactitud.



**Figura 29** - Comparación de las concentraciones de DON obtenidas mediante ELISA AgraQuant y HPLC-MS/MS (n= 20).



**Figura 30** - Comparación de resultados de la cuantificación de DON mediante ELISA vs HPLC-MS/MS.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se desarrolló y validó una metodología analítica (método 2) para la determinación de las micotoxinas DON, 3ADON, 15ADON, NIV y ZEA. Dicha metodología es de fácil implementación en un laboratorio que cuente con el equipamiento adecuado. Es un método relativamente económico, con bajo consumo de solventes y reactivos. Además, dado que no se realiza una etapa de clean-up, es una metodología rápida para el análisis de rutina.

El método cumple con los requerimientos establecidos por las guías de validación de métodos analíticos de la DG SANTE, demostrando su robustez a lo largo de los distintos controles de calidad establecidos, así como con sus especificaciones para la identificación y confirmación de micotoxinas. Considerando lo previamente expuesto, el método puede ser empleado en muestras reales, logrando capturar la diversidad de perfiles de micotoxinas de las mismas.

A partir de la evaluación de las muestras de trigo de la zafra 2018 con el método desarrollado, se pudo obtener un relevamiento del perfil de micotoxinas y relacionarlo con la identificación de los hongos presentes en las mismas, así como con el quimiotipo detectado.

El método desarrollado se empleó en la evaluación de muestras de ensayos dirigidos que permitieron evaluar tres variables de estrategias de manejo de la FE en cuanto al contenido de micotoxinas. Los resultados obtenidos permitieron valorar qué combinaciones de dichas estrategias producen los mejores resultados en cuanto al manejo de la enfermedad, con una menor producción de micotoxinas.

La información obtenida a partir de los resultados de esta tesis nos permite conocer el perfil micotoxigénico asociado a las especies de hongo causales de la FE en nuestro país y cómo afectan las distintas estrategias de manejo de la enfermedad al contenido de micotoxinas. Esto permite apoyar la planificación de futuros cultivos, con el fin de disminuir el impacto de esta enfermedad y por ende la contaminación de estos por micotoxinas.

Como perspectivas para el trabajo en el tema, se puede mencionar la mejora y ampliación del alcance del método analítico. En primer lugar, la separación cromatográfica de los isómeros 3ADON y 15ADON es un requerimiento para la confirmación de la presencia y cuantificación de estos isómeros. Para ello, la estrategia actual es utilizar un método cromatográfico de UPLC con columnas más eficientes. En

segundo lugar, las micotoxinas modificadas y las micotoxinas emergentes son analitos de interés que posiblemente se incorporarán a los programas de monitoreo rutinarios con el tiempo. Para ello, es necesario contar con estándares analíticos (no disponibles en este momento) y con el desarrollo de métodos multianalito ampliados que permitan su detección.

Otra perspectiva que surge de este trabajo de tesis es la necesidad de incorporar el perfil micotoxigénico de las muestras de alimentos en los controles habituales. A medida que van cambiando las cepas circulantes en las regiones productivas del país, existe mayor riesgo de aparición de otras micotoxinas que no están incorporadas en el reglamento bromatológico nacional, como el NIV.

## 6. ANEXO

### Anexo I - Ejemplo de cálculos de concentración de micotoxinas

#### Cálculos para muestras concentradas

Ecuación de la recta de la curva de calibración en matriz:  $y = ax + b$   
 $y = \text{Área}$   $a = \text{pendiente}$   $x = \text{concentración en vial}$   $\left(\frac{ng}{mL}\right)$   $b = \text{término independiente}$

$$x = [\text{vial}] \frac{ng}{mL} = (\text{Área} - b)/a$$

$$[\text{vial}] \frac{ng}{mL} \times \frac{2}{5} = [\text{extracto}] \frac{ng}{mL}$$

$$[\text{extracto}] \frac{ng}{mL} \times \frac{8mL}{2g} = [\text{muestra}] \frac{ng}{g}$$

$$\text{Resumiendo: } [\text{vial}] \frac{ng}{mL} \times 1,6 = [\text{muestra}] \frac{ng}{g}$$

#### Cálculo para muestras diluidas

Ecuación de la recta de la curva de calibración en matriz:  $y = ax + b$   
 $y = \text{Área}$   $a = \text{pendiente}$   $x = \text{concentración en vial}$   $\left(\frac{ng}{mL}\right)$   $b = \text{término independiente}$

$$x = [\text{vial}] \frac{ng}{mL} = (\text{Área} - b)/a$$

$$[\text{vial}] \frac{ng}{mL} \times 20 = [\text{extracto}] \frac{ng}{mL}$$

$$[\text{extracto}] \frac{ng}{mL} \times \frac{8mL}{2g} = [\text{muestra}] \frac{ng}{g}$$

$$\text{Resumiendo: } [\text{vial}] \frac{ng}{mL} \times 80 = [\text{muestra}] \frac{ng}{g}$$

## Anexo II - Resultados de los parámetros evaluados en el control de calidad de los distintos ensayos realizados.

Se reportan %Rec, %RSD, IR, tR, linealidad en solvente y matriz expresado como R<sup>2</sup> y %EM.

### Muestras de Temporada 1 2019 (1 a 28)

Micotoxina	%Rec	%RSD	IR	tR (min)	R <sup>2</sup> MM	R <sup>2</sup> ste	%EM
DON	100	9,8	0,41	8,3	0,9981	0,9997	5
	81*	8,0*	0,27*	8,1*	0,9984*	0,9952*	12*
3ADON	92	7,9	0,29	9,79	0,9985	0,9999	-1
NIV	86	2,1	0,54	7,27	0,9995	0,9999	21
ZEA	97	10,4	0,88	11,8	0,9990	0,9947	39
15ADON	91	0,6	0,79	9,58	0,9998	0,9993	18

Valores marcados con asterisco (\*) corresponden al ensayo de dilución para DON.

### Muestras de Temporada 1 2019 (29 a 56) y Temporada 2 2019 (100 a 127)

Micotoxina	%Rec	%RSD	IR	tR (min)	R <sup>2</sup> MM	R <sup>2</sup> ste	%EM
DON	91	10	0,40	8,15	0,9999	0,9995	7
3ADON	79	3	0,25	9,57	0,9999	0,9997	-6
NIV	79	8	0,50	7,09	0,9949	0,9995	-20
ZEA	79	9	0,85	11,7	0,9962	0,9996	-11
15ADON	70	2	0,91	9,5	0,9993	0,9999	11

### Muestras de zafra 2018

Micotoxina	%Rec	%RSD	IR	tR (min)	R <sup>2</sup> MM	R <sup>2</sup> ste	%EM
DON <sup>1</sup>	78	15	0,46	8,16	0,9991	0,9991	-23
DON <sup>2</sup>	76	5	0,41		0,9976	0,9993	-12
3ADON <sup>1</sup>	73	8	0,41	9,66	0,9997	-	-
3ADON <sup>2</sup>	96	4	0,41		0,9988	0,9999	-10
NIV <sup>1</sup>	64	4	0,56	7,14	0,9926	-	-
NIV <sup>2</sup>	84	4	0,72		0,9982	0,9993	-6
ZEA <sup>1</sup>	97	5	0,72	11,6	0,9992	-	-
ZEA <sup>2</sup>	79	11	0,66		0,9992	0,9996	-22
15ADON <sup>1</sup>	74	21	0,27	9,56	0,9991	-	-
15ADON <sup>2</sup>	88	5	0,42		0,9994	0,9999	-5

Valores marcados con 1 corresponden a la primera ronda de muestras, valores marcados con 2 a la segunda.

**Anexo III - Resultados relevamiento de micotoxinas de la zafra de trigo 2018, especificando departamento, cultivar, identificación de los hongos aislados, quimiotipo y concentración de las micotoxinas (µg/kg).**

En coloración verde se identifican No Detectado (ND), coloración naranja, menor al LOQ (<LOQ), en rosa las muestras de concentración superior al límite máximo establecido (1000 µg/kg para DON, 200 µg/kg para ZEA)

Muestra	Cultivar	Departamento	Identificación hongo	Quimiotipo	Concentración (µg/kg)				
					DON	3ADON	NIV	ZEA	15ADON
1	G 2375	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	532	ND	ND	ND	ND
2	G 2433	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
3	G 2375	Soriano	<i>F.avenaceum</i>		ND	ND	ND	ND	ND
4	Curupay	Soriano	<i>F.poae</i>		738	ND	ND	ND	ND
5	Algarrobo	Soriano	<i>F. cf. incarnatum MLSTs 21-a y 21-F.graminearum, F.poae</i>	15ADON, NIV	1305	ND	37	ND	ND
7	Algarrobo	Soriano	No FGSC		4062	ND	ND	1809	ND
8	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	714	ND	ND	ND	ND
9	Algarrobo	Río Negro	<i>F.graminearum</i>	15ADON	459	ND	ND	ND	ND
10	Algarrobo	Río Negro	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	179	ND	ND	ND	ND
11	Algarrobo	Flores	<i>F.graminearum, F.poae, F.venenatum</i>	15ADON	604	ND	ND	ND	ND
12	Algarrobo	Paysandú	<i>F.graminearum, F.cortaderiae, F.tricinatum, F.avenaceum</i>	15ADON, NIV	350	ND	48	ND	ND
13	Algarrobo	Paysandú	<i>F.graminearum</i>	15ADON	783	ND	<LOQ	ND	ND
14	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum, F.tricinatum, F.avenaceum</i>	15ADON	1894	ND	<LOQ	<LOQ	ND
15	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	10507	ND	ND	5193	ND
16	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	1720	ND	ND	ND	ND
17	Algarrobo	Soriano	<i>F.poae</i>		881	ND	39	ND	ND
18	Algarrobo	Soriano	<i>F.poae</i>		5298	67	ND	1852	ND
19	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	3289	ND	ND	726	ND
20	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum, F.poae</i>	15ADON	1873	ND	ND	ND	ND
21	Algarrobo	Río Negro	<i>F.graminearum</i>	15ADON, NIV	525	ND	ND	ND	ND
22	Algarrobo	Flores	<i>F.graminearum</i>	15ADON	1827	ND	<LOQ	ND	ND

23	Curupay	Río Negro	<i>F.graminearum</i>	15ADON	283	ND	ND	ND	ND
25	Curupay	Paysandú	<i>F.austroamericanum</i>	15ADON	208	ND	ND	ND	ND
26	Curupay	Paysandú	<i>F.graminearum, F.proliferatum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
28	Curupay	Colonia	<i>F.pseudograminearum, F.poa</i>		850	<LOQ	49	ND	ND
29	Curupay	Soriano	<i>F.graminearum, F.tricinctum, F.avenaceum, F.sp cf. poae</i> NRRL13714	15ADON	649	ND	ND	ND	ND
30	Curupay	Soriano	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	345	ND	ND	ND	ND
31	Curupay	Colonia	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	461	ND	ND	104	ND
32	Curupay	Colonia	<i>F.graminearum, F.poa, F.heterosporum</i>	15ADON	102	ND	ND	ND	ND
34	SYN 200	Río Negro	<i>F.graminearum, F.poa</i>		<LOQ	ND	ND	ND	ND
35	SYN 200	Soriano	<i>F.pseudograminearum, F.poa</i>		261	ND	ND	ND	ND
36	SYN 211	Soriano	<i>F.graminearum, F.pseudograminearum</i>	15ADON	352	ND	ND	ND	ND
37	SYN 300	Soriano	<i>F.poa</i>		<LOQ	ND	ND	ND	ND
38	SYN 200	Soriano	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	<LOQ	ND	ND	ND	ND
40	Bag 11	Río Negro	<i>F.graminearum, F.poa, F.avenaceum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
41	K. Nutria	Colonia	<i>F.graminearum, F.cortaderiae, F.avenaceum, F.sp cf. poae</i> NRRL13714	15ADON, NIV	ND	ND	ND	ND	ND
42	Bag 11	Colonia	<i>F.graminearum, F.poa, F.sp cf. poae</i> NRRL13714	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
43	Algarrobo	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	409	ND	ND	ND	ND
44	K. Nutria	Soriano	No FGSC		419	ND	ND	ND	ND
45	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
46	G 6.81	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	<LOQ	ND	ND	ND	ND
47	Bag 11	Flores	<i>F.graminearum</i>	15ADON	1153	ND	ND	ND	ND
48	Bag 11	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	<LOQ	ND	ND	ND	ND
49	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.poa, F.avenaceum</i>	15ADON	662	ND	ND	ND	ND
50	G 6.28	San José	<i>F.graminearum, F.avenaceum</i>	15ADON, NIV	<LOQ	ND	66	ND	ND
51	Nogal	Flores	<i>F.graminearum</i>	15ADON	1423	ND	ND	ND	ND
52	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.pseudograminearum</i>	15ADON	320	ND	ND	ND	ND
53	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
54	G 6.38	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	176	ND	ND	ND	ND
55	G 6.38	Flores	<i>F.graminearum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND

56	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	103	ND	ND	ND	ND
57	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.poa</i>	15ADON	213	ND	ND	ND	ND
58	G 6.28	Flores	<i>F.graminearum, F.pseudograminearum, F.poa</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
60	G 2375	San José	<i>F.graminearum, F.tricinatum, F.guilinense NRRL 32865, F.graminearum/boothii/asiaticum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
61	G 6.28	San José	<i>F.graminearum, F.praeograminearum</i>	15ADON	264	ND	ND	ND	ND
62	Algarrobo	San José	<i>F.graminearum, F.pseudograminearum, F.poa</i>	15ADON	944	ND	44	ND	ND
63	G 2375	San José	<i>F.graminearum, F.poa, F.avenaceum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
64	G 6.28	San José	<i>F.avenaceum</i>		ND	ND	ND	ND	ND
65	G 2375	San José	<i>F.graminearum, F.poa</i>		1384	ND	55	ND	ND
66	G 2375	San José	<i>F.graminearum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
67	G 2375	San José	<i>F.graminearum</i>	15ADON	141	ND	ND	ND	ND
69	G 2375	Florida	<i>F.graminearum, F.poa, F.avenaceum</i>	15ADON, NIV	<LOQ	ND	ND	ND	ND
70	Algarrobo	Florida	<i>F.graminearum, F.tricinatum, F.avenaceum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
71	G 2375	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
72	G 6.28	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	797	ND	31	ND	ND
73	G 2366	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	798	ND	ND	ND	ND
74	G 2375	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	1123	ND	ND	ND	ND
77	G 2375	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	130	ND	ND	ND	ND
78	G 6.87	Soriano	<i>F.graminearum</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
80	G 6.88	Río Negro	<i>F.graminearum, F.scirpi</i>	15ADON	ND	ND	ND	ND	ND
81	G 2366	Río Negro	<i>F.graminearum, F.pseudograminearum</i>	15ADON	8711	ND	61	3399	ND

### Anexo IV – Análisis de varianza de un factor entre cultivar de trigo y concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Análisis ANOVA comparativo de la concentración de DON con respecto a la localidad y al cultivar de trigo. Fueron realizados en Excel Office® como análisis de varianza de un factor.

Análisis de varianza de un factor		Cultivar vs DON		
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Algarrobo	20	37622,94289	1881,147144	6003322,23
Curupay	9	3635,652763	403,9614181	85631,534
G 2375	11	3310,725355	300,9750323	250052,76
G 6.28	11	2358,610149	214,4191044	79547,044

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	30564137,21	3	10188045,74	4,05643192	0,012088709	2,802355176
Dentro de los grupos	118044172,7	47	2511578,142			
Total	148608309,9	50				

### Anexo V - Análisis de varianza de un factor entre el Departamento y la concentración de DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Análisis de varianza de un factor		Departamento vs DON		
RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Soriano	28	36223,283	1293,688676	4922365,8
Flores	15	6480,9095	432,0606336	348880,3
San José	9	2733,151	303,6834469	258271,16
Rio Negro	8	9631,7456	1203,968198	9229990
Colonia	5	1413,3005	282,6600983	136585,58
Paysandú	4	1340,5773	335,1443335	109859,93
Florida	2	0	0	0

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	15845409,58	6	2640901,597	0,8231105	0,55623192	2,244024016
Dentro de los grupos	205340221,7	64	3208440,964			
Total	221185631,3	70				

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. FAO. FAO Cereal Supply and Demand Brief | World Food Situation | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Accessed April 19, 2023. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>
2. Beccari G, Arellano C, Covarelli L, Tini F, Sulyok M, Cowger C. Effect of wheat infection timing on Fusarium head blight causal agents and secondary metabolites in grain. *Int J Food Microbiol.* 2019;290:214-225. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.014
3. Umpiérrez-Failache M, Garmendia G, Pereyra S, Rodríguez-Haralambides A, Ward TJ, Vero S. Regional differences in species composition and toxigenic potential among Fusarium head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *Int J Food Microbiol.* 2013;166(1):135-140. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.029
4. Pereira CB, Ward TJ, Del Ponte EM, et al. Five-year survey uncovers extensive diversity and temporal fluctuations among fusarium head blight pathogens of wheat and barley in Brazil. *Plant Pathol.* 2021;70(2):426-435. doi:10.1111/ppa.13289
5. van der Lee T, Zhang H, van Diepeningen A, Waalwijk C. Biogeography of Fusarium graminearum species complex and chemotypes: a review. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2015;32(4):453-460. doi:10.1080/19440049.2014.984244
6. Bakker MG, Brown DW, Kelly AC, et al. Fusarium mycotoxins: a trans-disciplinary overview. *Can J Plant Pathol.* 2018;40(2):161-171. doi:10.1080/07060661.2018.1433720
7. Karlsson I, Persson P, Friberg H. Fusarium Head Blight From a Microbiome Perspective. *Front Microbiol.* 2021;12:628373. doi:10.3389/FMICB.2021.628373/BIBTEX
8. Mazzilli S, Pérez ;, Ernst O. Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia.* 2007;Nº:11-21.
9. Patriarca A, Fernández Pinto V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Curr Opin Food Sci.* Published online 2017. doi:10.1016/j.cofs.2017.01.011
10. Portal INIA Pronóstico DON en trigo. Accessed September 17, 2023. <http://www.inia.uy/gras/Alertas-y-herramientas/Pronóstico-DON-para-trigo>
11. Bryła M, Waśkiewicz A, Ksieniewicz-Woźniak E, Szymczyk K, Edrzejczak RJ.

- Modified fusarium mycotoxins in cereals and their products—Metabolism, occurrence, and toxicity: An updated review. *Molecules*. Published online 2018. doi:10.3390/molecules23040963
12. Pereyra S, Castro M, Germán S, et al. Avances en el manejo de la fusariosis de la espiga en trigo. Published online 2014:43-50.
  13. Palladino C, Muela A, Taborda B, et al. Application of a Straightforward Methodology by LC-QqQ-MS/MS and GC-MS to Ensure Food Safety of Barley and Wheat Grain. *ACS Agric Sci Technol*. 2022;2(2):371-380. doi:10.1021/acsagscitech.1c00263
  14. Brancatti G, Garmendia G, Pereyra S, Vero S. Current species composition of Fusarium population affecting the main wheat-growing regions in Uruguay and evolution of their sensitivity to triazoles after long-term application. *Int J Pest Manag*. 2022;68(4):349-358. doi:10.1080/09670874.2022.2129509
  15. Garmendia G, Pattarino L, Negrín C, et al. Species composition, toxigenic potential and aggressiveness of Fusarium isolates causing Head Blight of barley in Uruguay. *Food Microbiol*. 2018;76(July):426-433. doi:10.1016/j.fm.2018.07.005
  16. Dweba CC, Figlan S, Shimelis HA, et al. Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Prot*. 2017;91:114-122. doi:10.1016/j.cropro.2016.10.002
  17. Freire L, Sant'Ana AS. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem Toxicol*. Published online 2018. doi:10.1016/j.fct.2017.11.021
  18. Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, Fabbri AA, Fanelli C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87(3):899-911. doi:10.1007/s00253-010-2657-5
  19. Polak-śliwińska M, Paszczyk B. Trichothecenes in food and feed, relevance to human and animal health and methods of detection: A systematic review. *Molecules*. 2021;26(2). doi:10.3390/molecules26020454
  20. Kovalsky P, Kos G, Nährer K, et al. Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins (Basel)*. 2016;8(12). doi:10.3390/toxins8120363
  21. Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Molecular Aspects of Mycotoxins - A Serious Problem for Human Health. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8187). doi:doi:10.3390/ijms21218187
  22. dos Anjos MR, Castro IM de, Souza M de LM de, de Lima VV, de Aquino-Neto FR.

Multiresidue method for simultaneous analysis of aflatoxin M1, avermectins, organophosphate pesticides and milbemycin in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

<https://doi.org/10.1080/1944004920161175227>. 2016;33(6):995-1002.

doi:10.1080/19440049.2016.1175227

23. Fontana AR, Prendes LP, Morata VI, Bottini R. High-throughput modified QuEChERS method for the determination of the mycotoxin tenuazonic acid in wine grapes. *RSC Adv.* 2016;6(98):95670-95679. doi:10.1039/C6RA22990E
24. Cunha SC, Sá SVM, Fernandes JO. Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization. *Food Chem Toxicol.* Published online 2018. doi:10.1016/j.fct.2018.02.039
25. Lacina O, Zachariasova M, Urbanova J, Vaclavikova M, Cajka T, Hajslova J. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* Published online 2012. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.097
26. Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(16):2773-2789. doi:10.1080/10408398.2019.1658570
27. Bianchini A, Bullerman LB. Mycotoxins: Classification. *Encycl Food Microbiol Second Ed.* 2014;2:854-861. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00230-5
28. Knutsen HK, Alexander J, Barregård L, et al. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* 2017;15(9). doi:10.2903/j.efsa.2017.4718
29. McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ, Pathogens BF. Trichothecenes : From Simple to Complex Mycotoxins. Published online 2011:802-814. doi:10.3390/toxins3070802
30. Khaneghah AM, Martins LM, von Hertwig AM, Bertoldo R, Sant'Ana AS. Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing - A review. *Trends Food Sci Technol.* 2018;71. doi:10.1016/j.tifs.2017.10.012
31. Zhang Y, Ma LJ. *Deciphering Pathogenicity of Fusarium Oxysporum From a Phylogenomics Perspective.* Vol 100. 1st ed. Elsevier Inc.; 2017.

doi:10.1016/bs.adgen.2017.09.010

32. Panel E, Chain F. Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA J.* 2013;11(6).  
doi:10.2903/j.efsa.2013.3262
33. Kim SH, Vujanovic V. Biodegradation and biodetoxification of Fusarium mycotoxins by *Sphaerodes mycoparasitica*. *AMB Express.* 2017;7(1):1-9. doi:10.1186/S13568-017-0446-6/FIGURES/8
34. FAO/WHO. Safety evaluation of certain contaminants in food: deoxynivalenol (addendum). *Fao Jecfa Monogr.* Published online 2011:317-485.
35. Food E-DS-SC on. Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins. Part 41: Nivalenol. Published online 2000:10 pp.
36. Food E-DS-SC on. Opinion of the Committee on Food on Fusarium toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA). *EFSA J.* 2000;(June):12 pp.
37. EFSA. Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA J.* 2016;14(4):4425.  
doi:10.2903/j.efsa.2016.4425
38. Palacios SA, Erazo JG, Ciasca B, et al. Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in durum wheat from Argentina. *Food Chem.* 2017;230:728-734. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2017.03.085
39. Panel E. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J.* 2011;9(6). doi:10.2903/J.EFSA.2011.2197
40. WHO. WHO Mycotoxins Facts Sheet. Accessed April 19, 2023.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
41. Reglamento (CE) 1881/2006. Contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. 2008;1999(8):1-18.
42. FDA. Mycotoxins | FDA. Accessed April 19, 2023. <https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins>
43. Asam S, Habler K, Rychlik M. *Fusarium Mycotoxins in Food.*; 2017.  
doi:10.1016/B978-0-08-100674-0.00014-X
44. FDA. Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed | FDA. Accessed April 19, 2023.  
<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human>

45. Aires CDB. SECRETARÍA DE REGULACIÓN Y GESTIÓN SANITARIA. Published online 2019:1-5.
46. Colegiada D, Interno R, Colegiada D. Ministério da Saúde RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 07 , DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011. Published online 2011.
47. Prado G. Contaminação de alimentos por micotoxinas no Brasil e no mundo. *Geraiis (Esc Saúde Pública Minas Gerais)*. 2014;2:13-26.
48. IM (Intendencia Municipal de Montevideo). Regalameto Bromatologico Nacional. Published online 2012.
49. MGAP. Resolución S/N/001 Límites máximos de DON en alimentos para animales | Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Accessed April 19, 2023. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/normativa/resolucion-sn001-limites-maximos-don-alimentos-para-animales>
50. Pan D, Mionetto A, Calero N, Reynoso MM, Torres A, Bettucci L. Population genetic analysis and trichothecene profiling of *Fusarium graminearum* from wheat in Uruguay. *Genet Mol Res*. 2016;15(1):1-11. doi:10.4238/gmr.15017270
51. Enciclopedia Geográfica del Uruguay - ECONOMIA - Agricultura. Accessed April 19, 2023. <http://www.montevideo.com.uy/enciclopedia/agricult.htm>
52. MGAP. El Ministerio de Ganadería , Agricultura y Pesca , a través de Estadísticas Agropecuarias ( DIEA ) comunica : RESULTADOS DE LA ENCUESTA DE ARROZ. 2010;2020(cuadro 2):1-2.
53. Uruguay XXI. Sector Agrícola En Uruguay. Published online 2022.
54. Fagundez Patricia, Rovetta Nicolás, Suburú Gabriela, Vázquez Daniel A, Jorge, Ayrala Damián, Cadenazzi Mónica, Córdova Daniela de Al, Villarmarzo Fernando, Durán César, Tresso Giancarla, Nadia Martinez G, Marcela. Informe de calidad e inocuidad de trigo uruguayo zafra 2021/2022. Published online 2022.
55. Analysis of mycotoxins. *IARC Sci Publ*. 2012;(158):53-58.
56. European Comission. Document n0 SANTE 11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Accessible at: [https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?CntID=727](https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727). Published online 2021:1-57.
57. European Commission. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. *Off J Eur Union*. Published online 2017:1-4.

[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs\\_contaminants\\_sampling\\_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_sampling_guid-doc-ident-mycotoxins.pdf)

58. Comisión Europea. Reglamento (CE) 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para control oficial del contenido de micotoxinas en productos alimenticios. *D Of la Unión Eur.* 2006;70:12-34.
59. Meneely JP, Ricci F, van Egmond HP, Elliott CT. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2011;30(2):192-203. doi:10.1016/j.trac.2010.06.012
60. Breidbach A, Andreas. A Greener, Quick and Comprehensive Extraction Approach for LC-MS of Multiple Mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2017;9(3):91. doi:10.3390/toxins9030091
61. Pantano L, Scala L La, Olibrio F, et al. Quechers lc–ms/ms screening method for mycotoxin detection in cereal products and spices. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(7). doi:10.3390/ijerph18073774
62. Et A. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J AOAC Int.* 2003;86(2). Accessed August 12, 2023. <https://academic.oup.com/jaoac/article/86/2/412/5656996>
63. Payá P, Anastassiades M, Mack D, et al. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(6):1697-1714. doi:10.1007/s00216-007-1610-7
64. Gilbert J, Pichler M, Edwards S, et al. Safe food and feed through an integrated toolbox for mycotoxin management: the MyToolBox approach. *World Mycotoxin J.* Published online 2016. doi:10.3920/wmj2016.2136
65. Berthiller F, Brera C, Iha MH, et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2015-2016. *World Mycotoxin J.* 2017;10(1):5-29. doi:10.3920/WMJ2016.2138
66. Dzuman Z, Zachariasova M, Lacina O, Veprikova Z, Slavikova P, Hajslova J. A rugged high-throughput analytical approach for the determination and quantification of multiple mycotoxins in complex feed matrices. *Talanta.* 2014;121:263-272. doi:10.1016/j.talanta.2013.12.064
67. Malachová A, Sulyok M, Beltrán E, Berthiller F, Krska R. Optimization and

- validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *J Chromatogr A*. 2014;1362:145-156. doi:10.1016/j.chroma.2014.08.037
68. Gilbert J, Gilbert J. Quality assurance in mycotoxin analysis. 1999;23.
  69. Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chem*. 2010;119(1):408-416. doi:10.1016/j.foodchem.2009.07.042
  70. SANTE/12682/2019. Guidance document on analytical quality control and method validation for pesticide residues analysis in food and feed. *Eur Comm*. Published online 2019:1-48. [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf)
  71. Romer Labs. Discover AgraQuant® Deoxynivalenol Plus ELISA test at Romer Labs. Accessed September 22, 2023. <https://www.romerlabs.com/en/catalog/product/view/id/2009>
  72. Abia WA, Warth B, Sulyok M, et al. Determination of multi-mycotoxin occurrence in cereals, nuts and their products in Cameroon by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Control*. Published online 2013. doi:10.1016/j.foodcont.2012.10.006
  73. Oliveira MS, Rocha A, Sulyok M, Krska R, Mallmann CA. Natural mycotoxin contamination of maize (*Zea mays* L.) in the South region of Brazil. *Food Control*. Published online 2017. doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.033
  74. Fiby I, Sopel MM, Michlmayr H, Adam G, Berthiller F. Development and Validation of an LC-MS/MS Based Method for the Determination of Deoxynivalenol and Its Modified Forms in Maize. *Toxins 2021, Vol 13, Page 600*. 2021;13(9):600. doi:10.3390/TOXINS13090600
  75. MGAP-DGSA. Informe de calidad e inocuidad de trigo uruguayo 2022/2023. Published online 2023. Accessed September 1, 2023. [http://www.inia.org.uy/convenio\\_inase\\_inia/resultados/index\\_00.htm](http://www.inia.org.uy/convenio_inase_inia/resultados/index_00.htm)
  76. Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). Informe de Calidad e Inocuidad de Trigo Uruguayo 2017/2018. Published online 2018.
  77. Pereyra S, Dill-Macky R. Fusarium Species Recovered from Wheat and Barley Grains in Uruguay, Pathogenicity and Deoxynivalenol Content. *Agrociencia*. Published online 2010:33-44. doi:10.31285/agro.14.625

78. Palladino C, Puigvert F, Muela A, et al. Evaluation of Fusarium mycotoxins and fungicide residues in barley grain produced in Uruguay. Published online 2020. doi:10.1016/j.jafr.2020.100092
79. del Palacio A, Corallo B, Simoens M, et al. Major Fusarium species and mycotoxins associated with freshly harvested maize grain in Uruguay. *Mycotoxin Res.* 2023;(0123456789). doi:10.1007/s12550-023-00498-y
80. Calori-Domingues MA, Bernardi CMG, Nardin MS, et al. Co-occurrence and distribution of deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in wheat from Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/1939321020161152598>. 2016;9(2):142-151. doi:10.1080/19393210.2016.1152598
81. Queiroz VAV, De Oliveira Alves GL, Da Conceição RRP, et al. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. *Food Control.* 2012;28(1):83-86. doi:10.1016/J.FOODCONT.2012.04.039
82. Zingales V, Fernández-Franzón M, Ruiz MJ. Occurrence, mitigation and in vitro cytotoxicity of nivalenol, a type B trichothecene mycotoxin – Updates from the last decade (2010–2020). *Food Chem Toxicol.* 2021;152(March). doi:10.1016/j.fct.2021.112182
83. Del Ponte EM, Garda-Bufferon J, Badiale-Furlong E. Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chem.* 2012;132(2):1087-1091. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2011.10.108