



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE DEPLECIÓN DE OCRATOXINA A EN TEJIDOS COMESTIBLES DE POLLOS BROILER

PATRICIO ANDRÉS MEDINA HERRERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : BETTY SAN MARTÍN
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR HIDALGO
PROFESOR CONSEJERO: GUSTAVO FARÍAS

SANTIAGO, CHILE
2009

Dedicada con mucho cariño a mis padres, hermanos, familia, amigos y compañeros.

AGRADECIMIENTOS.

Mis sinceros agradecimientos a todos quienes hicieron posible la realización de esta memoria, especialmente a:

Dra. Betty San Martín, por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo, su constante apoyo, dedicación y consejos.

Dr. Héctor Hidalgo, por su paciencia, apoyo y consejos.

Dr. Gustavo Farías, por su ayuda y consejos.

Dra. Alicia Gallardo Lagno, por su constante apoyo, sus consejos y toda la confianza depositada en mí.

Funcionarios del Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por su paciencia y dedicación, especialmente a la Dra. Daniela Iragüen y a la Dra. Javiera Cornejo.

Funcionarios del Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por su paciencia y dedicación, especialmente al Dr. Miguel Martínez.

ÍNDICE.

RESUMEN.	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
HIPÓTESIS.	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.	34
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN.

Los productos agrícolas, durante su producción, cosecha y almacenamiento, pueden ser invadidos por hongos. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos bajo condiciones subóptimas y de estrés, estos metabolitos tóxicos pueden enfermar o matar a los animales que los consumen. Las ocratoxinas constituyen el segundo grupo de micotoxinas caracterizadas después de las aflatoxinas. La ocratoxina A (OTA), es capaz de causar efectos adversos en la salud animal y la población humana, recibiendo una especial atención debido a su marcado efecto nefrotóxico. La tendencia mundial es limitar la presencia de estas toxinas estableciéndose Límites Máximos Residuales en alimentos de origen vegetal y animal de consumo humano.

En este trabajo, se planteó realizar un estudio de depleción de OTA en tejidos comestibles de aves broiler. Para esto se utilizaron 42 pollos broiler de 36 días de edad con un peso vivo promedio de 2 kg, definiéndose en una primera etapa una dosis de ingesta que permitiera realizar su cuantificación en tejidos posterior a su exposición. Para esto se estimaron 3 dosis orales (125, 166 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo), administradas mediante una sonda directamente al buche. Cada grupo estuvo formado por 3 pollos a los cuales se les administró la OTA cada 24 horas por 3 días, además, se contó con un grupo control de 3 animales. Los animales fueron sacrificados 24 horas después a la última exposición y se obtuvieron muestras de músculos pectorales, hígado, corazón, estómago muscular y riñón. Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de HPLC con detector de fluorescencia. Debido a que con estas dosis no se lograron concentraciones en el tejido muscular mayores al Límite de Cuantificación de la técnica, se decidió aumentar el nivel de exposición a 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pero en dosis única; ésta se administró a un grupo de 18 pollos y se obtuvieron muestras a partir de 3 pollos en cada uno de los siguientes tiempos 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post inoculación, detectándose concentraciones de ocratoxina A hasta 4 días posteriores a la exposición. Además, se consideró con un grupo control de 12 animales, desde los que se obtuvieron muestras de los mismos tejidos en cada uno de los tiempos de muestreo.

SUMMARY.

Agricultural products, during its production, harvest and storage, can be invaded by fungi. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi under subideal conditions and stress. These toxic metabolites can fall ill or kill animals who consume them. The ochratoxins are the second group of mycotoxins characterized after the aflatoxins. The ochratoxin A (OTA) can cause adverse effects in the animal and human health, receiving a special attention due to its marked nephrotoxic effect. The world trend is to limit the presence of these toxins being established a Maximum Residual Limit in food of vegetable and animal origin, of human consumption.

In this experience, was proposed to carry out a study of depletion of OTA in edible tissues of broiler chicks. For this study, was used 42 broiler chicks of 36 days old and their average live-weight was 2 kg, being defined in the first stage a dose of ingestion that allowed to do this quantification in tissues after its exposition. For this, 3 oral doses were estimated (125, 166 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of live weight), administered by a probe directly to the maw. Every group was consist of 3 chicks which were gave the OTA every 24 hours for 3 days. In addition, was considered with a control group of 3 animals. The animals were sacrificed 24 hours after the last exposition and samples of muscle, liver, heart, muscular stomach and kidney were obtained. The samples were analyzed by means of the technique of HPLC with fluorescence detector. Due to the fact that with these doses concentrations in the muscular tissue were not greater than Quantification Limit of technique, was decided to increase the level of exposition to 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in a unique dose. It was administered to a group of 18 chicks and were obtained samples from 3 chicks in each of the following times 12, 24, 48, 72, 96 y 120 hours post inoculation, detecting concentrations of ochratoxin A up to 4 days after the exposition. In addition, was considered with a control group of 12 animals who were obtained samples of the same tissues in each time of sampling.

INTRODUCCIÓN.

Los hongos son capaces de colonizar los más variados sustratos, influyendo y afectando la vida de animales y humanos. Ellos son capaces de expresar su potencial biológico en productos de origen vegetal, que constituyen la base de la alimentación en la producción animal. La colonización de los alimentos por hongos, muchas veces son consecuencia del mal manejo durante la cosecha de granos y sobre todo en el almacenamiento, generan pérdidas económicas, debido, entre otras cosas, a la disminución en la calidad nutritiva de éste y cambios en las condiciones organolépticas.

Algunos hongos, bajo ciertas condiciones ambientales, producen metabolitos secundarios denominados micotoxinas, las cuales al ser consumidas por los animales a través del alimento contaminado, afectan sus parámetros productivos, producen daños en sistemas y órganos e incluso pueden llevar a la muerte del animal.

Los efectos de las micotoxinas dependen del tipo de toxina, especie animal involucrada, edad y nivel de contaminación de los alimentos, produciendo cuadros tóxicos crónicos y agudos. Por otro lado, debido a la cinética de distribución de estas micotoxinas, ellas pueden acumularse en los tejidos y órganos de los animales expuestos, constituyendo, a través de la cadena alimenticia, un problema de Salud Pública.

Las micotoxinas pueden producir en el hombre alteraciones en diversos sistemas y órganos y hasta la fecha existe evidencia para tres de ellas de ser potencialmente cancerígenas (aflatoxina B1, fumonisinas y ocratoxina A).

Respecto a la ocratoxina A (OTA), ésta es producida principalmente por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* y se describe además, como una potente nefrotoxina. Entre las especies más susceptibles a esta micotoxina se encuentran los cerdos y las aves.

Por lo anterior, la tendencia en las reglamentaciones internacionales respecto a la presencia de OTA, es regular la aparición de sus residuos en alimentos de origen animal

que van a consumo humano. En Chile, las regulaciones sobre residuos de micotoxinas en diferentes especies productivas, no tienen considerado el control de la OTA.

Este estudio pretende determinar el tiempo de eliminación de la OTA en tejidos de pollos broiler de 36 días de edad expuestos experimentalmente a esta micotoxina. Para esto, previa y experimentalmente, se determinó una dosis que no produjera manifestaciones clínicas ni muerte en el animal y que además, generara una acumulación en los tejidos suficiente para realizar un seguimiento de las concentraciones por un período superior a 24 horas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Hongos y los alimentos.

Los productos agrícolas, durante su producción, cosecha y almacenamiento, pueden ser invadidos por diversos organismos, siendo los hongos filamentosos uno de los principales responsables de los problemas inherentes a la producción de cereales (ICMSF, 2001).

Estos hongos pueden ser divididos, dependiendo de la etapa en que afectan al producto vegetal, en dos grandes grupos: hongos de campo y hongos de almacenamiento. Los hongos de campo, están presentes en los granos antes de su recolección y pueden ser patógenos o comensales. Para su crecimiento requieren niveles de actividad de agua (a_w) superiores a 0,90, lo que equivale al 20-25% de humedad en el peso total del grano. Entre los principales daños provocados se incluyen manchas, excoriaciones, decoloraciones, pérdidas en la capacidad de germinación de semillas y la producción de toxinas. Estas toxinas se denominan micotoxinas y constituyen uno de los principales problemas causados por hongos (ICSMF, 2001).

Entre los principales hongos de campo con capacidad toxigénica, es decir, que poseen la potencialidad de producir toxinas en los sustratos vegetales, son las especies pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, y *Cladosporidium* (Carrillo, 2003).

Con respecto a los hongos de almacenamiento, se caracterizan por no presentar una invasión importante antes de la recolección del grano y tienen su origen en los contenedores de transporte, cintas transportadoras, los sacos y los depósitos de almacenamiento. La actividad del agua es el parámetro más importante para su crecimiento, requiriendo valores entre 0.68 y 0,90 o, un contenido de humedad mínima en el grano de 13-13,5%. Los principales hongos de almacenamiento son especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos xerófilos (Carrillo, 2003). Los principales efectos que provocan son decoloraciones, olores anormales, pérdida de materia seca,

cambios químicos y nutritivos, calentamiento, apelmazamiento y producción de toxinas (ICSMF, 2001).

Otro factor que determina la presencia de hongos es la temperatura. Los hongos pueden proliferar en un amplio intervalo de temperaturas y por lo general, la tasa de crecimiento será mayor mientras mayor sea la temperatura. A mayor temperatura, mayor es la actividad de agua, siendo mayor la propensión a la proliferación de éstos (FAO, 2003). Es por esto, que la mayoría de los hongos crecen mejor a temperatura ambiente en los climas templados y tropicales, en el margen de 10 a 35°C. El género *Aspergillus* tiene su margen óptimo a 30-40°C, mientras que el margen es menor para *Penicillium* (20-30°C) (CAST, 2003).

Por otra parte, los insectos y artrópodos también contribuyen al deterioro biológico de los cereales e influyen en la proliferación de hongos. La actividad metabólica de insectos y ácaros generan un aumento del contenido de humedad y temperatura, en los sustratos infestados. Además, actúan como portadores de esporas y los hongos pueden utilizar los residuos fecales de los artrópodos como fuente de nutrientes. La proliferación de mohos, está también determinada por las proporciones de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono de la atmósfera intergranular. Muchos hongos son capaces de crecer a concentraciones de oxígeno muy bajas, mientras que en ambientes anaerobios se detiene el desarrollo de estos organismos (FAO, 2003).

Micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos bajo condiciones subóptimas y de estrés, a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario. Estas toxinas son moléculas relativamente pequeñas y suelen ser específicas para un grupo de especies de un mismo género de hongo (Abarca *et al.*, 2000). Se ha determinado que cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos, más restringido es el número de especies de hongos productores (Carrillo, 2003).

El término micotoxina nace en 1962 luego de una crisis veterinaria en Londres, en que murieron aproximadamente 100.000 pavos. Cuando esta misteriosa enfermedad fue relacionada con harina de maní contaminada con aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, se sensibilizó el mundo científico a la posibilidad de que estos metabolitos podían ser mortales (Bennett y Klich, 2003).

Las micotoxinas son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Actualmente, entre 300 a 400 compuestos son reconocidos como micotoxinas, dependiendo de la definición usada y reconociendo que la mayoría se agrupan en familias relacionadas químicamente. De éstas, aproximadamente una docena reciben atención como posible amenaza para la salud animal y humana, debido a que estos metabolitos tóxicos pueden enfermar o matar a los animales que los consumen. La afección que causan se denomina micotoxicosis (Bennet y Klich, 2003).

Un punto importante, es que la presencia de una micotoxina y el peligro asociado a ella, solamente puede ser determinado después de la extracción e identificación de la misma, debido a que la sola presencia del hongo, no asegura que exista una micotoxina, así como también, la ausencia de hongos no asegura la ausencia de toxinas (Carrillo, 2003).

En el cuadro N° 1 se presentan las principales micotoxinas, junto a las principales especies de hongos responsables de su producción.

Cuadro N° 1. Micotoxinas y especies de hongos productores.

Micotoxina	Especie
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> Link <i>Aspergillus nomius</i> kurtzman et al. <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare
Zearalenona	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i> <i>Fusarium equiseti</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium heterosporum</i>
Desoxinivalenol	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>
Fumonisinias	<i>Alternaria alternate</i> <i>Fusarium fujikuroi</i> <i>Fusarium nygamai</i> <i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium verticilloides</i>
Ocratoxina	<i>Aspergillus alutaceus</i> <i>Aspergillus alliaceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sclerotiorum</i> <i>Aspergillus sulphureus</i> <i>Penicillium verrucosum</i>

(Carrillo, 2003).

Micotoxicosis.

Son variadas las patologías producidas por consumo de alimentos contaminados con metabolitos secundarios tóxicos de carácter fúngico. A estas alteraciones se les ha denominado micotoxicosis, término que fue definido como “intoxicación del huésped como consecuencia de la entrada al cuerpo de una sustancia tóxica de origen fúngico” (López, 1988). Las micotoxinas se encuentran ampliamente distribuidas en alimentos de consumo humano y animal y se han relacionado con diversas enfermedades. Los efectos clínicos pueden ser clasificados como hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, inmunotóxicos, según el órgano o sistema que afectan en mayor proporción (Bennet y Klich, 2003).

La toxicidad está influenciada por una serie de factores, entre ellos está el tipo de micotoxina, la concentración que alcancen en el alimento, la biodisponibilidad, los sinergismos entre las micotoxinas presentes, la cantidad de alimento consumido y la continuidad o intermitencia en la ingestión. También está influenciada por la edad, peso y estado fisiológico del individuo que las consume (ELIKA, 2003).

Una micotoxicosis puede ser clasificada como primaria o secundaria. La primaria se produce al consumir vegetales contaminados y la secundaria, se produce al ingerir carne o leche de animales alimentados con forrajes o granos contaminados (Carrillo, 2003).

La exposición a micotoxinas puede producir toxicidad tanto aguda como crónica, dependiendo de la cantidad y el tiempo de ingestión, con efectos nocivos a nivel de sistema nervioso central, cardiovascular, respiratorio y digestivo, llegando incluso a causar la muerte del individuo (FAO, 2003).

Los síntomas clínicos son en la mayoría de los casos poco específicos y difíciles de identificar, como pérdida de peso, alteración de la fertilidad, disminución de la producción de leche, baja en la postura de huevos, entre otros (López, 1988). También pueden actuar como agentes cancerígenos, mutágenos, teratógenos e inmunodepresores (CAST, 2003).

En el cuadro N° 2 se presentan los principales efectos que provocan las micotoxinas.

Cuadro N° 2. Efectos tóxicos de las principales micotoxinas.

Micotoxina	Efectos tóxicos
Aflatoxina	Hepatotoxicidad Mutagenicidad Teratogénesis Carcinogénesis Inmunosupresión
Ocratoxina	Nefrotoxicidad (necrosis túbulos renales) Hepatotoxicidad Carcinogénesis (adenoma y carcinoma renal) Teratogénesis Inmunosupresión
Tricotecenos	Irritación de piel y mucosas Vómitos Anorexia Inmunosupresión
Zearalenona	Fallas reproductivas Anorexia
Fumonisina	Edema pulmonar Carcinogénesis Anorexia

(ELIKA, 2003).

Micotoxinas y sus reglamentaciones.

Según un estudio de la FAO realizado el año 2003, al menos 99 países, que representan el 87% de los habitantes del mundo, tienen reglamentos para las micotoxinas en los alimentos y/o en las raciones (Figura N° 1). Todos los países con reglamentaciones tienen al menos límites reglamentados para la aflatoxina B₁ o para el total de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂. Para otras micotoxinas también existen reglamentos específicos, así por ejemplo para la aflatoxina M₁, los tricotecenos deoxinivalenol y diacetoxiscirpenol, las toxinas T-2 y HT-2; las fumonisinas B₁, B₂, y B₃; el ácido agárico; los alcaloides del ergot; la ocratoxina A; la patulina; las fomopsinas; la esterigmatocistina y la zearalenona. A esto se suman varios reglamentos desarrollados entre países integrantes de comunidades económicas (Australia/Nueva Zelandia, UE, MERCOSUR) (FAO, 2004)

Por otro parte, el Comité del Codex para Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC), estableció en el año 2003 normas para las aflatoxinas en los maníes sin procesar, para la aflatoxina M₁ en la leche y para la patulina en el jugo de manzana. Se ha elaborado una propuesta de norma para la ocratoxina A en el trigo, en la cebada, en el arroz y en sus productos derivados y actualmente están en discusión las normas propuestas para el deoxinivalenol (DON) (FAO, 2004).

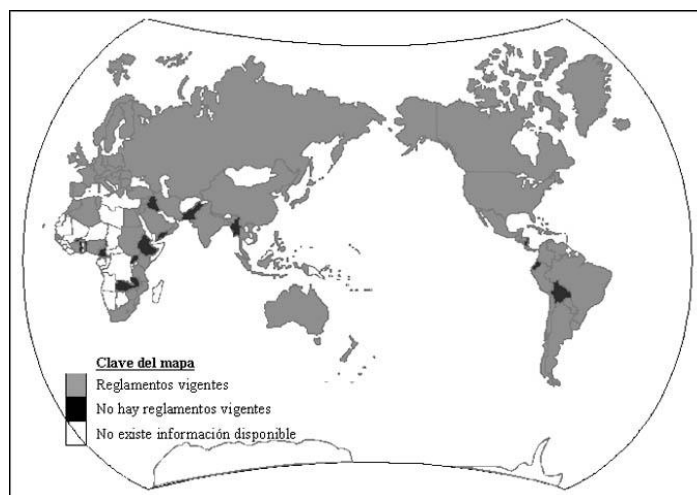


Figura N° 1. Representación mundial de países con y sin reglamentos vigentes (FAO, 2004).

Con respecto a Chile, para los productos destinados al consumo humano, existen límites establecidos en el Reglamento Sanitario de los Alimentos, párrafo 3, artículo 169. En este se fijan Límites Máximos Residuales (LMR) para zearalenona, aflatoxina M1 y aflatoxinas totales (cuadro N° 3) (MINSAL, 1997). Además la Resolución Exenta N° 707/1991 del SAG estableció LMR de aflatoxina para alimentos e ingredientes de consumo animal (cuadro N° 4).

Cuadro N° 3. Límite Máximos Residuales fijados en Chile, para productos alimenticios destinados a consumo humano en el Reglamento Sanitario de los Alimentos para aflatoxinas y zearalenona.

Micotoxina	LMR (µg/kg)
Aflatoxinas totales (B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)	5
Aflatoxina M1	0,05
Zearalenona	200

(MINSAL, 1997).

Cuadro N° 4. Límites Máximos Residuales fijados en Chile para aflatoxinas (µg/kg) en alimentos e ingredientes de uso animal.

Producto	B1	B1+B2+G1+G2
Alimentos	5 µg/kg	20 µg/kg
Ingredientes	20 µg/kg	50 µg/kg

(SAG, 1991).

Micotoxinas y micotoxicosis en aves.

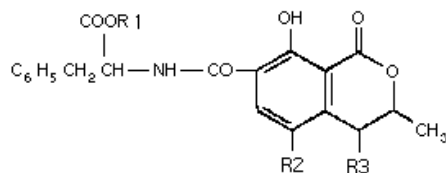
Los factores antinutricionales disminuyen la calidad de los alimentos y por lo tanto afectan la salud y performance de las aves. Las micotoxinas son consideradas como un factor antinutricional presente en ingredientes y raciones de los animales. Los géneros de hongos más importantes que afectan a la industria avícola incluyen a los géneros

Aspergillus, *Fusarium* y *Penicillium* y las toxinas con mayor significancia son las Aflatoxinas, citrina, toxina T-2, deoxynivalenol, fumonisinas, zearalenona y ocratoxinas (Swamy, 2005).

Entre los efectos generales que tienen las micotoxinas en las aves, se puede nombrar la disminución del consumo de alimento, disminución de la ganancia de peso, incremento de la susceptibilidad de enfermar, disminución de producción de huevos, falla hepática y renal y en casos de altos niveles de consumo de micotoxinas se suma la alta mortalidad y la consecuente pérdida y daño económico generado para los productores. En la década del 90, se estimaron pérdidas por más US \$ 2.5 billones en USA y más de US \$ 1 billón en Canadá a causa de las micotoxinas que afectan a la industria ganadera, mientras que en la región Asia-Pacífico, estimaciones conservadoras indican que las pérdidas ascenderían a los US \$ 10 billones por año (Swamy, 2005).

Ocratoxinas.

Las ocratoxinas constituyen el segundo mayor grupo de micotoxinas caracterizadas después de las aflatoxinas. La ocratoxina A (OTA) fue descubierta en 1965 en Sudáfrica, aislada desde maíz y reconocida como una potente nefrotoxina (Bennett y Klich, 2003). Fue aislada desde *Aspergillus ochraceus* (ahora llamado *A. alutaceus*), pero es producida por muchas otras especies de este género, entre ellas están *Aspergillus alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. melleus* y *A. niger*. Aunque en un comienzo se pensó que eran muchas las especies de *Penicillium* implicadas en la producción de micotoxinas, ahora se sabe que *Penicillium verrucosum*, un contaminante común de la cebada, es el único productor de ocratoxinas de este género. Su estructura molecular, consiste en un núcleo de isocumarina unido a una molécula de L-fenilalanina mediante un enlace amida (López de Cerain *et al.*, 2000) (Figura N°2). Son 7 los metabolitos incluidos en el grupo de ocratoxinas, solo la ocratoxina A (OTA) es encontrada como un contaminante natural (Leeson *et al.*, 1995). Esta toxina es termoestable y lábil en condiciones de elevado pH (ELIKA, 2003).



	R₁	R₂	R₃
Ocratoxina A	H	Cl	H

Figura N° 2. Estructura química Ocratoxina. (Leeson *et al.*, 1995).

La OTA ha sido encontrada en cebada, avena, centeno, trigo, granos de café y otros productos vegetales (Benett y Klich, 2003), de modo particular en cereales y legumbres de regiones geográficas tanto templadas, como frías y húmedas; puede considerarse como una de las micotoxinas más frecuentes en la contaminación de granos de cereales (López de Cerain *et al.*, 2000). *P. verrucosum* es el mayor productor de OTA en zonas climáticas frías, como Canadá, mientras que *A. alutaceus* es el principal productor de OTA en climas más calurosos como Yugoslavia y Australia (Marquardt y Frohlich, 1992).

Un estudio “in vitro” determinó las concentraciones de OTA producidas por dos especies de hongos (*A. alutaceus* y *P. verrucosum*) en un período de 30 días en diferentes sustratos (maíz, trigo, soya y maní). En este ensayo se otorgaron las condiciones óptimas a ambas especies de hongos, quedando demostrado el potencial toxigénico de estos hongos en sustratos que son utilizados tanto en alimentación humana como animal (Marquardt y Frohlich, 1992). Los resultados se detallan en el cuadro N° 5.

Cuadro N° 5. Producción de ocratoxina A de dos especies de hongos en diferentes sustratos bajo condiciones óptimas

Especie y sustrato	OTA µg/g
Aspergillus alutaceus	
-Maiz	74
-Trigo	72
-Soya	243
-Maní	342
Penicillium verrucosum	
-Maiz	21
-Trigo	98
-Soya	7
-Maní	18

(Marquardt y Frohlich, 1992).

Por otra parte, en una revisión realizada por la International Union of Pure and Applied Chemistry (Pohland *et al.*, 1992), se recopiló información de contaminación de OTA en raciones e insumos destinados a la alimentación animal. En el cuadro N° 6, se detalla esta revisión:

Cuadro N° 6. Contaminación con ocratoxina A de raciones a base de productos agrícolas (granos) e ingredientes de uso en la alimentación animal en distintos países.

País	Materia Prima	Incidencia %	Máximo nivel detectado µg/g
Australia	Raciones	<1	70
Austria	Raciones	5-10	1
Canadá	Raciones	<1	6
Dinamarca	Raciones	50-60	27.5
Finlandia	Raciones	30-40	0.1
Francia	Maíz	1-5	0.2
Indonesia	Raciones	Sin información	0,5
Polonia	Raciones	1-5	0,2
	Raciones	1-5	0,25
Yugoslavia	Maíz	25-30	5,125

(Pohland *et al.*, 1992).

Además, la OTA es capaz de causar efectos adversos en la salud animal y la población humana, recibiendo una especial atención debido a su marcado efecto nefrotóxico (Abarca *et al.*, 2000). Es hepatotóxica, inmunosupresora, potente teratógena y carcinogénica (CAST, 2003). Induce lesiones macro y microscópicas en el riñón e hígado de animales y se ha descrito como un potente carcinógeno renal en ratas (Leeson *et al.*, 1995). En cerdos, causa una enfermedad conocida como Nefropatía Micotóxica Porcina. En humanos existen evidencias que sugieren que es el agente causal de la Nefropatía Endémica de los Balcanes, una enfermedad renal degenerativa, irreversible y con una alta mortalidad, que se presenta en ciertas áreas del este de Europa (Bennett and Klich, 2003). Se ha determinado su presencia en sangre humana en concentraciones por sobre los 35 µg/kg y también en leche en similares concentraciones (Pitt, 2000). Actualmente es además considerada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), como posible cancerígena para el hombre, situándola el año 1993, en el grupo 2B (IARC, 1993).

Debido a estos antecedentes de toxicidad, se han establecido LMR en alimentos de origen vegetal y animal de consumo humano. La mayoría de estos reglamentos están dirigidos a alimentos de origen vegetal (cereales, café, vino) y a productos derivados del cerdo y éstas varían entre concentraciones que van desde 3 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura N° 3). Países como Dinamarca han establecido LMR para cerdos de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en riñón, mientras que países como Republica Checa y Rumania han establecido límites residuales para todos los alimentos, en concentraciones de 20 y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (FAO, 2004). Además se han establecido sistemas de toma de muestra y métodos de análisis para el control del contenido de OTA en determinados productos alimenticios (Directiva 2005/5/CE, 2005).

En América del Sur, sólo Uruguay y Brasil han reglamentado y establecido límites para arroz, cebada, porotos, café y maíz. Por otro parte, en Chile los programas de control de residuos de fármacos y contaminantes incorporan a la aflatoxina y zearalenona, pero no consideran a la OTA y tampoco se ha establecido un LMR. La tendencia mundial, es limitar cada vez más la presencia de ésta y otras micotoxinas para asegurar la obtención de productos alimentarios inocuos.

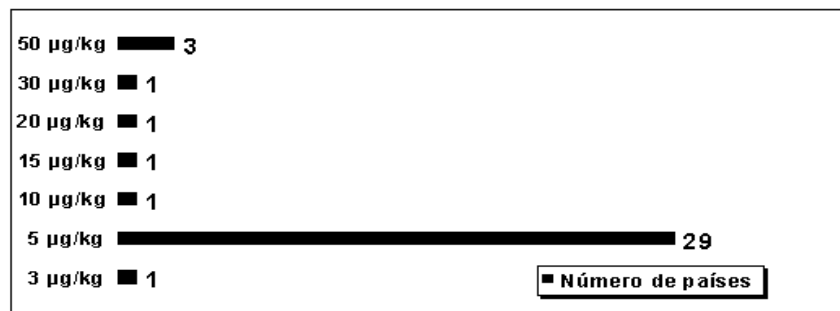


Figura N° 3. Límites Máximos Residuales a nivel mundial para la ocratoxina A en los cereales y en productos base de cereales (FAO, 2004).

Toxicocinética de la ocratoxina A.

Absorción.

En la mayoría de las especies, la OTA es absorbida en estómago y yeyuno; esta absorción se lleva a cabo en forma pasiva, con la molécula en su forma no ionizada y como mono-anión. La absorción en estómago es rápida y se ve facilitada por las propiedades ácidas de la OTA. Los niveles de absorción difieren entre una especie y otra. En general para los mamíferos supera el 50%. Los cerdos son los que poseen el más alto nivel de absorción con valores cercanos al 66%, mientras que en ratas y conejos es de alrededor de un 56%. La excepción entre los mamíferos la constituyen los rumiantes en que los niveles de absorción son muy bajos; esto se explica porque la OTA es hidrolizada por la microflora presente en el rumen. Estudios en aves han indicado que el nivel de absorción es cercano al 40 % cuando se administra vía oral 2 mg de OTA por kilo de peso vivo. Una vez absorbida, ésta pasa a circulación sanguínea vía vena porta y es distribuida a los diferentes órganos y tejidos (Ringot *et al.*, 2006).

Una de las características de la OTA es su alta afinidad con proteínas plasmáticas, especialmente con albúmina, lo que explica la larga vida media que tiene en el organismo, su distribución y el prolongado tiempo de excreción que posee (ELIKA, 2003). La fracción libre que se distribuye vía sanguínea es muy baja, con niveles menores al 0,2% (López de Cerain *et al.*, 2000). Además la OTA una vez que es eliminada vía biliar, puede ser reabsorbida desde intestino, recirculando (Marquardt y Frohlich, 1992).

Distribución.

Con respecto al depósito en órganos y tejidos, en cerdos, ratas, aves y cabras seguiría el siguiente orden: riñón > hígado > músculo > grasa. En la mayoría de los mamíferos, la acumulación se da primero en riñón y luego en hígado. Un estudio demostró el potencial de unión y especificidad de la OTA a proteínas del citosol y organelos, una de

ellas es una de 62kDa presente en células del túbulo proximal del riñón. Aunque esta proteína sea encontrada en bajas concentraciones, la alta afinidad que se presenta, contribuiría a la acumulación de OTA en el riñón, contribuyendo a su marcado efecto nefrotóxico (Ringot *et al.*, 2006)

También se han realizado análisis en huevos de gallinas que recibieron dietas contaminadas con OTA, observándose una mayor concentración en la yema que en clara. Se ha determinado que esta micotoxina se deposita en forma de capas de anillos concéntricas, estando presente sólo en algunas capas. Lo anterior sugeriría que el depósito no es un fenómeno continuo y que involucra otros mecanismos más que una simple difusión. Una posibilidad planteada es que la OTA se une y almacena en las proteínas de la yema, que han sido sintetizadas en hígado y transportadas e incorporadas durante el crecimiento folicular (Ringot *et al.*, 2006).

Metabolismo.

Los principales metabolitos generados a partir de la OTA son: OT α , derivados hidroxilados 4-OH-OTA y 10-OH-OTA y productos de conjugación. Todos estos son menos tóxicos que la OTA y son eliminados en forma rápida (López de Cerain *et al.*, 2000).

La principal biotransformación de la OTA, es la reacción en que es hidrolizada al metabolito OT α y L-fenilalanina en diferentes lugares del organismo. La hidrólisis que ocurre en intestino delgado es responsabilidad de las enzimas carboxipeptidasa A, tripsina y quimotripsina. En este caso la hidrólisis puede ocurrir antes de ser absorbida o posteriormente, cuando es eliminada vía biliar, evitando así su reabsorción. En ratas además la detoxificación por hidrólisis a OT α es llevada a cabo por la microflora bacteriana del ciego. En rumiantes la hidrólisis es llevada a cabo en rumen por la microflora ruminal, por lo tanto, la toxina no alcanza a ser absorbida como tal, lo que explica la gran resistencia que poseen estos animales a la OTA (Leeson *et al.*, 1995).

Por otro parte, el principal metabolito hepático que se genera en animales y humanos es el 4-OH-OTA (epímeros 4R y 4S), fundamentalmente por la acción de las enzimas pertenecientes al complejo citocromo P450. Estos epímeros, son considerados menos tóxicos que la OTA. El epímero 4R, es formado en sistema microsomal hepático de ratas y humanos, mientras que el 4S es mas prevalente en microsomas hepáticos de cerdo. Existe otro metabolito hidroxilado, el 10-OH-OTA que solamente se ha descrito “in vitro” luego de la incubación de OTA con microsomas hepáticos del conejo (López de Cerain *et al.*, 2000.).

Otro mecanismo de detoxificación es el realizado por la enzima fenilalanina hidroxilasa, enzima encargada de transformar la fenilalanina (aminoácido esencial) en tirosina (aminoácido no esencial). Esta enzima puede utilizar la OTA como sustrato, generando la Tyr-OTA, que se encuentra presente en el hígado de animales intoxicados. Este metabolito puede ser transformado a 4(R/S)-hidroxitirosin-ocratoxina A y otros metabolitos; todos ellos menos tóxicos y con una tasa de eliminación mayor que la OTA (López de Cerain *et al.*, 2000).

Eliminación.

La OTA es una toxina de rápida absorción y lenta eliminación. La excreción fecal y urinaria juega un importante rol en todas las especies. En mamíferos se suma la excreción a través de la leche (Ringot *et al.*, 2006).

La excreción renal esta determinada por la alta afinidad de unión que tiene con las proteínas plasmáticas, esto limita la filtración glomerular. En un estudio en que se comparó la eliminación de OTA entre ratas normales y otras carentes de albúmina, se determinó que las concentraciones de OTA en orina y bilis es 20-70 veces mayor en las ratas carentes de albúmina. La OTA además es reabsorbida en todos los segmentos del nefrón (Marquardt y Frohlich, 1992).

La OTA y el metabolito OT α son excretados por vía fecal, por medio de la bilis. En estudios realizados en ratas que recibieron una dosis de 15 mg/kg, se determinó que la excreción acumulada después de 120 horas, fue de 11% para OTA y de 23% para OT α en heces; 11% para OTA y 12% para OT α en orina y 33% para OTA en bilis (Ringot *et al.*, 2005). Por otra parte, las aves la eliminarían más rápido que los mamíferos; en pollos que recibieron una dosis oral única de OTA, ésta fue eliminada a las 48 horas, mientras que en cerdos, alimentados con raciones con 1 mg/kg de OTA por un mes, los niveles desaparecieron a los 4-5 días (Leeson *et al.*, 1995).

Toxicidad.

Entre las micotoxinas, la OTA es considerada la de mayor toxicidad para las aves de corral. En términos de letalidad, es más toxica que la aflatoxina y comparable en toxicidad a los tricotecenos. La LD₅₀ ha sido evaluada en pollos broiler de diferentes edades, para pollos de 1 día de edad es de 2,1mg/kg (Leeson *et al.*, 1995), mientras que para pollos de 21 días es de 3,6mg/kg (Pitt, 2000).

Entre los principales signos clínicos a causa de intoxicación con OTA, en las aves se presenta decaimiento, emaciación, deshidratación, diarrea y aumento de la mortalidad debido fundamentalmente a alteraciones renales y hepáticas. Otros signos de micotoxicosis son la reducción del consumo de alimento y ganancia de peso, alteración de la conversión de alimento, en ponedoras se ha observado disminución de la producción de huevos, reducción de la calidad de la cáscara y nefropatías (Swamy, 2005).

La ingesta crónica de OTA ha sido asociada con la Nefropatía Aviar Espontánea. En casos agudos, sería el túbulo colector del nefrón el más afectado, con una alteración en la excreción de electrolitos; probablemente el mecanismo en este caso sea el bloqueo de la conductividad de aniones a través de la membrana plasmática. La exposición crónica, afectaría tanto la hemodinámica del sistema renal como la función secretora del túbulo proximal, con un mecanismo en el cual parece jugar un importante papel la angiotensina II.

Tanto por exposición aguda como crónica, la OTA aumenta el pH de la orina, debido a que la toxina inhibe la reabsorción de HCO_3^- en los túbulos (López de Cerain *et al.*, 2000).

Además la administración de OTA causa depleción celular y regresión de órganos linfoides, afectando la inmunidad celular, pero no la inmunidad humoral (Leeson *et al.*, 1995). También se ha descrito su presencia en el encéfalo; el mecanismo por el cual causa la neurotoxicidad se desconoce, descartándose la inhibición de la síntesis proteica y la peroxidación lipídica (López de Cerain *et al.*, 2000).

Experimentos realizados en ratas y ratones han demostrado que la administración crónica produce cáncer renal y hepático. Además su mutagenicidad, podría ser causada indirectamente por medio de alguna transformación metabólica (Ringot *et al.*, 2006). Tanto “in vitro” como “in vivo”, incrementa la formación de aductos en el DNA de manera dosis-dependiente. Además, es capaz de inducir micronucleos debido principalmente, a una acción clastogénica e interfiriendo en la distribución normal de los cromosomas durante la división celular (López de Cerain *et al.*, 2000). También ha resultado ser teratogénica en gallinas, siendo una de las principales dianas el sistema nervioso central donde se ha observado malformaciones craneales en los fetos (Leeson *et al.*, 1995).

Ocratoxina y aves broiler.

Respecto a la relación entre la contaminación natural en alimentos y el consumo de éstos por las aves comerciales, existen pocos estudios. Hamilton *et al.*, (1982), midió niveles de contaminación en alimentos, los cuales fueron causantes de ocratoxicosis natural en pavos, gallinas de postura y pollos broiler, encontrando un amplio rango de concentraciones que fluctuaron entre 0,2 y 16 mg/kg, de alimento. En otro trabajo en el que se realizaron análisis para determinar presencia de micotoxinas, de 15 muestras de alimentos causantes de afecciones hepáticas en pollos broiler y gansos, se detectó OTA en 6 de ellas en concentraciones que fluctuaron entre 110 y 930 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Shlosberg, *et al.*, 1997).

En un estudio del año 1976 desarrollado por Krogh *et al.*, en que se midieron niveles de OTA en riñón, hígado y músculo de aves que recibieron dietas con 0,3 y 1 mg/kg por 341 días, se detectaron residuos de OTA de hasta 50 mg/kg. Cabe señalar, que los animales no evidenciaron lesiones renales y sus tejidos podrían haber sido aceptados para consumo humano en la inspección Médico Veterinaria realizada en la planta de faenamiento. Actualmente a nivel internacional, niveles de contaminación de tal magnitud, estarían muy por sobre los LMR establecidos para la OTA en productos de consumo humano (Leeson *et al.*, 1995).

Así también, Prior *et al.*, (1980), suministraron OTA por medio de las raciones de alimentos en diferentes niveles: 0.5, 1 y 2 mg/kg a 3 grupos de broiler durante 8 semanas, encontrando que solo las aves alimentadas con dietas de 2 mg/kg en el alimento, presentaron concentraciones en hígado y riñón de 24 y 41 µg/kg, respectivamente. No se detectaron residuos en músculo ni grasa. A las 24 horas de retirado el alimento con OTA, solo se detectó residuos en riñón, mientras que a las 48 horas no se encontró residuo en ningún tejido.

El año 1983 Golinski *et al.*, realizaron un ensayo por ocho semanas en el que se alimentó a pollos broiler con raciones contaminadas con diferentes niveles de OTA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg de OTA por kg de alimento). Los pollos fueron sexados y luego se determinaron las concentraciones residuales en hígado y músculo. En ambos sexos se detectó la micotoxina en las aves alimentadas con 1,0; 1,5 y 2,0 mg de OTA por kg de alimento, no habiendo diferencias entre sexos para hígado, pero si en músculo, determinándose en este tejido concentraciones de 0,8; 3,0 y 4,5 µg/kg en el grupo de machos y concentraciones de 2,8; 5,0 y 8,5 µg/kg en el grupo de hembras.

Por otro parte, Micco *et al.*, (1987), administraron a pollos broiler de 14 días de edad, una dosis de OTA de 50 µg/kg en el alimento por 36 y 64 días. Los niveles residuales fueron de 5 µg/kg en hígado y solo trazas en riñón y músculo para el grupo alimentado por 36 días; mientras que para el grupo alimentado por 64 días se detectó 11 µg/kg en hígado, 0,8 µg/kg en riñón y solo trazas en músculo. En este último grupo

además se detectaron 2,0 µg/kg en piel. A partir de uno de los grupos que ingirió alimento contaminado durante 36 días, se generaron dos subgrupos que fueron mantenidos uno por 14 y el otro por 28 días adicionales con alimento libre de OTA. En el primer grupo se detectaron niveles trazas en hígado y de 1 µg/kg en piel; mientras que en el segundo grupo no se detectó OTA en ningún tejido. En este estudio se concluyó, que frente a la confirmación de la presencia de la OTA en tejidos, sería necesario establecer programas de monitoreo en las plantas de proceso y que, para el caso de pollos broiler, el órgano de elección sería el hígado.

En un estudio más reciente, Biró *et al.*, (2002), midieron los niveles plasmáticos y residuales en tejidos de aves broiler de 28 días de edad, expuestos a 0,5 mg/semana de OTA durante 4 semanas. La administración de la toxina se realizó por vía oral, mediante una sonda nasogástrica y las mediciones en plasma y tejidos se realizaron por medio de ELISA y HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). Con la información recolectada, se determinó la curva de concentración de OTA en plasma en función del tiempo, obteniéndose las más altas el día 14 (1,16 ng/ml para HPLC y 2,12 ng/ml para ELISA). Una considerable disminución en los niveles plasmáticos se registró la tercera semana (día 21) y una fuerte disminución para los últimos 7 días (día 28), con concentraciones de 0,3 ng/ml y 0,64 ng/ml para HPLC y ELISA, respectivamente. También se midieron los niveles de residuos en hígado, riñón y músculo. Las mayores concentraciones en hígado se detectaron el día 7, excediendo los 4 ng/g por ELISA y 1,4 ng/g por HPLC. El día 28 se detectaron concentraciones en hígado por ambos métodos. En riñón, el día 7 se detectaron menores concentraciones que en hígado, 2,84 ng/g y 1,25 ng/g, por ELISA y HPLC, respectivamente. El día 28 solo se estableció niveles de la toxina por el método ELISA. En músculo, concentraciones de OTA solo fueron detectables a partir del día 14 por el método ELISA y desde el día 21 por HPLC. Finalmente, en este trabajo se indica como conclusión que la dosis aplicada genera residuos medibles en el plasma y los tejidos. La diferencia de concentraciones obtenidas comparando los métodos analíticos se atribuye a las diferentes técnicas de preparación realizadas (extracción y purificación de la molécula).

Frente a la escasa información existente sobre la presencia y concentración de residuos de OTA en tejidos de aves destinadas para consumo humano y fundamentalmente, de los tiempos necesarios para la eliminación de la toxina por el organismo del animal hasta alcanzar niveles que sean inocuos para el ser humano, es que en este trabajo, se planteó realizar un estudio de depleción de OTA en tejidos de aves broiler y definir el tiempo necesario para que su consumo no represente un peligro para la salud humana.

HIPÓTESIS.

En tejidos comestibles de aves broiler inoculados experimentalmente, se detectan niveles residuales de ocratoxina A sobre los declarados reglamentariamente como inocuos para la población humana, por tiempos mayores a 24 horas posteriores a la exposición a esta micotoxina.

OBJETIVO GENERAL.

1.- Realizar un estudio de depleción de ocratoxina A en aves broiler, con el propósito de definir los tiempos necesarios para que en los diferentes tejidos se encuentren niveles internacionalmente aceptables de este contaminante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1.- Ajustar la dosis mínima de exposición de ocratoxina A en pollos broiler, hasta definir la concentración necesaria para que esta toxina sea detectable y cuantificable en tejidos comestibles.

2.- Determinar las concentraciones de ocratoxina A en diferentes tejidos comestibles de aves broiler, en distintos tiempos de muestreo, posterior a la dosis de exposición.

3.- Definir el tiempo que se mantiene la ocratoxina A en los distintos tejidos comestibles, tomando como referencia los Límites Máximos Residuales existentes internacionalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS.

I.- Materiales.

Laboratorio.

Instalaciones:

-Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

-Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Estándar Utilizado:

Se utilizó el estándar de ocratoxina A (Sigma®) con pureza conocida y certificada para la inoculación de los animales y los análisis cromatográficos.

Equipos Cromatográficos:

-Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución acoplado a un detector de fluorescencia (HPLC-FL), (Waters®).

Otros Equipos:

- Balanza de precisión (Precisa®, modelo 125^a).
- Centrífuga (Ependorf®, modelo centrifuge 5416).
- Agitador de tubos.
- pHmetro electrónico Hanna Instrument®.
- Equipos menores.

Reactivos y soluciones:

- H₂SO₄.
- H₂SO₄ 18% V/V.
- NaOH.
- Acetonitrilo.
- Metanol.
- Hexano.
- Acetonitrilo/H₃PO₄ 0,02 M (60/40) (Fase móvil).

Material Fungible:

Corresponde a todo aquel material de uso habitual en el Laboratorio de Farmacología y laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Animales de experimentación:

Se utilizaron 42 pollos Broiler comerciales, línea genética Ross, obtenidos al día de edad desde la Planta de Incubación de la Sociedad Agrícola Chorombo S.A. y mantenidos hasta los 35 días de edad con un peso vivo promedio de 2 kg, tiempo en el cual se dio inicio al ensayo experimental.

II.- MÉTODOS.**Mantenimiento de los animales:**

Los pollos broiler fueron mantenidos desde 1 día de edad en baterías de cría y recría ubicadas en instalaciones pertenecientes al Laboratorio de Patología Aviar de la

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La sala que alojó a estas baterías estuvo sometida a desinfección y estricto aislamiento sanitario. Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con dietas comerciales (iniciación y engorda) durante el período experimental, las cuales se mantuvieron en condiciones de temperatura adecuadas, con el fin de evitar que durante su almacenamiento ocurriera desarrollo fúngico. Además los animales contaron con agua a disposición durante todo el período experimental.

Las condiciones de manejo de las aves, las inoculaciones experimentales y el sacrificio de las aves se efectuaron de acuerdo a los preceptos de bienestar animal, sancionados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Determinación de la dosis de exposición:

Se realizó un ensayo piloto, el cual se inicio a los 36 días de edad, con el fin de determinar una dosis de ingesta de OTA que generara residuos cuantificables y permitiera realizar un posterior seguimiento en los siguientes tejidos: músculos pectorales, hígado, estómago muscular, corazón y riñón. Para esto se estimaron 3 dosis orales (125, 166 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo); éstas fueron administradas mediante una sonda directamente al buche. Cada uno de los grupo estuvo compuesto por 3 pollos a los cuales se les administró la correspondiente dosis de OTA cada 24 horas por 3 días. A las 24 horas de la última exposición se obtuvieron las muestras de los tejidos y los órganos anteriormente descritos. Además, se tuvo un grupo control (3 pollos), a los que se les inoculó agua destilada y que fueron sacrificados junto con los grupos expuestos a la micotoxina.

Exposición de pollos broiler a ocratoxina A:

A partir de los resultados obtenidos en la etapa de la determinación de dosis de exposición, se decidió aumentar el nivel de exposición a 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pero en dosis única, administrada vía sonda directamente al buche. Esta nueva dosis se administró a un grupo

de 18 pollos y se obtuvieron muestras de músculos pectorales, hígado, estómago muscular, corazón y riñón, a partir de 3 pollos en cada uno de los siguientes tiempos: 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas post inoculación. Además, para cada tiempo de muestreo, se dispuso de un grupo control compuesto por 2 pollos a los que se les inoculó agua destilada y que fueron sacrificados en los mismos tiempos de muestreo que los grupos expuestos a la micotoxina.

Sacrificio de los animales y obtención de las muestras:

Las aves fueron sacrificadas por dislocación cervical (de acuerdo a la normativa de bienestar vigente). Posteriormente se realizó la necropsia y disección de los pollos obteniéndose las muestras de los tejidos y órganos correspondientes. Estas se colocaron en bolsas de plástico identificando el grupo y el día de muestreo y se mantuvieron congeladas a $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$, hasta el día en que se realizaron los análisis.

Determinación de Ocratoxina A.

Extracción de la Ocratoxina A desde los tejidos y condiciones cromatográficas.

Extracción:

Con el fin de realizar el procedimiento de extracción y purificación de la muestra, se utilizó como referencia lo descrito por Valenta, (1998). El método se encuentra previamente validado por el Laboratorio de Farmacología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Pecuarias de la Universidad de Chile, de acuerdo a la normativa 2002/657/CE de la Unión Europea. Este se describe a continuación: se pesaron $10\pm 0,5$ gr de muestra, a la que se le adicionó 5 ml de agua HPLC, 200 μl de H_2SO_4 18% V/V; se agitó y se agregó 16 ml de acetonitrilo más 300 μl de H_2SO_4 concentrado; se agitó, se dejó reposar por 10 min, se sonicó y se agitó por 5 min. Se transfirió el sobrenadante, se agregó 10 ml de hexano, se agitó y centrifugó por 3 minutos. Se descartó el hexano, se secó a 60°C bajo flujo suave de nitrógeno, se agregaron 5 ml de agua y se ajustó a $\text{pH } 8,5 \pm 0,3$ con NaOH 20%. Se acondicionaron en columna Oasis HLB con Metanol y agua. Se pasó

la muestra por la columna y se eluyó con 4 ml de Metanol; se secó a 60°C. Se reconstituyó con 300 µl de fase móvil y se trasladó a un vial de inyección.

Condiciones cromatográficas:

Los análisis se realizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia. La longitud de onda de emisión fue de 333 nm y la de excitación de 460 nm.

La fase móvil estuvo compuesta por una solución de ácido acético y acetonitrilo, con un pH de $3,2 \pm 0,3$. El flujo de esta fase fue de 1,5 ml por min. La columna analítica utilizada fue una C-18 W® de 4,6 por 250 mm.

El límite de cuantificación fue de 0,5 µg/kg y límite de detección de 0,1 µg/kg.

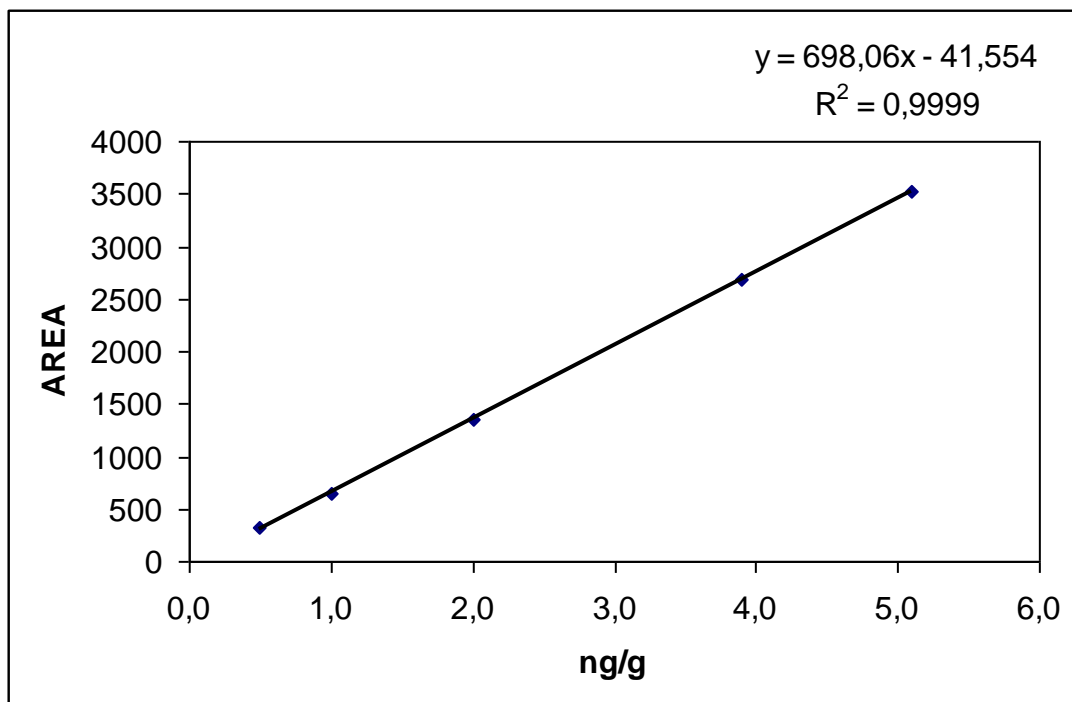
Análisis de los datos.

Para realizar la cuantificación previamente se realizaron curvas de calibración con muestras de tejido libre de OTA con distintos niveles de fortificación, que fueron de 0,5; 1; 2; 4 y 5 ng/g. Con estas concentraciones se realizó un análisis de regresión lineal utilizando como variable dependiente el área cromatográfica y como variable independiente las concentraciones. Estas curvas se realizaron en cada set de muestras y sólo fue aceptada cuando tuvo una correlación (r^2) mayor a 0,9. En el cuadro N° 7 y gráfico N° 1 se muestra una curva de calibración obtenida en el análisis de un set de muestras.

Cuadro N° 7. Concentraciones de fortificación a muestras de tejido muscular libre de ocratoxina A y áreas cromatográficas obtenidas mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a un detector de fluorescencia.

Concentración de enriquecimiento (ng/g).	Área cromatográfica.
0,5	320
1	641
2	1358
4	2677
5	3522

Gráfico N° 1. Curva de calibración resultante al graficar las concentraciones de fortificación a muestras de tejido muscular libre de ocratoxina A y las áreas cromatográficas obtenidas mediante el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a un detector de fluorescencia.



A partir de la ecuación de las curvas de calibración se cuantificaron las muestras problemas. La ecuación utilizada para este cálculo fue la siguiente:

$$x = \frac{(y - n)}{m}$$

Donde:

y: área.

m: pendiente.

n: Intercepto.

x: concentración.

Para determinar la tendencia de eliminación de la OTA en los diferentes órganos y tejidos, se graficó el Logaritmo natural (Ln) de las concentraciones obtenidas en función de los tiempos de muestreo.

RESULTADOS.

Determinación de la dosis de exposición:

Una vez analizadas las muestras obtenidas a partir de cada grupo experimental (125, 166 y 250 µg de OTA administrada por kg de peso vivo) y cuantificadas las concentraciones de OTA, se pudo constatar mayores concentraciones en hígado que en el tejido muscular, detectándose en este último, concentraciones iguales al Límite de Cuantificación de la técnica (0,5 µg/kg) solamente en aquellas muestras obtenidas de los animales a los que se les administró la dosis más alta. En el cuadro N° 8 se señala el promedio y desviación estándar de las concentraciones determinadas en tejido muscular y hepático para cada grupo en relación a la dosis administrada.

Cuadro N° 8. Valores promedio de las concentraciones de ocratoxina A cuantificadas en muestras de tejido muscular y hepático de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina¹.

Dosis de exposición (µg/kg)	Tejido	Promedio (µg/kg)	d.s. ²
125	Muscular	ND ³	-
	Hepático	3,5	0,44
166	Muscular	ND ³	-
	Hepático	4,3	1,04
250	Muscular	0,5	0,29
	Hepático	4,6	2,5

1. N= 3 pollos broiler de 36 días de edad por grupo de exposición, inoculados vía oral por 3 días y sacrificados 24 horas posteriores a la última inoculación. 2. d.s.: Desviación estándar. 3. ND=no detectada.

Debido a la necesidad de contar con una cierta cantidad gramos de muestra para realizar el método analítico, es que se tuvo que realizar un compósito de corazón, estómago muscular y riñón con los 3 animales de cada grupo. En el cuadro N° 9 se describen las concentraciones calculadas en los compósitos de los tejidos anteriormente descritos.

Cuadro N° 9. Concentraciones de ocratoxina A cuantificadas en muestras compósitos de corazón, estómago muscular y riñón de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina¹.

Dosis de exposición (µg/kg)	Corazón	Estómago muscular	Riñón
125	ND²	0,5	2,5
166	ND²	1,9	3,2
250	0,6	2,6	6,8

1. N= 3 pollos broiler de 36 días de edad por grupo de exposición, inoculados vía oral por 3 días y sacrificados 24 horas posteriores a la última inoculación. **2.** ND=no detectada.

Dado que sólo con la dosis más alta de OTA (250 µg/kg peso vivo por 3 días) se lograron niveles cuantificables en las muestras de músculos pectorales (0,5 µg/kg), se decidió aumentar la dosis de exposición a 750 µg/kg peso vivo administrándose en dosis única. Con este nivel de exposición se esperó lograr niveles cuantificables en los tejidos (músculos pectorales, hígado, riñón, corazón y estómago muscular) que permitieran, además, realizar un seguimiento durante los distintos tiempos de muestreos (12, 24, 48 72, 96 y 120 horas) para determinar la depleción de la OTA. Las concentraciones cuantificadas en músculos pectorales se señalan en el cuadro N° 10.

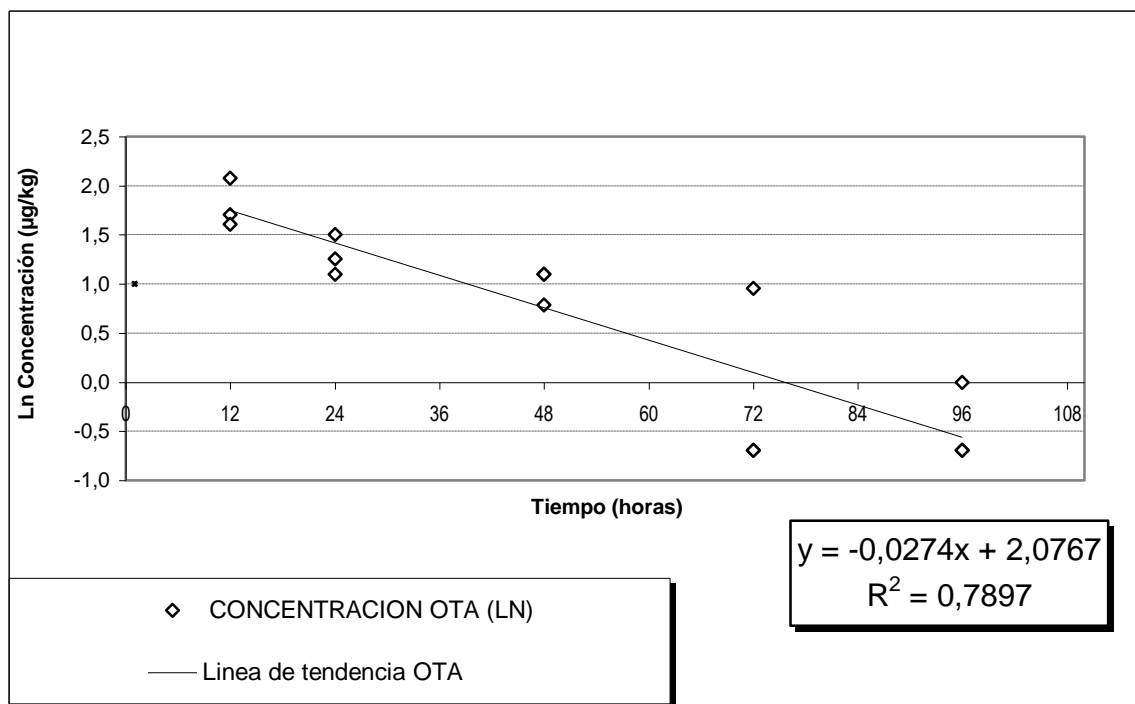
Cuadro N° 10. Concentración de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) cuantificadas en muestras de tejido de músculos pectorales de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹, en diferentes tiempos de muestreo postadministración.

Horas Postadministración	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
12	5,5	6,2
12	8	
12	5	
24	3	3,7
24	4,5	
24	3,5	
48	2,2	2,7
48	3	
48	3	
72	0,5	1,2
72	2,6	
72	0,5	
96	ND ²	0,5
96	0,5	
96	0,5	
120	ND ²	-
120	ND ²	
120	ND ²	

1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad. 2. ND=no detectada.

Respecto a la tendencia de eliminación de la toxina desde tejido muscular, se observó que a la hora 96 postadministración, la concentración en 2 de las 3 muestras fueron iguales al límite de cuantificación de la técnica. A las 120 horas no se detectó la presencia de esta toxina. En el grafico N°2 se muestra la tendencia de eliminación de la OTA en tejido muscular en una escala semilogarítmica.

Gráfico N° 2. Tendencia de eliminación de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de tejido de músculos pectorales de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹.



1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad.

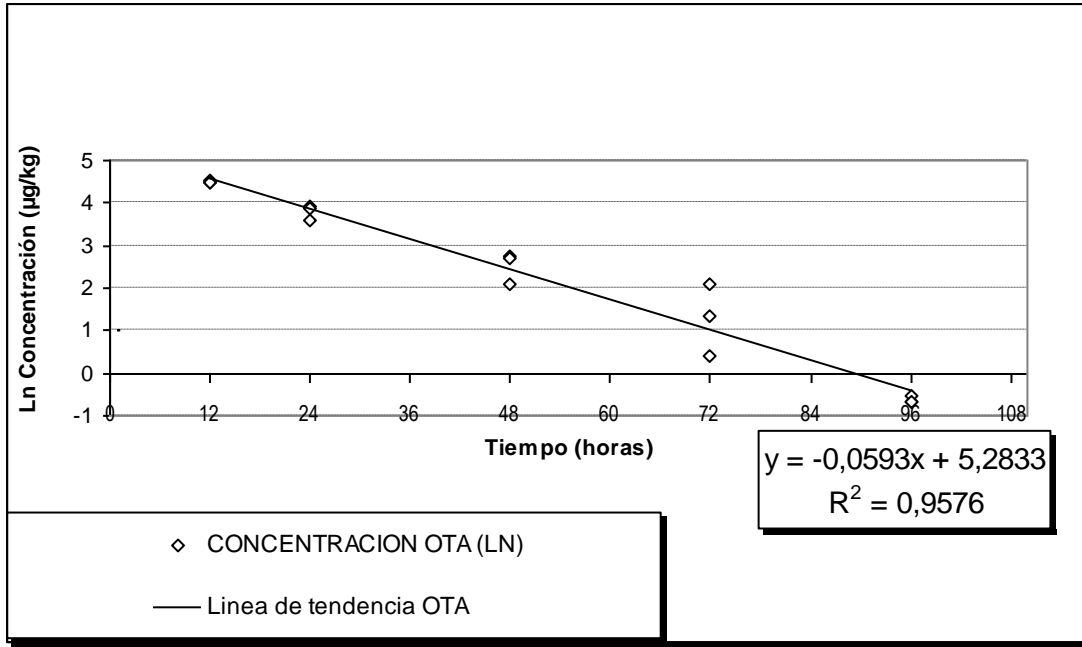
En relación al hígado las concentraciones de OTA fueron mayores que en músculos pectorales durante los 4 días posteriores a la exposición, observándose también su ausencia a las 120 horas. En el cuadro N° 11 se describen las concentraciones y en el gráfico N° 3 la tendencia de la eliminación en este tejido.

Cuadro N° 11. Concentración de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) cuantificadas en muestras de tejido hepático de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹, en diferentes tiempos de muestreo postadministración.

Horas Postadministración	Concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
12	90	90,0
12	91	
12	89	
24	36,4	44,9
24	51,2	
24	47,2	
48	8,2	13,0
48	15,6	
48	15,2	
72	3,9	4,5
72	8,1	
72	1,5	
96	0,5	0,5
96	0,6	
96	0,5	
120	ND ²	-
120	ND ²	
120	ND ²	

1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad. **2.** ND=no detectada.

Gráfico N° 3. Tendencia de eliminación de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de tejido hepático de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹.



1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad.

En cuanto al resto de los órganos analizados (corazón, estómago muscular y riñón), debido a que se tuvo que juntar los órganos de los 3 animales, los resultados obtenidos desde estos tejidos sólo se expresan descriptivamente en el cuadro N°12.

Cuadro N° 12. Concentración de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) cuantificadas en muestras compósitos de tejido de estómago muscular, corazón y riñón de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹, en diferentes tiempos de muestreo postadministración.

Horas Postadministración	Concentración $\mu\text{g}/\text{kg}$		
	Estómago muscular	Corazón	Riñón
12	157	11	27,6
24	35	4,2	26,8
48	4,8	0,7	12
72	1,6	0,5	6,1
96	ND	ND	1
120	ND	ND	0,8

1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad. **2.** ND=no detectada.

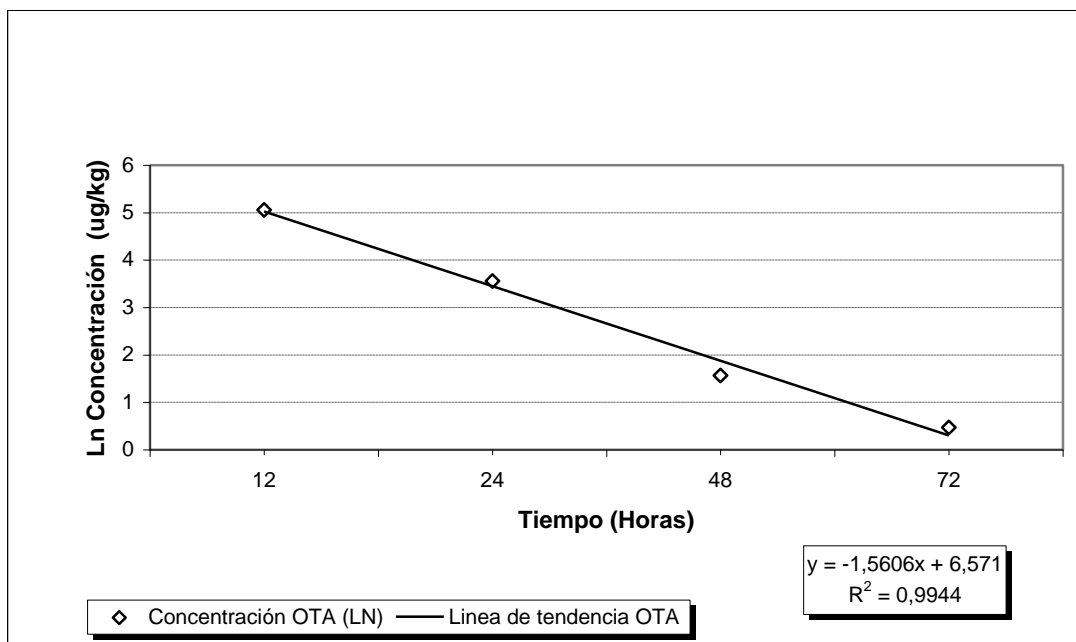
El estómago muscular, es el órgano que alcanzó la mayor concentración de OTA en el primer tiempo de muestreo (12 horas), sin embargo, en el segundo tiempo de muestreo se observa una drástica disminución y en la hora 96 se deja de cuantificar. En el gráfico N°4 se muestra la tendencia de eliminación de la OTA desde estómago muscular.

En corazón, la mayor concentración obtenida fue de $11 \mu\text{g}/\text{kg}$, disminuyendo rápidamente hasta niveles de $0,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ a las 48 horas y a $0,5$ a las 72 horas. A la hora 96 se deja de cuantificar (cuadro N° 12).

El riñón, pese a que no es un tejido destinado a consumo humano, también fue incluido en el análisis, fundamentalmente para observar el comportamiento en cuanto a niveles de acumulación y tendencia de eliminación en comparación al resto de los tejidos, debido a que toxicológicamente es éste el órgano blanco de esta micotoxina. Así se pudo determinar que, la concentración registrada en el primer tiempo de muestreo es menor a la de hígado, sin embargo, la OTA tendría un mayor tiempo de permanencia, debido a que en el último tiempo de muestreo (120 horas) aún se pudo cuantificar.

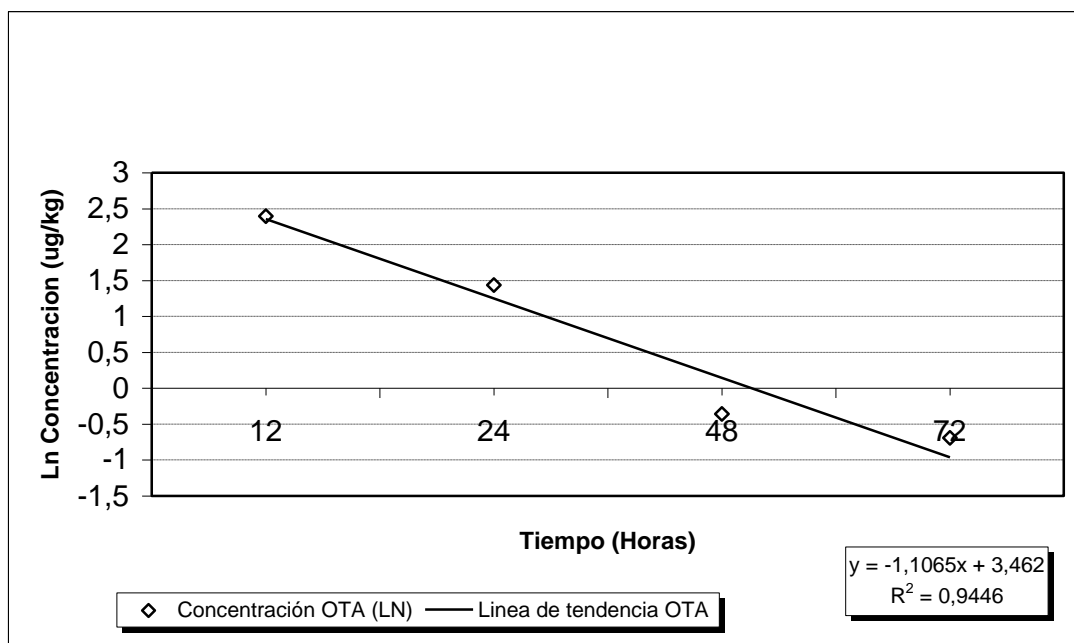
Los gráficos 4, 5 y 6 muestran la tendencia de la eliminación de la OTA desde estómago muscular, corazón y riñón, respectivamente, en una escala semilogarítmica.

Gráfico N° 4. Tendencia de eliminación de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestra compósito de tejido de estómago muscular de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹.



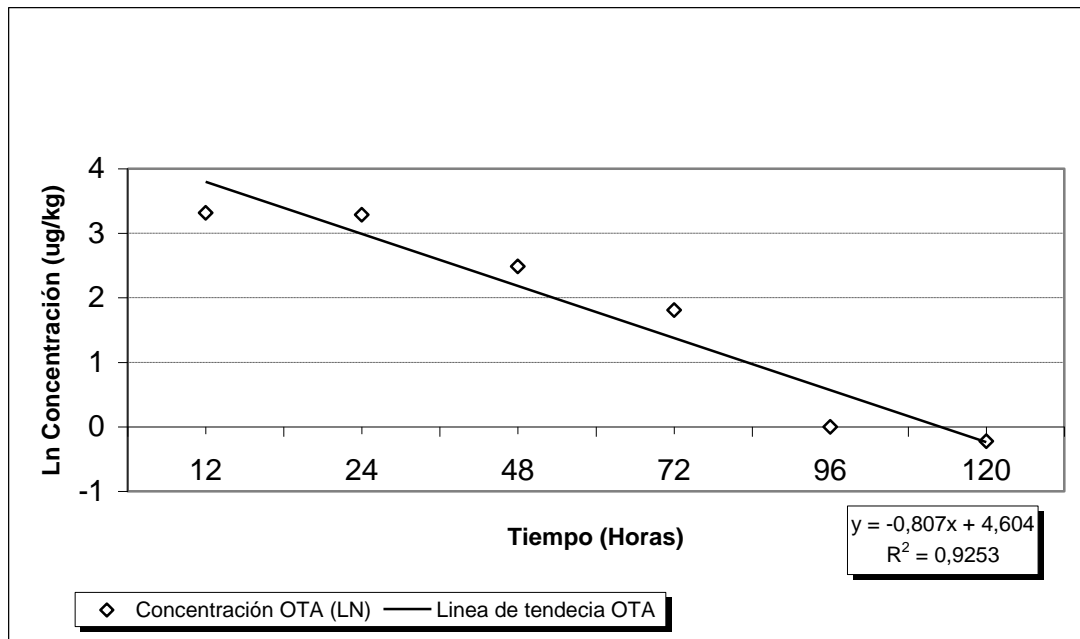
1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad.

Gráfico N°5. Tendencia de eliminación de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestra compósito de tejido de corazón de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹.



1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad.

Gráfico N° 6. Tendencia de eliminación de ocratoxina A ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestra compósito de tejido de riñón de pollos broiler expuestos experimentalmente a la micotoxina en dosis única de $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo¹.



1. N= 3 pollos broiler por grupo de tiempo de muestreo, inoculados vía oral en dosis única, a los 36 días de edad.

Cabe señalar que ninguno de los pollos expuestos manifestó síntomas de intoxicación ni se presentó mortalidad. Sin embargo, durante la necropsia realizada 24, 48 y 72 horas postinoculación, se identificaron lesiones en el buche caracterizadas por una hiperplasia de las células de la mucosa y un edema que rodea a esta zona, que correspondía a la lesión causada por la administración de la OTA, puesto que estas alteraciones no se evidenciaron en los pollos controles, a los que se les realizó el mismo procedimiento, pero con agua destilada. Las siguientes imágenes grafican lo anteriormente expuesto.

Figura N° 4. Buches de pollos broiler expuestos experimentalmente a ocratoxina A en una dosis única de 750 µg/kg de peso vivo, donde se observa una hiperplasia celular de la mucosa, a las 24 horas post inoculación.



1. Buche normal extraído de pollos broiler controles. **2.** Buche alterado presentando una hiperplasia en la mucosa.

Figura N° 5. Zona pectoral de pollo broiler expuesto experimentalmente a ocratoxina A en una dosis única de 750 µg/kg de peso vivo, donde se observa una edema rodeando el esófago y buche, a las 24 horas post inoculación.



1. Edema subcutáneo en la zona que rodea el esófago y el buche.

DISCUSIÓN.

La tendencia internacional, respecto a las micotoxinas, es establecer reglamentaciones para determinar LMR para los alimentos destinados al consumo humano. Para OTA se han establecido LMR en diversos países, pero fundamentalmente para alimentos de origen vegetal; la FAO realizó una revisión de los LMR los cuales van desde los 3 a los 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, fijando la mayoría de los países un LMR de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, aún no se ha establecido un LMR específico para alimentos derivados de pollos broiler. Dinamarca es uno de los países que ha fijado LMR para alimentos derivados de animales, pero sólo para cerdos, cuyos tejidos pueden consumirse si el contenido del riñón no supera los 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (FAO, 2004).

En la primera etapa del ensayo, cuyo objetivo fue establecer una dosis de exposición que generara residuos de OTA cuantificables 24 horas post inoculación, solamente se alcanzó el límite de cuantificación en el tejido muscular con el nivel de exposición más alta (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo). No obstante, en el tejido hepático se alcanzaron mayores concentraciones (4,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$), las que fueron cercanas al LMR más frecuentemente establecido a nivel mundial. Respecto al resto de los tejidos, se alcanzaron niveles cuantificables en corazón, en estómago muscular y en riñón. Sólo éste último presentó residuos por sobre los 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sin embargo, este tejido no es destinado al consumo humano.

Ante los resultados anteriormente descritos, para la segunda etapa, se decidió realizar una exposición única de 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, cantidad equivalente a la dosis más alta del primer ensayo, que fue de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo por día durante 3 días, esperando que con esta administración aguda se saturarán los mecanismos detoxificadores y, en consecuencia, los residuos detectados en los tejidos fueran mayores y permanecieran por un tiempo mayor a 24 horas.

En el tejido muscular, durante el primer tiempo de muestreo (12 horas post inoculación), se cuantificó una concentración promedio de 6,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, midiéndose concentraciones hasta el muestreo realizado a las 96 horas post inoculación. Detecciones

por debajo del LMR de referencia fueron cuantificadas en el tercer tiempo de muestreo (48 horas post inoculación). Por otra parte, en el hígado, en el primer tiempo de muestreo (12 horas post inoculación) se alcanzaron niveles muy por sobre de lo cuantificado en músculos pectorales, llegando a los 90 µg/kg. Detecciones por debajo del LMR de referencia fueron cuantificadas en el cuarto tiempo de muestreo (72 horas post inoculación). Sin embargo, al igual que en músculos pectorales, se obtuvieron niveles cuantificables hasta el muestreo realizado a las 96 horas post inoculación, lo cual indica que proporcionalmente la depleción se realiza más rápidamente en hígado que en músculos pectorales.

Considerando los resultados anteriormente descritos, es posible señalar que pollos broiler expuestos a OTA en niveles como los realizados en este ensayo, genera concentraciones residuales cuantificables en los tejidos comestibles, siendo menores en músculos pectorales que en hígado.

El estómago muscular fue el que presentó los mayores niveles de residuos (157 µg/kg) en el primer tiempo de muestreo (12 horas post inoculación), debido a que la administración se realizó por vía oral. En este tejido, concentraciones por debajo del LMR de referencia, se presentaron en el tercer tiempo de muestreo (48 horas), dejándose de cuantificar ya en el muestreo realizado a las 72 horas post inoculación.

Experiencias recopiladas por Ringor *et al.*, indican que la distribución en aves seguiría el siguiente orden: riñón > hígado > músculo > grasa o bien riñón > músculo > hígado > grasa. A partir de los resultados conseguidos en este trabajo, es posible señalar que la distribución en tejidos de pollos broiler que reciben 750 µg/kg de peso vivo oralmente vía sonda directamente al buche, a las 12 horas post inoculación, seguiría el siguiente orden: estómago muscular > hígado > riñón > corazón > músculos pectorales.

En el estudio de Biró *et al.*, (2002), se administró un total de 2 mg de OTA durante 4 semanas y las mediciones en plasma, hígado, riñón y músculos pectorales se realizaron

por medio de ELISA y HPLC. Las mayores concentraciones, al igual que en este estudio, se obtuvieron en hígado, seguido por riñón y músculos pectorales.

Debido a que es el hígado el órgano donde se acumula la mayor parte de la toxina y además, donde se mantiene por más tiempo, es este el tejido que debiera muestrearse en caso que se sospechara de consumo de OTA, lo que confirma lo propuesto en el estudio realizado por Micco *et al.*, (1987), respecto a considerar a este órgano como el tejido blanco a la hora de implementar un sistema de control de residuos para OTA en pollos broiler.

Además, con lo descrito anteriormente, queda de manifiesto que con la dosis de OTA administrada a los pollos, el consumo de sus tejidos constituiría un riesgo por encontrarse por sobre el LMR considerado como de referencia. Frente a lo expuesto cabe preguntarse si es posible, en condiciones de campo, niveles de contaminación de las raciones para pollos que provoquen una exposición similar a la realizada en este estudio.

En nuestro país, existen poca información científica para determinar la real incidencia y nivel de contaminación de OTA en los productos vegetales. Sólo a nivel privado, en los planteles de cerdos y aves, se realizan mediciones de ésta y otras micotoxinas en las raciones utilizadas para alimentar a los animales, pero principalmente en casos en que se sospecha de una micotoxicosis. Estos resultados no son conocidos ni publicados. Debido a las condiciones ambientales para el desarrollo fúngico descritos (FAO, 2003), el principal riesgo lo constituirían aquellos productos alimenticios importados desde países con condiciones de temperatura y humedad más favorables para el desarrollo fúngico.

Estudios han descrito niveles de contaminación en raciones de animales por debajo de los 200 µg/kg, sin embargo, en alimentos asociados a cuadros de nefropatías en aves se han reportado niveles de contaminación por sobre los 27,5 mg/kg (Leeson *et al.*, 2005). Asimismo, Hamilton *et al.*, (1982), midió niveles de contaminación en alimentos causantes de ocratoxicosis natural en aves, encontrándose un amplio rango de concentraciones, las que fluctuaron entre 0,2 y 16 mg/kg. Una revisión realizada en el año 1992, a partir de

distintos estudios en diferentes países, llevada a cabo por la International Union of Pure and Applied Chemistry (Pohland *et al.*, 1992), se describen niveles de contaminación en raciones de pollos broiler de 50 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En otro estudio más reciente se analizaron muestras de alimento contaminado en forma natural, en que se detectaron valores entre 110 y 930 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Shlosberg *et al.*, 1997).

A los pollos broiler de este ensayo, de 36 días de edad y 2 kg de peso vivo promedio, se les administró OTA en una concentración de 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, que correspondió a una dosis de exposición total de 1,5 mg. Considerando los datos de las revisiones anteriormente descritas, se puede señalar que en condiciones de naturales sería posible un grado de contaminación tal, que genere una exposición similar a la realizada en este trabajo. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario obtener datos de contaminación bajo las condiciones actuales de manejo y almacenamiento de los alimentos.

Además, resultaron interesantes las lesiones encontradas en el buche al realizar la necropsia de las aves. Cabe señalar, que es la primera vez que se describe esta lesión a nivel nacional y no se encontró una descripción similar a nivel internacional. La importancia de este hallazgo, radica en que a nivel de planteles avícolas existe la posibilidad de identificar esta lesión anatomopatológica al hacer la necropsia, que puede asociarse al consumo de OTA, constituyendo una herramienta diagnóstica, previa al análisis de laboratorio.

En resumen, los resultados obtenidos permiten señalar que en tejidos de pollos broiler con un nivel de ingestión de OTA de 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo genera residuos cuantificables, los cuales permanecen hasta por 4 días. Las principales conclusiones de este trabajo se expresan a continuación.

CONCLUSIONES

1.- En tejidos de pollos broiler expuestos a 250 μg de ocratoxina A por kg de peso vivo durante 3 días mediante inoculación vía oral, registran concentraciones residuales cuantificables en tejido hepático y de músculos pectorales.

2.- En tejidos de pollos broiler expuestos a una dosis única de 750 μg de ocratoxina A por kg de peso vivo vía oral, se registran concentraciones residuales cuantificables en hígado y músculos pectorales hasta por 4 días post inoculación.

3.- Las concentraciones residuales cuantificadas en tejidos de pollos broiler expuestos a una dosis única de 750 μg de ocratoxina A por kg de peso vivo inoculados vía oral, son superiores a los declarados reglamentariamente como inocuos para la población humana, por tiempos mayores a 24 horas.

4.- El hígado, fue el órgano en que se cuantificaron mayores concentraciones de ocratoxina A y su eliminación llevó más tiempo, constituyéndose como el órgano blanco al querer identificar la presencia de esta micotoxina.

5.- Las lesiones anatomopatológicas identificadas en el buche, permitirían a nivel de planteles avícolas realizar un diagnóstico rápido a través de una necropsia, ante sospecha de exposición a esta micotoxina.

BIBLIOGRAFÍA.

- **ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; ACCENSI, F.; CABAÑES, F.J.** 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev. Iberoam. Micol. 17: s63-s68.
- **BENNETT, J.W; KLICH, M.** 2003. Mycotoxins. Clinic. Microb. Rev. 16 (3): 497-516.
- **BIRÓ, K; SOLTI, L; BARNA-VETRÓ, I; BAGÓ, G; GLÁVITS, R; SZABÓ, E; FINK-GREMMELS, J.** 2002. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. Av. Pat. 31: 141-148.
- **CARRILLO, L.** 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Argentina. Capitulo 1, pp.1-24. [en línea]
<<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micologia.htm>> [consulta 31-05-2006]
- **CAST. COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY.** 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Ames, Iowa, United States. Pp. 1-200.
- **DIRECTIVA 2005/5/CE.** 2005. Modificación de la Directiva 2002/26/CE con respecto a los métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido de ocratoxina A en determinados productos alimenticios. Diario oficial de la Unión Europea.
- **ELIKA. FUNDACIÓN VASCA PARA LA SEGURIDAD AGROALIMENTARIA.** 2003. Micotoxinas. pp. 1-17.

- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y raciones en el año 2003. Estudio FAO alimentación y nutrición 81. Roma. pp. 1-60.
- **FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas, Estudio FAO alimentación y nutrición 73. pp. 1-25.
- **GOLINSKI, P.; CHELKOWSKI, J.; KONARKOWSKI, A.; SZEBIOTKO, K.** 1983. Mycotoxins in cereal grain. Part VI. The effect of ochratoxin A on growth and tissue residues of the mycotoxin in broiler chickens. **In:** The EFSA Journal, 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related of Ochratoxin A as undesirable substance in animal feed. 101: 1-36.
- **HAMILTON, P.B.; HUFF, W.E.; HARRIS, R.; WYATT, R.** 1982. Natural occurrences of Ochratoxicosis in poultry. Poultry Science 61: 1832-1841.
- **IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER.** 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **In:** FAO. 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas, Estudio FAO alimentación y nutrición 73. pp. 1-25.
- **ICMSF. INTERNATONAL COMISIÓN ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS.** 2001. Microorganismos de los alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Capítulo 8. Cereales y derivados. pp. 293-331.

- **KROGH, P.; ELLING, B.; HALD, B.; JYLLING, B.; PETERSEN, V.; SKADHAUGE, E.; SVENDSEN, C.** 1976. Changes in renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 84:215-221.
- **LEESON, S.; DÍAZ, G.; SUMMERS, J.** 1995. Ochratoxins. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books. Guelph, Ontario, Canadá. pp. 227-248.
- **LÓPEZ DE CERAIN, A.; JIMÉNEZ, A.M.; EZPELETA, O.; BELLO, J.** 2000. Efectos tóxicos de la ocratoxina A. *Rev. Toxicol.* 17.pp. 61-69.
- **LÓPEZ, L.** 1988. Introducción al tema de micotoxinas y micotoxicosis. *Bol. mic.* 4 (1):1-25.
- **MARQUARDT, R.; FROHLICH, A.** 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.
- **MICCO, C.; MIRAGLIA, M.; ONORI, R.; LOPPOLO, A.; MANTOVANI, A.** 1987. Long-Term administration of low doses of mycotoxins in poultry. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens. *Poult. Sc.* 66: 47-50.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 1997. Decreto supremo N° 977 Reglamento sanitario de los alimentos. pp. 60.
- **PITT, J.L.** 2000. Toxigenic fungi and mycotoxin. *Brit. Med. Bull.* 56 (1): 184-192.
- **POHLAND, A.; NESHEIM, S.; FRIEDMAN, L.** 1992. Ochratoxin A: A review (Technical report). International Union of Pure and Applied Chemistry Pure & Appl. Chem. 64 (7): 1029-1046.

- **PRIOR, M.G.; O'NEIL, J.B.; SISODIA, C.S.** 1980. Effects of ochratoxin A on growth response and residues in broilers. *Poultry Science*. 59: 1254-1257.
- **RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y-J.; LARONDELLE, Y.** 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem.-Biol. Interac.* 159: 18-46.
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO,** 1991. Resolución Exenta N° 707. [en línea] Micotoxinas, rol e importancia en nutrición acuícola, Tabla 12.4. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S13.htm> [consulta 15-01-2007]
- **SHLOSBERG, A.; ELKIN, N.; MALKINSON, M.; ORGAD, U.; HANJI, V.; BOGIN, E.; WEISMAN Y.; MEROZ, M.; BOCH, R.** 1997. Severe hepatopathy in geese and broilers associated with ochratoxin in their feed. *Mycopat.* 138: 71-76.
- **SWAMY, H.V.L.N.** 2005. Mycotoxicoses in poultry: an overview from the Asia-Pacific region. Alltech Biotechnology Inc. Bangalore, Karnataka, India. pp. 75-88.
- **VALENTA, H.** 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Jour. of Chromat.* 815: 75-92.