

# Presencia de zearalenona en pasturas del este de Chaco

SALVAT, A.E.<sup>1</sup>; BALBUENA, O.<sup>2</sup>; RICCA, A.<sup>3</sup>; COMERIO, R.M.<sup>4</sup>; ROSELLO BRAJOVICH, J.E.<sup>2</sup>; ROJAS, D.<sup>3</sup>; BERRETTA<sup>4</sup>, M.F.; DELSSIN, E.<sup>2</sup>; BEDASCARRASBURE, E.<sup>3</sup>; SALERNO, J.C.<sup>5</sup>

## RESUMEN

Se estudió la presencia de zearalenona en pasturas y alimentos que son utilizados para la producción de bovinos de carne de la zona este de la provincia del Chaco. Asimismo, se realizó el aislamiento e identificación de diversas especies de *Fusarium* y se determinó su capacidad de producir zearalenona en condiciones de laboratorio. La determinación química de la toxina se realizó mediante las metodologías HPLC y ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se analizaron 29 muestras y en 17 de ellas se confirmó la ocurrencia natural de zearalenona en cantidades variables. Se identificaron 63 aislamientos que correspondieron a *Fusarium* cf. *acuminatum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* y *F. semitectum*, confirmándose además la producción *in vitro* de zearalenona en 34 de éstos aislamientos.

**Palabras clave:** micotoxinas, *Fusarium*, pastos.

## ABSTRACT

*Natural occurrence of zearalenone in grassland, improved pastures and feeds for cattle in eastern Chaco province (Argentina) was surveyed. Besides, isolation, identification and toxicogenic capacity of several Fusarium species were carried out. HPLC and ELISA techniques were used for detection of the toxin. In 17 of 29 samples zearalenone presence was confirmed. Sixty- three Fusarium isolates corresponding to Fusarium cf. acuminatum F. chlamydosporum, F. equiseti, F. oxysporum and F. semitectum were identified. On the other hand, in vitro production of zearalenone was verified in 34 of these isolates.*

**Key words:** mycotoxins, *Fusarium*, grasses.

<sup>1</sup>INTA Castelar, Instituto de Patobiología, CICVyA-INTA. C.C. 25 1712 Castelar. Correo electrónico: asalvat@cnia.inta.gov.ar

<sup>2</sup>EEA Colonia Benítez. CR Chaco-Formosa. Marcos Briolini s/n (3505) Colonia Benítez. Chaco.

<sup>3</sup>INTA Castelar, Instituto de Tecnología de Alimentos. CIA-INTA. C.C. 25 1712 Castelar.

<sup>4</sup>INTA Castelar, Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. CICVyA-INTA. C.C. 25 1712 Castelar.

<sup>5</sup>INTA Castelar, Instituto de Genética. CICVyA-INTA. C.C. 25 1712 Castelar.

## INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas constituyen un grupo de metabolitos de alta toxicidad producidos por diversas especies de hongos (Smith and Moss, 1985) que están relacionados con el deterioro de los alimentos y de los forrajes. Estos metabolitos ejercen su efecto principalmente por ingestión y provocan en el hombre y en los animales disturbios en la salud denominados micototoxicosis (Quiroga M.A., 2002). El género *Fusarium* contiene un gran número de especies que producen diversas micotoxinas entre la que se encuentra la zearalenona (ZEA), cuyo principal metabolito es el  $\alpha$ -zearalenol, responsable del síndrome conocido como estrogenismo (Derache R., 1990). Ciertas condiciones como la época del año, la especie vegetal y el ambiente inciden sobre el desarrollo de los hongos y la producción de ZEA en las pasturas (Kennedy, D. *et al.*, 1998; Skládanka J. *et al.*, 2011; Laser. H. *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2004).

El efecto tóxico que ejerce la ZEA es variable según sea la especie animal involucrada. Por ejemplo, los rumiantes en general, comparados con los monogástricos, son menos susceptibles a los efectos estrogénicos de la ZEA y en ese mismo sentido, también existen diferencias de susceptibilidad entre las diferentes especies de rumiantes (Malekinejad *et al.*, 2006). En relación a la toxicidad observada en los animales de interés económico, existen numerosos estudios realizados en Nueva Zelanda y Australia que confirman un deficiente rendimiento reproductivo de las ovejas expuestas a pasturas con ZEA sobre todo en los meses de otoño (Annual Report 1991/1992; Towers, N.R. *et al.*, 1995a; Towers, N.R. *et al.*, 1995b). Además, hay que tener en cuenta que los rumiantes alimentados con pasturas o alimentos contaminados con ZEA excretan metabolitos en la orina, como  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol, zeranol y teleranol en cantidades variables. Como es sabido, el zeranol es una droga que se utiliza como promotor de crecimiento cuyo uso se encuentra prohibido en la Unión Europea y en nuestro país. Justamente su presencia en orina es utilizada como indicador de su administración ilegal a los animales. Existen evidencias sobre la presencia de zeranol en la orina de ciervos, cabras, ovejas, bovinos y caballos que solo recibieron alimentación a base de pastos. Esta situación se encuentra estrechamente relacionada con la ocurrencia natural de ZEA (Thevis M. *et al.*, 2011; Miles C.O. *et al.*, 1996; Erasmuson, A. *et al.*, 1994; Towers, N.R. *et al.*, 1995a; Towers, N.R. *et al.*, 1995b; Launay F. M. *et al.*, 2004; Kennedy, D. G. *et al.*, 1995).

En lo que respecta a nuestro país no se registran antecedentes científicos de exposición de rumiantes a ZEA por el consumo de pasturas. No obstante, Lori, G. (comunicación personal) detectó la presencia de ZEA y *Fusarium graminearum* en gramíneas de la zona de Bragado (Buenos Aires) relacionadas con casos de abortos en cerdas. Asimismo, Louge Uriarte *et al.* (2006) hallaron ZEA en una pastura consociada del sudeste bonaerense y, por su parte, Ramírez M.L. (comunicación personal) en el año 2011, identificó especies de *Fusarium* potencialmente productoras de ZEA a partir de pasturas del noreste argentino (NEA).

Históricamente, el NEA es considerado la segunda zona de importancia en cantidad de cabezas de ganado y de producción de carne de nuestro país, sobre todo en los últimos años en donde se evidenció un progreso de la actividad ganadera de la región (Canosa F. *et al.*, 2009). El pastizal natural es el principal recurso forrajero de los rodeos vacunos para carne en la región. Las pasturas más difundidas son *Setaria*, *Dicantio* y *Estrella* en el este, mientras que *Gatton Panic* y *Gramma Rhodes* lo son en el oeste del NEA. Desde hace más de una década se fue propagando y aplicando la práctica de la suplementación invernal con granos y fuentes proteicas incluyendo recientemente el empleo de reservas en forma de heno (rollos) y el silaje de planta entera de sorgo y maíz. Tanto los insumos utilizados en la suplementación (Ricca, A.P. *et al.*, 2011) como las reservas forrajeras, las pasturas cultivadas y el campo natural pueden ser sustratos para el desarrollo de especies de *Fusarium* productoras de ZEA.

El objetivo del presente trabajo fue realizar una evaluación preliminar de la presencia de ZEA y un relevamiento de las especies fúngicas presentes con capacidad de producir esta toxina en las pasturas y alimentos durante el verano, en el este de la provincia del Chaco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras

El muestreo se realizó en diciembre de 2011 y enero de 2012. Se tomaron un total de 29 muestras de especies del pastizal natural y de pasturas cultivadas en siete establecimientos ganaderos situados en los departamentos 1.º de Mayo, San Fernando y San Lorenzo de la provincia del Chaco. Para las muestras de pasto verde se utilizó un cuchillo inoxidable con el cual se cortó a 10 cm de altura la muestra hasta completar aproximadamente 400 g de materia seca. Cada muestra fue compuesta por 20 a 30 sub-muestras individuales. Las muestras se tomaron por ambiente (bajo, alto, media loma) predominante en los potreros. El material muerto en forma de mantillo se tomó directamente con la mano, tratando de que no se contamine con el suelo donde estaba depositado. Además, en uno de los establecimientos, se obtuvieron muestras de heno (rollos) de diferentes gramíneas y suplementos que habían sido utilizados en el invierno anterior. Las muestras fueron acondicionadas en bolsas de papel y secadas al aire dentro de las bolsas hasta su envío, en el cual transcurrieron como máximo cinco días hasta su llegada a laboratorio donde se prosiguió con su acondicionamiento y análisis.

### Acondicionamiento de las muestras

El material fresco se secó en estufa a 30 °C durante siete días y se trituró en una máquina especial para picar forrajes (TRAPP TRF70®). Este material molido se conservó en bolsas de papel a temperatura ambiente, al abrigo de la humedad y la luz solar hasta el momento de ser procesado.

### Análisis de zearalenona en pastos

La extracción de ZEA, se realizó con acetonitrilo:agua (75:25) alternando agitación y sonicación durante 30 minutos. Luego de centrifugar la mezcla, se purificó el sobrenadante con columnas de inmunoafinidad (R-Biopharm). El extracto purificado fue estudiado por HPLC-FLD (Waters Alliance System) (Schuhmacher, R., *et al.*, 1998; Eskola, M. *et al.*, 2002; De Saeger, *et al.*, 2003). Los análisis se realizaron con un volumen de inyección de 30  $\mu$ l. Las condiciones cromatográficas fueron: columna RP (C18; 150 x 4,6 mm; 3 mm), fase móvil de acetonitrilo:agua al 50% con un flujo de 0,2 ml/min y la detección fue a  $\lambda_{exc}$  = 274 nm,  $\lambda_{em}$  = 440 nm. El límite de cuantificación fue: 2  $\mu$ g/kg.

### Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium*

Se analizaron hojas y tallos con y sin síntomas de enfermedades. El material vegetal se desinfectó con etanol 70% durante 10 segundos seguido de hipoclorito de sodio 10% durante 10 segundos extra. Se secó bajo mesada de flujo laminar y se fragmentó asépticamente con la utilización de pinzas y tijeras. Dichos fragmentos (5x5 mm) se sembraron en 20 placas de Agar Agua, adicionado con 400 ppm de cloranfenicol, a razón de cinco trocitos por caja (100 fragmentos en total). Los cultivos se incubaron durante cinco días a 25 °C – 30 °C bajo ciclos de U.V. cercano y oscuridad (12 h/12 h). Una vez desarrollados los cultivos se observaron bajo microscopio estereoscópico (Wild M5®) y el material fúngico compatible con el género *Fusarium* se transfirió asépticamente a placas de Agar Clavel y Agar Papa Dextrosa. Los cultivos se incubaron durante 14 días a 25°C - 30°C bajo ciclos de U.V. cercano y oscuridad (12 h/12 h). Se realizaron preparados entre portaobjetos y cubreobjetos con azul de algodón al 0,1% en ácido láctico al 85% como líquido de montaje. Las observaciones microscópicas se realizaron a los tres y a los 14 días de incubación con un microscopio Zeiss Axiostar Plus®. Las identificaciones se realizaron mediante la observación e interpretación de las características culturales y microscópicas de acuerdo con Gerlach & Nirenberg (1982), Nelson *et al.* (1983) y Leslie *et al.* (2006).

### Análisis molecular

Un aislamiento de *Fusarium semitectum* se caracterizó a nivel de secuencia nucleotídica de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) de los genes ribosomales. Las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos universales ITS1 e ITS4 (White *et al.* 1990) y el producto de PCR fue secuenciado por el Servicio de Secuenciación del CICVyA-INTA.

### Análisis *in vitro* de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *Fusarium*

Se esterilizaron (121 °C, 15 minutos) 200 g de arroz blanco + 100 ml de agua en frascos de 1,5 litros de capacidad. Por otra parte, una ansada de cultivo en Agar Clavel (20 días de incubación), se suspendió en 5 ml de agua peptonada (AP) al 0,1% con 0,05% de Tween 20. La inoculación de los

frascos se realizó mediante la transferencia de los 5 ml de AP que contenían la suspensión de conidios sobre la masa de arroz estéril. Los cultivos en arroz se incubaron durante un mes a 26 °C – 28 °C. Transcurrido ese período, los frascos fueron autoclavados y su contenido conservado a - 20 °C hasta su análisis. La determinación de la ZEA en los cultivos anteriormente descritos, se realizó mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) Ridascreen®Fast Zearalenon (R-Biopharm – Alemania). La toxina se extrajo con metanol al 70% durante 24 hs. El extracto se filtró a través de papel y una alcuota se eluyó a través de una columna de limpieza de fase sólida. El filtrado se diluyó 1:1 con agua destilada y se analizó. Se utilizaron 5 estándares (0, 50, 100, 200 y 400 ppb). Se determinó la absorbancia a 450 nm en lector (Bio-tek® ELx800); límite de detección: 50  $\mu$ g/kg (ppb).

## RESULTADOS

El análisis químico de las muestras permitió detectar la ocurrencia natural de ZEA en los diferentes sustratos. La tabla 1 muestra los valores de ZEA hallados en los distintos tipos de pasturas y alimentos muestreados en la provincia del Chaco. El 35% de las muestras presentó valores entre 10,68  $\mu$ g/kg y 577,62  $\mu$ g/kg (ppb), mientras que el 24% de éstas evidenció trazas de ZEA (< 2  $\mu$ g/kg). De manera que se halló ZEA en el 59% del material analizado.

Se determinaron 63 aislamientos de *Fusarium* provenientes de siete muestras y se observó la presencia mayoritaria de especies con reconocida capacidad toxicogénica como *F. equiseti*, *F. oxysporum* y *F. semitectum* (Leslie *et al.*, 2006). Además, se determinaron tres aislamientos de *F. chlamydosporum* y uno de *F. cf. acuminatum* (tabla 2).

La secuencia de ADN de las regiones ITS del aislamiento de *F. semitectum* se comparó con la base de datos de *Fusarium* ID, a fin de complementar los resultados morfológicos de la especie productora de ZEA mayoritariamente identificada en el presente trabajo. Se obtuvo 100 % identidad con la secuencia correspondiente de 16 aislamientos depositados en la ARS Culture Collection (NRRL) bajo la denominación de complejo de especies *Fusarium incarnatum – equiseti*.

Se seleccionaron 48 aislamientos representativos (entre los 63 totales) para analizar su capacidad de producir toxina. En la tabla 3 se muestra la proporción de aislamientos toxicogénicos obtenidos, como así también el intervalo de producción de ZEA de los mismos.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se observó que, en las muestras analizadas, las concentraciones de ZEA presentaron en su mayoría cantidades relativamente bajas, que no inducirían a síntomas severos de estrogenismo en los animales. Estos valores posiblemente estén relacionados con la época del año (verano) en que se realizó el muestreo. De acuerdo con Morris *et al.* (2005); Skládanka *et al.* (2011); Reed *et al.* (2004) y Laser *et al.* (2003) el mayor contenido de toxina en los pastos se presenta durante los meses de otoño. No obstante, dichos valores serían suficientes para que los me-

Tipo de muestra	Código de la muestra	Departamento	Concentración de ZEA µg/kg
Patura <i>Setaria geniculata</i> cv. Kasungula	A1	1ro. De Mayo	< 2,00
Pastizal <i>Leersia hexandra</i>	A2	1ro. De Mayo	ND
Pastura Pasto Estrella, <i>Cynodon plectostachyus</i>	A3	1ro. De Mayo	100,32
Material muerto o mantillo Pasto Estrella	A4	1ro. De Mayo	577,64
Rollo de pasto Mulato y Gatton	A5	1ro. De Mayo	10,68
Rollo mezcla de gramíneas	A6	1ro. De Mayo	< 2,00
Rollo de <i>Panicum maximum</i> , cv. Gatton	A7	1ro. De Mayo	205,02
Semilla entera de algodón	A8	1ro. De Mayo	26,49
Fardos de perilla de algodón (residuo desmote)	A9	1ro. De Mayo	235,22
Fardos de perilla y fibra de algodón (residuo de desmote)	A10	1ro. De Mayo	114,44
Pastizal de <i>Paspalum notatum</i>	B1	San Fernando	ND
Material muerto del monte	B2	San Fernando	ND
Pastizal de <i>Leersia hexandra</i> , <i>Luziola peruviana</i>	B3	San Fernando	ND
Pastizal de <i>Leersia hexandra</i> , <i>Luziola peruviana</i>	B4	San Fernando	ND
Pastura de <i>Panicum maximum</i> cv. Tanzania	B5	San Fernando	ND
Material muerto de Tanzania	B6	San Fernando	154,04
Material muerto o matillo Grama Rhodes	C1	San Fernando	ND
Pastura de Grama Rhodes	C2	San Fernando	ND
Material muerto o matillo de pastizal campo bajo	C3	San Fernando	ND
Pastizal de <i>Paspalum notatum</i> , <i>Leersia hexandra</i> , <i>Luziola peruviana</i> , <i>Eleocharis</i> sp.	C4	San Fernando	ND
Material muerto o matillo de pastizal campo bajo	C5	San Fernando	184,47
Material muerto del monte	C6	San Fernando	ND
Pastizal de <i>Leersia hexandra</i> , <i>Luziola peruviana</i> , <i>Diplachne</i> sp.	C7	San Fernando	11,49
Pastizal <i>hymenachne amplexicaulis</i> , <i>Leersia hexandra</i> , <i>Eleocharis</i> sp.	D1	San Lorenzo	< 2
Pastizal <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Panicum milioides</i> , <i>Leersia hexandra</i>	D2	San Lorenzo	< 2
Pastizal <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Setaria geniculata</i>	D3	San Lorenzo	ND
Pastizal <i>hymenachne amplexicaulis</i>	D4	San Lorenzo	< 2
Pastizal de <i>Leersia hexandra</i> , <i>Luziola peruviana</i>	D5	San Lorenzo	< 2
Pastizal <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Setaria geniculata</i> , <i>Paspalum notatum</i>	D6	San Lorenzo	< 2

ND: No detectado

**Tabla 1.** Presencia natural de ZEA en campos de la provincia del Chaco.

tabolitos de ZEA se pudiesen detectar en orina (Kleinova *et al.*, 2002) incluido el zeranól, cuya detección en los rodeos genera inconvenientes de índole legal (Kleinova M. *et al.*, 2002; Reed K.F. *et al.*, 2004; Erasmuson, A.F. *et al.*, 1994).

Está claro que el tipo de sustrato también influye sobre la ocurrencia natural de ZEA (EFSA, 2004; Sancho, A M., *et al.*, 2010). En este trabajo, una parte importante de las muestras constituidas por rollos, fardos de pasto, material muerto del monte o matillo presentaron los valores más altos de ZEA. Estos resultados coinciden con lo observado por Reed *et al.* (2009) y Smith *et al.* (2006), quienes señalan el aumento en el contenido de ZEA cuando el material muerto permanece de un año a otro en las pasturas.

Con respecto a las especies de *Fusarium* identificadas se observó la prevalencia de *F. semitectum* (72,9 %). El análisis de secuencia ITS de unas de ellas permitió identificarla como perteneciente al complejo de especies *Fusa-*

*rium incarnatum – equiseti* según se define en *Fusarium ID*. Tal cual se refleja en el análisis filogenético del grupo (Watanabe *et al.*, 2011) dicho complejo incluye a *F. semitectum* y *F. equiseti* que en la clasificación de Nelson *et al.* (1983) están reconocidas como especies autónomas. De acuerdo con Leslie *et al.* (2006) esta especie se aísla de diversas partes aéreas de plantas de zonas tropicales y subtropicales. Por otra parte, a diferencia de las otras especies de *Fusarium* identificadas en esta oportunidad, *F. semitectum* presentó una proporción elevada de aislamientos toxicogénicos. El mayor número de aislamientos de *Fusarium* se obtuvo de las muestras con elevada o intermedia concentración natural de ZEA (A4 y B6). En cuanto a las muestras de pastos en las que no se detectó ZEA, algunas no presentaron *Fusarium* spp. (muestras B3 y C4), y otras resultaron escasamente infectadas (muestras B1, B2, B4 y C3). Además, se observó en una muestra (A5) baja ocurrencia natural de ZEA y escasa recuperación de *Fusarium* en cultivo.

Código de la muestra	Especie	Nº de aislamientos	Frecuencia (%)
A4	<i>F. chlamydosporum</i>	3	4,8
A4	<i>F. semitectum</i>	18	28,6
A4	<i>F. equiseti</i>	8	12,7
A5	<i>F. semitectum</i>	5	7,9
B1	<i>F. oxysporum</i>	4	6,3
B2	<i>F. semitectum</i>	5	7,9
B3	ND	ND	0,0
B4	<i>F. semitectum</i>	1	1,6
B6	<i>F. semitectum</i>	13	20,6
B6	<i>F. verticillioides</i>	1	1,6
C3	<i>F. semitectum</i>	4	6,3
C3	<i>F. cf. acuminatum</i>	1	1,6
C4	ND	ND	0,0
<b>Total 63</b>			

ND = No se aisló *Fusarium*

**Tabla 2.** Frecuencia relativa de las especies de *Fusarium* según muestra analizada sobre un total de 63 aislamientos.

Código de la muestra	Especie	Nº de aislamientos totales	Nº de aislamientos analizados	Proporción de Tox/No Tox	Intervalo de producción de ZEA (µg/kg) **
A4	<i>F. semitectum</i>	18	11	10/11	0 - > 400
A4	<i>F. equiseti</i>	8	7	6/7	0 - > 400
A5	<i>F. semitectum</i>	5	5	4/5	0 - > 100
B1	<i>F. oxyporum</i>	4	4	0/4	0
B2	<i>F. semitectum</i>	5	2	2/2	> 400
B6	<i>F. semitectum</i>	13	13	7/13	0 - > 63
B6	<i>F. verticilloides</i>	1	1	0 / 1	0
C3	<i>F. semitectum</i>	4	4	4/4	> 400
C3	<i>F. cf. acuminatum</i>	1	1	1/1	> 400

\*\* Método ELISA

**Tabla 3.** Número, proporción de aislamientos de *Fusarium* toxicogénicos e intervalos de producción de ZEA

La capacidad de producir toxinas de las cepas aisladas se determinó por el método inmunoenzimático (ELISA), confirmándose que 34 aislamientos produjeron ZEA en condiciones de laboratorio y en cantidades variables. En las muestras C3 y B2, recolectadas en el campo, no se observó ocurrencia natural de ZEA pero se confirmó la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas (tablas 1 y 3). Este hecho podría indicar que los hongos se pudieron ver limitados en su desarrollo para producir la toxina en el campo, pero cuando se les dieron las condiciones adecuadas, como las que se logran en el laboratorio, esta situación se pudo revertir.

Este trabajo sugiere profundizar las investigaciones realizadas a fin de comprender mejor cuál es la dinámica de la producción de ZEA en pastos y alimentos utilizados en la ganadería, como así también establecer la relación que existe entre la ocurrencia natural de ZEA, y la posible presencia de zeranól en la orina de los rumiantes.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Director Nacional Eliseo Monti por su preocupación en el tema y su apoyo incondicional a la concreción de este trabajo.

El presente trabajo se realizó a través de fondos proveniente de los Proyectos INTA – PNECER 023521 en lo referido a las determinaciones cromatográficas, PAE. PICT N.º 41, y a los aportes de INTA en general. Quedamos en deuda con la actividad de los asistentes técnicos: Victoria Silva, Juan Carlos Torres, Susana Rojas y Alba Castro. Agradecemos al Dr. Héctor M. Godoy sus consejos para la realización de este trabajo y la lectura crítica del manuscrito.

## BIBLIOGRAFÍA

ANNUAL REPORT 1991/1992. Mycotoxin Research Grup. AgResearch. New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Ltd. *Fusarium* toxins, infertility and ill - thrift, 4-11.

- CANOSA, F.; IRIARTE, I.; TONELLI, V. 2009. El futuro de la ganadería. Boletín de la Asociación Argentina de AnGus. Bs. As. Sitio Argentino de Producción Animal, 1-6.
- DE SAEGER, S.; SIBANDA, L.; VAN PETEGHEM, C. 2003. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 487, 137-143.
- DERACHE, R. 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ediciones OMEGA. España, Barcelona. 485 p.
- EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* 89, 1-35
- ERASMUSON, A.F.; SCAHILL, B.G.; WEST, D.M. 1994. Natural zearanol (R-zearalanol) in the urine of pasture-fed animals. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2721-2725.
- ESKOLA, M.; KOKKONEN, M.; RIZZO, A. 2002. Application of manual and automated systems for purification of ochratoxine A and zearalenone in cereals with immunoaffinity column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 41 – 47.
- FUSARIUM ID (<http://isolate.fusariumdb.org/index.php>, verificado 30 de agosto de 2012).
- GERLACH, W.; NIRENBERG, H. 1982. The genus *Fusarium* – A Pictorial Atlas. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem* 209, 406 p.
- KENNEDY, D.G.; HEWITT, S.A.; MCEVOY, J.D.G.; CURRIE, J.W.; BLANCHFLOWER, W.J.; CANNAVAN, A.; MCCAUGHEY, W.J.; ELLIOTT, C.T. 1995. Possible naturally occurring zearanol in bovine bile in Northern Ireland. *J. Vet. Med.* 42, 509-512.
- KENNEDY, D.G.; MCEVOY, J.D. G.; HEWITT, S.A.; CANNAVAN, A.; BLANCHFLOWER, W. J.; ELLIOTT, C. T. 1998. Zearanol is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle in vivo. *Food Addit. Contam.* 15, 393-400.
- KLEINOVA, M.; ZOLLNER, P.; KAHLBACHER, H.; HOCHSTEINER, W.; LINDNER, W. 2002. Metabolic Profiles of the Mycotoxin Zearalenone and of the Growth Promoter Zearanol in Urine, Liver, and Muscle of Heifers. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4769-4776.
- LASER, H.; OPITZ v. BOBERFELD, W.; WOHLER, K.; WOLF, D. 2003. Effects of the Botanical Composition and Weather Conditions on Mycotoxins in Winter Forage from Grassland. *Mycotoxin Research* 19, 87-LAUNAY, F. M.; RIBEIRO, L.; ALVES, P.; VOZIKIS, V.; TSITSAMIS, S.; ALFREDSSON, G.; STERK, S.; BLOKLAND, M.; IITIA, A.; LÖVGREN T.; TUOMOLA, M.; GORDON, A. and KENNEDY, D. G. (2004). Prevalence of zearanol, tale-ranol and *Fusarium* spp. toxins in urine: implications for the control of zearanol abuse in the European Union. *Food Additives and Contaminants*. Vol. 21, Issue 9, 833-839
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A.; BULLOCK, S. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA. 388 p.
- LOUGE URIARTE, E.L.; ODRIÓZOLA, E.R.; FERNANDEZ, E.L.; MANAZZA, J.; ACHILLES, E. 2006. Primer hallazgo de zearalenona en pastura de una explotación ovina del sudeste bonaerense. 29.º Congreso Argentino de Producción Animal. Mar del Plata. Buenos Aires.
- MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. (2006). Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal* 172, 92-102.
- MILES C.O.; ERASMUSON A.F.; WILKINS A.L.; TOWERS N.R.; SMITH B.L.; GARTHWAITE I.; SCAHILL B.G.; and HANSEN R.P. (1996) Ovine Metabolism of Zearalenone to r-Zearalanol (Zearanol). *J. Agric. Food Chem.* 44, 3244-3250.
- MORRIS, C.A.; AMYES, N.C.; SPROSEN, J.M.; HAWKES, S.C.; FINCH, S.C.; MILES, C.O. 2005. Zearalenone challenge in sheep: urine sampling to measure response. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. Vol. 65, 316-319.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania. 183 p.
- QUIROGA, M.A. 2002. Efectos de la intoxicación aguda por micotoxina T-2 en el ratón. Estudios histopatológicos, ultraestructurales, inmunohistoquímicos y lectinohistoquímicos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata
- REED, K.F.M.; MOORE, D.D. 2009. A preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Australian silage and pasture. *Animal Production Science* 49, 696-703.
- REED, K.F.M.; WALSH, J.R.; MCFARLANE, N.M.; SPRAGUE, M. 2004. Zearalenone and its presence in pasture. *Animal Production in Australia* 25, 140-143.
- RICCA, A.P.; ROJAS, D.; SANCHO, A.M. 2011. Mycotoxins in grains of stored corn monitoring in argentine. II Conferencia Latinoamericana Cereales. ICC "Key for Cereal chain Innovation. (Exposición oral).
- SANCHO, A.M.; ROJAS, D.; PLA, L.; RICCA, A.P.; 2010. Principal component analysis and inference Shannon index to assess contamination of grains. *Revista del Grupo Argentino de Biometría*.
- SCHUHMACHER, R.; KRŠKA, R.; GRASSERBAUER, M.; EDINGER, W.; LEW, H. 1998. Immunoaffinity column versus conventional clean-up: a method comparison study for the determination of zearalenone in corn. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 360 Vol. 2, 241-245.
- SKLÁDANKA J.; NEDĚLNÍK, J.; VOJTĚCH, A.; DOLEŽAL, P.; MORAVCOVÁ, H.; VLASTIMIL D. 2011. Forage as a Primary Source of Mycotoxins in Animal Diets. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 37-50.
- SMITH, J.F.; MORRIS, C.A. 2006. Review of zearalenone studies with sheep in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. Vol. 66, 306-310.
- SMITH, J.E.; MOSS, M.O. 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*. John Wiley & Sons. Great Britain. 148 p.
- THEVIS, M.; FUBHOLLER, G.; SCHANZER, W. 2011. Zearanol: Doping offence or mycotoxin? A case-related study. *Short communication. Drug Testing and Analysis*. Vol. 3, 777-783.
- TOWERS, N.R.; SPROSEN, J.M.; WEBBER, W. 1995a. Zearalenone metabolites in cycling and non-cycling cows, .pp. 46-47. En: "Toxinology and Food Safety". *Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand*.
- TOWERS, N.R.; WESSELINK, C.; FOWKE, E.A.; SPROSE, J.M. 1995b. Plasma vs. urinary "zearalenone" concentrations as indicators of zearalenone intake, pp 41 In: "Toxinology and Food Safety". *Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand*.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, pp. 315 – 322.
- WATANABE, M.; YONEZAWA, T.; LEE, K.-I.; KUMAGAI, S.; SUGITA-KONISHI, Y.; GOTO, K.; HARA-KUDO, Y. 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evolutionary Biology* 11, 322.