



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA**

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de:

Magister en Ciencia de Alimentos

“Investigación de la flora fúngica resistente al calor y su capacidad toxicogénica en frutillas naturales y pulpas de frutillas para incorporar al yogur”

Por

Lic. Laura Noemí Frisón

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Basílico
Codirector: Dra. María de la Luz Zapata

A Gustavo, Rodrigo e Ignacio

A mi madre y a mi padre

Agradecimientos

A mi director de Tesis, Dr. Juan Carlos Basílico, por su permanente guía para la realización de este trabajo y por brindar generosamente sus conocimientos.

A mi codirectora de tesis, Dra. María de la Luz Zapata de Basílico, por su apoyo constante.

Al Dr. Haruhiro Fujimoto de Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japón, por haberme enviado tan gentilmente los Fumitremorgenos A y B.

Al Ing. Juan José de Jesús por haberme brindado sus conocimientos y experiencia en Cromatografía Líquida.

A Carolina Chiericatti y Liana Moragues por colaboración y amistad.

A mis compañeros por todos los momentos compartidos.

A los profesores de la carrera Magister en Ciencia de Alimentos, por todos los conocimientos brindados.

A toda mi familia, por su paciencia y amor.

Sinceramente, GRACIAS

RESUMEN

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

I. 1. Los mohos	1
I. 1. 1. Generalidades	1
I. 2. Taxonomía fúngica	3
I. 2. 1. Clasificación de los mohos de interés en alimentos	4
I. 2. 1. 1. División Zygomycotina	4
I. 2. 1. 2. División Ascomycotina	5
I.2. 1. 3. División Deuteromycotina	7
I. 3. Importancia de los hongos en las múltiples actividades humanas	8
I. 3. 1. Generalidades	8
I. 3. 2. Papel de los hongos en la biotecnología	9
I. 3. 3. Los hongos como agentes de deterioro de alimentos	10
I. 3. 3. 1. Parámetros que gobiernan el desarrollo de hongos en alimentos	11
I. 4. Hongos resistentes al calor	14
I. 4. 1. Generalidades	14
I. 4. 2. Principales hongos termorresistentes	17
I. 4. 2. 1. Género <i>Byssochlamys</i>	17
I. 4. 2. 2. Género <i>Talaromyces</i>	19
I. 4. 2. 3. Género <i>Eupenicillium</i>	20
I. 4. 2. 4. Género <i>Neosartorya</i>	20
I. 4. 2. 4. Caracterización de las variedades de <i>Neosartorya fischeri</i>	21
I. 4. 2. 4. Especies y variedades del género <i>Neosartorya</i>	22

I. 4. 2. 4. Morfología de las ascosporas y resistencia térmica.....	23
I. 5. Micotoxinas	24
I. 5. 1. Desarrollo fúngico y la producción de toxinas	24
I. 5. 2. Definición de micotoxinas	25
I. 5. 3. Micotoxicosis	26
I. 5. 4. Daños producidos por micotoxinas	29
I. 5. 5. Alimentos susceptibles de estar contaminados con micotoxinas	30
I. 5. 6. Factores que gobiernan la síntesis de micotoxinas	30
I. 5. 7. Hongos productores de micotoxinas	32
I. 5. 7. Género <i>Aspergillus</i>	33
I. 5. 7. Género <i>Penicillium</i>	34
I. 5. 7. Género <i>Fusarium</i>	35
I. 5. 7. Géneros toxicogénicos y sus toxinas	37
I. 5. 8. Control de las micotoxinas	40
I. 5. 9. Incidencia económica de las micotoxinas	41
I. 6. Hongos resistentes al calor productores de micotoxinas	42
I. 6. 1. Género <i>Byssoschlamys</i>	42
I. 6. 2. Género <i>Neosartorya</i>	43
I. 7. Toxinas tremorgénicas	43
I. 7. 1. Generalidades	43
I. 7. 2. Géneros fúngicos productores de toxinas tremorgénicas	46
I. 7. 2. 1. Género <i>Talaromyces</i>	46
I. 7. 2. 2. Género <i>Eupenicillium</i>	46
I. 7. 2. 3. Género <i>Neosartorya</i>	47
I. 8. Deterioro de las frutas	54
I. 8. 1. Microflora de los frutos	54

I. 8. 2. Frutos frescos. Alteración	55
I.8. 3. Frutas pasteurizadas. Alteración	57
I. 9. Las frutillas	59
I. 9. 1. Origen e historia	59
I. 9. 1. Tabla N° 1 Composición química de la frutilla	61
I. 9. 2. Producción e industrialización	62
I. 9. 3. Zonas productoras	62
I. 9. 4. Situación de la región de Coronda	63
I. 9. 5. Cosecha	65
I. 9. 6. Comercialización	66
I. 9. 6. Fuentes de contaminación	67
OBJETIVOS	70

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

II. 1. Muestras	72
II. 2. Aislamiento e identificación de la flora fúngica resistente al calor	72
II. 2. 1. Aislamiento	72
II. 2. 1. a) Preparación de las muestras	72
II. 2. 1. b) Proceso térmico	73
II. 2. 1. c) Siembra	73
II. 2. 1. d) Incubación	74
II. 2. 1. e) Aislamiento	74
II. 2. 1. f) Esquema de la metodología utilizada	75
II. 2. 2. Estudio de la presencia de <i>N.fischeri</i> en frutillas para agregar al yogur.....	76
II. 2. 3. Identificación	76
II.2.3.Tabla N° 2 Características microscópicas de géneros	

teleomorfos correspondientes a <i>Aspergillus</i>	78
II. 2. 3. Tabla Nº 3 Características microscópicas de géneros teleomorfos correspondientes a <i>Penicillium</i>	78
II. 3. Estudio de la capacidad toxicogénica de <i>N.fischeri</i> aislados de frutillas y cultivados en arroz	79
II. 3. 1. Producción y extracción de la toxina	79
II. 3. 2. Standares utilizados	81
II.3.3. Determinación de las toxinas por Cromatografía en capa delgada	81
II. 3. 3. a) Detección de Fumitremorgeno A (FTA)	81
II. 3. 3. b) Detección de Fumitremorgeno B (FTB)	82
II. 3. 3. c) Detección de Verruculogeno (V)	84
II. 3. 3. d) Comparación de las propiedades de FTA, FTB y V (Tabla Nº 4) ..	86
II. 3. 3. e) Siembra del extracto clorofórmico	87
II. 3. 3. f) Diagrama para estudiarla capacidad toxicogénica de <i>N.fischeri</i> aisladas de frutillas y cultivadas en arroz	88
II. 3. 3. g) Ensayo de recuperación	89
II. 3. 4. Determinación de las toxinas por HPLC	90
II. 3. 4.a) Equipo	90
II.3.4.b) Descripción	90
II. 3. 4.c) Válvula de mezcla	90
II. 3. 4. d) Bomba	90
II. 3. 4. e) Sistema de inyección	90
II. 3. 4. f) Columna	91
II. 3. 4. g) Detector	91
II. 3. 4. h) Microprocesador	91
II. 3. 4. i) Integrador	91
II. 3. 4. j) Reactivos	92
II. 3. 5. Preparación de las soluciones estándares	92
II. 3. 6. Preparación y purificación de los extractos clorofórmicos	94
II. 3. 6. a) Tratamiento previo	94

II. 3. 6. b) Purificación de los extractos	94
II. 4. Estudio de la capacidad toxicogénica de <i>N.fischeri</i> aisladas de frutillas y cultivadas en frutillas	97

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. Identificación de la flora fúngica resistente al calor	99
III. 1. Características macroscópicas y microscópicas	99
III. 1. 1. a) <i>Byssoschlamys nivea</i>	99
III. 1. 1. b) <i>Neosartorya fischeri</i>	101
III. 1. 1. c) <i>Arthrimum phaeospermun</i>	102
III. 2. Microfotografías de géneros y especies de mohos resistentes al calor	104
III. 2. Tabla N° 5 Frecuencia relativa porcentual de especies aisladas de frutillas naturales	107
III. 3. Estudio de la presencia de <i>Neosartorya fischeri</i> en frutillas para agregar al yogur	108
III. 4. Determinación de la toxina por Cromatografía en capa delgada (TLC)	108
III. 4. Tabla N° 6 Presencia de Fumitremorgenos y Verruculogeno en los extractos clorofórmicos	109
III. 4. Tabla N° 7 Presencia de Fumitremorgenos y Verruculogeno en los extractos clorofórmicos	111
III. 4. Tabla N° 8 Presencia de Fumitremorgenos y Verruculogeno en los extractos clorofórmicos	112
III. 5 Determinación de la toxina por Cromatografía Líquida (HPLC)	113

III. 5 Tabla N° 9 Optimización de las condiciones de trabajo para la detección de Verruculogeno	113
III. 5. Tabla N° 10 Optimización de las condiciones de trabajo para la detección de Fumitremorgeno A	116
III. 5. Tabla N° 11 Optimización de las condiciones de trabajo para la detección de Fumitremorgeno B	120
III. 5. 1. Extractos clorofórmicos	122
III. 5. 1. Tabla N° 12 Corridas cromatográficas en HPLC, de los extractos positivos en TLC	123
III. 6. Estudio de la capacidad toxicogénica de <i>N.fischeri</i> aisladas de frutillas y cultivadas en frutillas	125
CONCLUSIONES	126

ANEXO

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Se investigó la presencia de hongos resistentes al calor y su capacidad toxicogénica en especial *Neosartorya fischeri* ya que es el hongo resistente al calor más frecuentemente reportado que causa contaminación en productos a base de frutas procesadas por calor. Este hongo presenta ascosporas extremadamente resistentes a los tratamientos térmicos y son capaces de sobrevivir a la pasteurización rutinaria aplicada a la mayoría de las frutas y productos a base de frutas (90 °C por 3 minutos) y la contaminación puede aparecer post-pasteurización por germinación de estas ascosporas.

N. fischeri produce principalmente Fumitremorgenos A, B y Verruvulogeno, todas ellas toxinas tremorgénicas.

Las toxinas tremorgénicas son neurotoxinas que en bajas dosis producen temblores por largos períodos de tiempo y no causan efectos adversos en animales, pero pequeños incrementos en la dosis pueden ser letales.

Teniendo en cuenta la importancia del cultivo de frutilla en la zona de Santa Fe, como así también el riesgo que implica la sobrevivencia de ascosporas de *N. fischeri* en productos a base de frutilla se propusieron los siguientes objetivos generales y específicos:

- Objetivos generales: 1) Adquirir destreza en la identificación de cepas fúngicas resistentes al calor contaminantes de alimentos.

2) Poner a punto técnicas cromatográficas en capa delgada y cromatografía líquida para estudiar la presencia de Fumitremorgeno A, B y Verruculogeno.

- Objetivos específicos: a) Investigar la flora fúngica resistente al calor en frutillas naturales de la zona de Coronda y en pulpas de frutillas para incorporar a yogur previo tratamiento térmico de 80 °C por 15 minutos con especial énfasis en *N. fischeri*.
- b) Estudiar la capacidad productora de Fumitremorgeno A, B y Verruculogeno de las cepas de *N. fischeri* aisladas en el objetivo a)

En este trabajo de tesis se estudiaron 10 muestras de frutillas naturales cosechadas y comercializadas a granel en la zona de Coronda con tratamiento térmico de 80 °C por 15 minutos y 20 muestras de pulpas de frutillas envasadas para agregar a yogur.

Se logró desarrollar una metodología analítica rápida y sencilla por Cromatografía líquida que permite estudiar la capacidad de producción de Fumitremorgenos A, B y Verruculogeno en cepas de *N. fischeri*.

Se constató en frutillas frescas de la zona de Coronda la presencia de las especies fúngicas: *Byssoschlamys nivea*, *N. fischeri* y *Arthrinium phaeospermum* que resisten tratamientos térmicos de 80 °C durante 15 minutos.

Los aislados pertenecientes a la especie *N. fischeri* poseen capacidad para producir Fumitremorgenos A, B y Verruculogeno en

condiciones de laboratorio, algunos de ellos con capacidad para sintetizar las 3 toxinas simultáneamente.

Dicha capacidad toxicogénica no se manifiesta cuando los aislados son cultivados en frutillas, sin embargo la incorporación de frutillas contaminadas con dichos mohos a productos lácteos o de panadería podría dar lugar a síntesis de las toxinas con el riesgo toxicológico que ello implica.

En pulpas de frutillas que se comercializan en el mercado argentino listas para adicionar a yogur no se observó presencia de mohos viables, si bien el número de muestras analizadas al presente no tiene significación estadística.

CAPITULO I

INTRODUCCION

I.1. LOS HONGOS

I.1.1. Generalidades:

Los hongos, se caracterizan por poseer estructura eucariótica (Moss, 1994). Tienen paredes celulares rígidas y hábitats muy diversos: algunos son acuáticos, principalmente de agua dulce y algunos marinos, la mayoría son terrestres, viviendo en el suelo o sobre materia vegetal muerta, unos pocos son parásitos de animales, incluyendo al hombre. Aunque muchos hongos pueden metabolizar materiales insolubles como la lignocelulosa, estas sustancias deben ser degradadas por medio de enzimas apropiadas que son secretadas fuera de la pared (Fernandez Pinto, 1996).

Su función es reciclar los desechos orgánicos. Producen enzimas hidrolíticas que liberan al medio para hidrolizar los nutrientes.

Son saprobios: se nutren de sustancias orgánicas en descomposición que pueden ser reservas de otros organismos, productos de excreción y excrementos de los mismos, o restos de vegetales y animales. Son heterótrofos: necesitan una fuente de carbono orgánica ya que no pueden realizar fotosíntesis por carecer de clorofila (Herrera, 1990).

Los hongos filamentosos son básicamente uninucleados o multinucleados. Aquí se pierde el concepto celular y para evitar el término conflictivo de "pluricelular", se prefiere hablar de "hongos multinucleados" (Lurá, 1977).

La estructura vegetativa de un hongo se denomina talo y está compuesto por filamentos, generalmente ramificados denominados hifas. El conjunto de hifas entrelazadas se denomina micelio, a través del cual se absorben los nutrientes y se secretan las enzimas extracelulares necesarias para degradar las macromoléculas. Los hongos como grupo o reino, se encuentran ampliamente distribuidos por todo el globo terrestre y viven en cualquier sitio que presente material orgánico, agua y una temperatura apropiada. Como son microscópicos, son transportados fácilmente por las corrientes de aire a lugares muy lejanos y diversos (Herrera, 1990).

El micelio de un hongo filamentososo se origina a partir de un promicelio, originado por un "propágulo de dispersión" (nombre genérico que designa tanto a esporas, conidias, esporangiosporos, un trozo de hifa vegetativa, etc.).

Los hongos tienen "pleomorfismo", o sea presentan dos o más formas. Así, por ejemplo, muchos hongos presentan un estado sexuado perfecto, llamado "teleomorfo" y uno asexual o imperfecto, llamado "anamorfo". Generalmente, los dos estados se manifiestan a distintos tiempos, pero si aparecen juntos se habla de un estado "holomorfo".

A partir de cualquier fragmento de micelio viable o de unidades de reproducción que contienen la información genética, se forman esporas o conidias, que es la forma de reproducción asexual de todos los mohos. Algunos se reproducen por esporas asexuales y sexuales.

La multiplicación o reproducción de un hongo depende de una componente genética y de factores ambientales. Si el hongo es genéticamente estéril no va a esporular nunca; si es muy fértil dejará de esporular sólo en condiciones subletales. El hongo esporula cuando el medio comienza a agotarse.

I. 2. TAXONOMIA FUNGICA

Cualquier organismo vivo debería caracterizarse mediante parámetros fenéticos y filogenéticos.

- * Características fenéticas: (fenotipo) están dadas por la morfología y la fisiología. Responden a una componente interna: el genotipo y a una externa: las condiciones ambientales.
- * Características filogenéticas: filogenia indica evolución. Indica de donde proviene ese ser, cual es su origen evolutivo.

Se trata de determinar la filogenia mediante el estudio de las estructuras celulares internas: septos, núcleos, aparato de golgi, centríolos, mitosis, meiosis, homología de DNA, etc.

Este aspecto va a producir grandes cambios en toda la taxonomía, pues un Reino estricto debería ser monofilético (u origen único para todos sus integrantes).

Durante la década de los 80 no hubo modificaciones radicales en la sistemática de los mohos transmitidos por los alimentos. Las modificaciones más importantes fueron las relacionadas con el

descubrimiento de la fase sexual o perfecta de algunos géneros o especies muy conocidas.

Con el advenimiento de la biología molecular en taxonomía fúngica, algunos micólogos han decidido abandonar el sistema dual Ascomycotina - Deuteromycotina, ya que se puede unificar sobre la base de las secuencias de rDNA del anamorfo. Sin embargo, otros autores no coinciden con esta propuesta y han considerado absolutamente necesario conservar el nombre deuteromycetes al menos para propósitos de identificación (Gúarro, 1999).

I. 2. 1. Clasificación de los mohos de interés en alimentos

I. 2.1. 1. División: Zygomycotina

Clase: Zygomycetes

Orden: Mucorales

Familia: Mucoraceae

Género: *Mucor - Rhizopus*

Tienen crecimiento rápido. El micelio es no septado, su reproducción es por esporangiosporas: esporas producidas asexualmente en general dentro de un saco, el esporangio, en el final de una larga hifa especializada, el esporangióforo.

En cuanto a sus propiedades fisiológicas se destacan por el rápido crecimiento a alta actividad acuosa (aw) y la inhabilidad de crecer a bajas aw, así como por la baja resistencia al calor y a los tratamientos químicos (Pitt, 1997).

Los géneros Zygomycetes comúnmente encontrados en alimentos pertenecen al orden Mucorales. Su identificación se basa en:

a) *Observación del crecimiento y apariencia de las colonias en diferentes medios y condiciones estándar de cultivo.*

b) *Observación microscópica de las estructuras características: esporangiosporas, esporangio y esporangióforo (Pitt, 1997).*

I. 2. 1. 2. División: Ascomycotina

Clase: Plectomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Byssoschlamys* - *Eupenicillium* - *Emericella* - *Eurotium* - *Neosartorya* -

Tienen crecimiento mucho más lento. El micelio es septado. Producción de estructuras de origen sexual, las ascosporas, dentro de sacos denominados ascas, dispuestos dentro de un gran cuerpo macroscópico llamado en forma genérica ascocarpo.

Las ascosporas se caracterizan por tener una pared gruesa, altamente refráctil y particularmente ornamentada, y que se liberan por ruptura de las ascas cuando éstas maduran.

Las ascas se reconocen por su forma, esférica a elipsoidal, textura lisa, tamaño y presencia de 8 ascosporas en su interior.

Los ascocarpos pueden tener una pared sólida y totalmente cerrada (cleistotecio) o estar compuestos de una fina y entretejida pared de hifas (gymnotecio). Sólo en el género *Byssochlamys* las ascas se disponen de manera simple, no cerradas en ascocarpos (Hocking, 1984; Pitt, 1997).

Además del estado teleomorfo, los ascomycetes generalmente producen un estado anamorfo productor de esporas asexuales o conidias. Estas son características de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Hocking, 1984).

Por poseer pared gruesa, altamente condensada y refráctil, las ascosporas son frecuentemente resistentes al calor, a los agentes químicos y a la desecación (Pitt, 1997), es así que la termorresistencia de la mayoría de los mohos está basada en la producción de ascosporas.

Las conidias no son muy resistentes al calor, siendo rápidamente destruidas por los procesos de pasteurización (Hocking, 1984).

En la práctica, el reconocimiento de estas especies de mohos se basa en cuatro puntos fundamentales:

a) el aislamiento a partir de un screening basado en procesos de calentamiento.

b) la observación macroscópica de las colonias en diferentes medios y condiciones estándares de cultivo.

c) la observación de cleistotecios, gymnotecios o ascas libres.

d) la observación microscópica de las estructuras conidiales (Hocking, 1984).

I. 2. 1. 3. División: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hyphomycetales

Familia: Moniliaceae

Género: *Alternaria* - *Aspergillus* - *Fusarium* - *Geotrichum* - *Penicillium*

Tienen crecimiento lento. Producen esporas asexuales o imperfectas únicamente, llamadas conidias, las que se disponen simples o en cadenas, a partir de hifas más o menos especializadas.

El tamaño, forma y ornamentación de las conidias, así como la complejidad de las estructuras productoras de las mismas son la base de su clasificación.

La resistencia de las conidias al calor no es usual, es variable frente a los procesos de desecación y bastante frecuente a los agentes químicos (Pitt, 1997).

La identificación de estos géneros es llevada a cabo mediante:

a) la observación macroscópica de las colonias en diferentes medios y condiciones estándar de cultivo.

b) la observación microscópica de las estructuras conidiales (Pitt, 1997).

I. 3. IMPORTANCIA DE LOS HONGOS EN LAS MÚLTIPLES ACTIVIDADES HUMANAS

I. 3. 1. Generalidades:

Son múltiples las relaciones benéficas y perjudiciales que en forma directa o indirecta suelen tener los hongos con el hombre.

Entre los grandes beneficios para el hombre que aportan muchos hongos, podemos citar:

- * La función que desempeñan en el equilibrio ecológico de la naturaleza.
- * Su utilización en la alimentación humana, como son los cuerpos fructíferos que producen ciertos basidiomicetes y algunos ascomicetes.

- * La utilización de los hongos en la Biotecnología con los beneficios que esto implica.

I. 3. 2. Papel de los hongos en la biotecnología:

Varios hongos presentan gran utilidad práctica al hombre en diversos procesos industriales para la obtención de muchos productos, incluyendo alimentos, bebidas y fármacos importantes con una enorme y decisiva repercusión en la economía de la mayoría de los países (Herrera, 1990).

Los hongos son utilizados en la producción y aroma de alimentos. La maduración y fermentación de ciertos quesos muy apreciados como el roquefort, el camembert y otros similares, depende en gran parte de las actividades metabólicas de ciertos mohos (Herrera, 1990).

La aplicación más reciente de los hongos en la industria de los alimentos incluyen la producción de agentes saborizantes y colorantes.

También se utilizan en la producción industrial de productos bioquímicos como ácidos orgánicos (ácido cítrico, fumárico, láctico e itacónico) (Smith, 1983; Eveleigh, 1981).

Las penicilinas naturales y semisintéticas son también productos económicamente importantes (Aharonowitz, 1981).

En Biotecnología agrícola se están llevando a cabo estudios para utilizar hongos como agentes de control biológico para reducir las poblaciones dañinas de insectos, así como de maleza y

microorganismos patógenos de plantas. Hay interés por parte de los investigadores en lo que respecta a la seguridad de estos agentes de control biológico o sus residuos en los productos alimenticios cuando éstos ingresan a la cadena alimentaria y los daños que podrían producir en el hombre u otros organismos.

El futuro del uso de hongos para el control biológico dependerá de demostrar que estos metabolitos no son un riesgo para el hombre y su medio ambiente (Logrieco, 2000).

I. 3. 3. Los hongos como agentes de deterioro de alimentos:

Los hongos llevan a cabo un papel importante en la degradación y deterioro de un amplio rango de productos económicamente útiles (Eggins, 1975).

Cuando las condiciones ambientales son las adecuadas, los hongos son capaces de degradar todos los alimentos naturales y procesados, siendo el aw el principal factor intrínseco que gobierna la capacidad para llevar a cabo tal degradación. Cuando se almacenan alimentos en presencia de una alta humedad, la toma de agua sobre la superficie del alimento aumentará el nivel localizado de aw en el cual el crecimiento del hongo será más rápido que bajo las condiciones óptimas de almacenamiento.

Cuando los productos alimentarios se almacenan mal, frecuentemente están expuestos al biodeterioro por los hongos con el

resultado de la disminución de sus cualidades nutricionales y organolépticas y la biodegradación total o parcial del alimento.

El desarrollo de hongos en granos, produce pérdida del valor nutritivo, pérdida del poder germinativo, y además pueden producir micotoxinas.

Otros factores que influyen en el crecimiento de los mohos sobre alimentos incluyen: el pH y el potencial redox. Los hongos generalmente son considerados como más tolerantes que las bacterias a las condiciones ácidas, mientras que el potencial redox es afectado por la tensión de oxígeno del medio ambiente. Aunque los hongos son considerados como organismos aerobios, muchos de ellos pueden crecer en condiciones de tensión de oxígeno baja. Los hongos pueden crecer en un rango importante de temperatura de -15 °C a 45 °C. Esto permite el crecimiento de los hongos sobre alimentos congelados y fríos. Los hongos tienen una capacidad enzimática más amplia que la mayor parte de las bacterias y también pueden sintetizar sus propias vitaminas, lo que les permite crecer en ambientes que carecen de estos nutrientes esenciales (Wainwright, 1995).

I. 3. 3. 1. Parámetros que gobiernan el desarrollo de hongos en alimentos:

• Temperatura:

La mayoría de los hongos se consideran mesófilos, es decir que crecen a temperatura ambiente. La temperatura óptima para la

mayoría es de 25 a 30 °C, pero algunos de ellos crecen bien a 35 - 37 °C. Muy pocos son termófilos.

Los hongos termorresistentes en general no son buenos contaminantes de alimentos pero hay termotolerantes que crecen hasta 45 °C y producen deterioro y toxinas.

La mayoría de las esporas de mohos son destruidas por calentamiento durante 5 minutos a 65 °C o 1 minuto a 80 °C, aunque algunas ascosporas de ciertos teleomorfos de *Aspergillus* y *Penicillium* resultan más resistentes. Las ascosporas de *Byssoschlamys fulva* muestran un alto grado de resistencia térmica y pueden soportar las temperaturas utilizadas durante el enlatado.

Ciertos géneros son psicrotrofos, algunos crecen bien a temperatura de congelación o ligeramente superiores incluso se han reportado casos de crecimiento a temperatura de -5 °C a -15 °C.

• **Actividad acuosa (aw):**

La mayoría de los seres vivos, incluyendo los hongos desarrollan entre aw de 0,99 - 0,60, debajo de 0,60 no hay desarrollo fúngico porque se producen desórdenes en el ADN.

Existen hongos como Ascomycetes que son capaces de crecer por debajo de una aw de 0,95 y otros considerados xerófilos que tienen un óptimo de aw entre 0,80 - 0,90 y se encuentran en alimentos con bajo aw.

Entre 1 - 0,98 crecen prácticamente todos los hongos comunes y compiten con las bacterias.

Para la conservación de alimentos, si las condiciones son óptimas, el a_w deberá ser menor de 0,75, sin embargo podría crecer *Eurotium* (teleomorfo del *Aspergillus*).

- **pH:**

La mayoría de los hongos pueden crecer en un intervalo de pH muy amplio, de 1 a 8,5.

En los alimentos con pH neutro o ligeramente alcalino, los hongos compiten con las bacterias; al disminuir el pH, las bacterias (excepto las lácticas) tienen menor posibilidad de competir.

Los hongos crecen bien a pH menor de 5.

- **Necesidad de O₂ y CO₂:**

Los hongos contaminantes de alimentos son aeróbicos, es decir que necesitan de O₂ para su desarrollo, algunos son microaerofílicos (pueden desarrollar con muy poco O₂).

Respecto de la concentración de CO₂, cuando esta es baja, puede estimular su crecimiento, si es alta, es inhibitorio del mismo.

- **Necesidades nutritivas:**

El contenido de los nutrientes de la mayoría de los alimentos es adecuado para el crecimiento de cualquier microorganismo, sin embargo

se puede decir que el metabolismo de los hongos está más adaptado para los sustratos ricos en hidratos de carbono, mientras que el de las bacterias es más afín a determinados alimentos proteicos, siendo los lactobacilos una excepción.

• **Conservantes de alimentos:**

Entre los conservantes químicos útiles en el control de la contaminación alimentaria por hongos se incluyen el antibiótico nistatina, benzoatos, propionatos, sorbatos, óxido de etileno y parabenos.

I. 4. HONGOS RESISTENTES AL CALOR

I. 4. 1. Generalidades:

Los problemas de contaminación causados por hongos resistentes al calor, han existido desde que el hombre comenzó a preservar las frutas por un proceso térmico (Hocking, 1984).

El primer problema reportado ocurrió en frutillas enlatadas en el año 1930 en la Estación de preservación de frutas y vegetales en Campden en Inglaterra y se observó que *Byssoschlamys fulva* fue el responsable de la contaminación (Oliver, 1934).

Byssoschlamys es un género que muestra resistencia a los procesos de calentamiento de rutina que se realizan en las fábricas de conservas de frutas (Bayne, 1979). Se caracteriza por la producción de ocho esporas en grupos irregulares, sin ascocarpo. (Hatcher, 1979).

Aunque se encontró que los cajones de madera, cestas, botellas de vidrio se encontraban contaminadas con hongos, la fuente inicial de la contaminación, era la fruta que venía del campo y huerta.

Las ascosporas de *B. fulva* y *B. nivea* (estados anamórficos: *Paecilomyces fulvus* y *Paecilomyces niveus* respectivamente), *Talaromyces flavus* (*Penicillium dangeardii*) y *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) son extremadamente resistentes al calor y causan contaminación (Beuchat, 1979; Hatcher, 1979; Hocking, 1984; Jesenska, 1984; Kavanagh, 1963; Mc Evoy, 1979). Ascosporas de *Talaromyces* y *Neosartorya* pueden sobrevivir por 5 a 12 minutos a 100 °C (Kavanagh, 1967; Mc Evoy, 1970; Van der Spuy, 1975).

Neosartorya fischeri es otro de los hongos resistentes al calor más frecuentemente reportado que causa contaminación en jugos de frutas y otros productos a base de frutas procesados por calor (Beuchat, 1986; Nielsen, 1991). Este organismo crece de 10 a 52 °C con un óptimo de temperatura entre 26 y 45 °C.

Se aisló de frutillas enlatadas y sus ascosporas extremadamente resistentes a los tratamientos térmicos pueden destruirse al elevar la temperatura de calentamiento, pero esto, produciría cambios adversos en la calidad del producto final (Kavanagh, 1963; Splittstoesser, 1991; Beuchat, 1986).

La contaminación de frutas enlatadas se pone de manifiesto por un completo daño en la textura debido a las enzimas pectinolíticas de los hongos, produciendo olores desagradables con presencia de masa micelial (Splittstoesser, 1978).

Durante el procesamiento térmico, los hongos son usualmente destruidos, pero las ascosporas de los hongos resistentes al calor, conducen a la contaminación de productos a base de frutas durante el consecuente almacenamiento (Beuchat, 1992; King, 1987).

Una vez formadas, las ascosporas pueden persistir en estado latente por meses o años en frutas en mal estado y en el suelo, y pueden ser aislados de contenedores y equipos para transportar y procesar las frutas (Beuchat, 1986).

Estas ascosporas son capaces de sobrevivir los tratamientos de pasteurización rutinarios aplicados a la mayoría de las frutas y productos a base de frutas (90 °C por 3 minutos) y la contaminación puede aparecer post pasteurización por germinación de estas ascosporas (Beuchat, 1979; Splittstoesser, 1977). Factores ambientales tales como pH, tensión de oxígeno, a_w y la presencia de ciertos ácidos orgánicos en frutas, pueden influir en el grado de inactivación de células vegetativas y ascosporas de hongos (Beuchat, 1986).

En los años recientes ha habido un incremento en el mercado en la variedad de productos a base de frutas procesados por calor. Nuevas tecnologías de packaging y un aumento en la demanda del consumidor ha provocado este incremento (Hocking, 1984).

La principal vía para asegurar que los hongos resistentes al calor no causarán contaminación, es la selección y manejo cuidadoso de las materias primas que se utilizarán y un efectivo procedimiento de screening para las esporas de estos hongos resistentes (Hocking, 1984).

El lavado, cortado, blanqueado, pelado, son algunas de las operaciones que deberían realizarse para remover esporas de frutas contaminadas (Splittstoesser, 1971).

I. 4. 2. Principales hongos termorresistentes:

I. 4. 2. 1. Género *Byssochlamys*

Las especies del género *Byssochlamys* se asocian casi exclusivamente al daño de alimentos ácidos tratados por calor.

Dos especies de *Byssochlamys* son importantes alterantes de alimentos: *B. fulva* (anamorfo: *Paecilomyces fulvus*) y *B. nivea* (anamorfo: *P. niveus*).

La resistencia al calor de las ascosporas es la principal característica fisiológica de este género, la cual puede variar marcadamente de aislado a aislado. Esta propiedad puede verse disminuida por bajos pH y presencia de preservativos (Bayne, 1979), mientras que los altos niveles de azúcares ejercen un efecto protector (Beuchat, 1977).

Otra propiedad destacada de *Byssochlamys* es la capacidad que tiene para crecer a muy bajas tensiones de oxígeno, habilidad aparentemente no compartida con otros hongos comunes resistentes al calor. Esto da a las especies de *Byssochlamys* una ventaja selectiva en productos tales como jugos de frutas y frutas en botellas o enlatadas.

En presencia de bajo nivel de oxígeno, estas especies pueden crecer anaeróbicamente y producir dióxido de carbono. Una pequeña cantidad de oxígeno contenida en el espacio de cabeza de una botella, o una mínima fuga de oxígeno de un envase pueden proveer suficiente oxígeno para el crecimiento de estos hongos.

B. fulva, y en menor proporción *B. nivea*, pueden crecer bien en atmósferas conteniendo altos niveles de dióxido de carbono y menos de 0,5 % de oxígeno (Taniwaki, 1995).

El aislamiento original de *B. nivea* fue de suelo por Westling en 1911 y este parece ser su hábitat natural. Las especies de *Byssochlamys* fueron raramente reportadas de otras fuentes diferentes a los alimentos pasteurizados.

B. nivea fue aislada de sidra, de jugos de frutas, de frascos de frutilla, de raviolos y de queso crema (Pitt, 1997). Esto es debido a la necesidad que tienen sus ascosporas de ser activadas por calor para que desarrollen (APHA, 1984).

El primer signo de daño por especies de *Byssochlamys* es usualmente un leve ablandamiento de la fruta. Este progresa hasta la total desintegración de la misma debido a la producción de poderosas pectinasas por los hongos (Beuchat, 1979). Puede aparecer un ligero sabor agrio, olor residual y producción de gas que podrá causar hinchamiento visible.

El pequeño desarrollo fúngico mientras el oxígeno residual es consumido en la lata puede ser suficiente para permitir la producción de dichas enzimas.

I. 4. 2. 2. Género *Talaromyces*

El interés de este género radica en la producción de ascosporas termorresistentes y consecuentemente en su aislamiento de productos a base de frutas pasteurizadas.

Se caracteriza por la producción de gymnotecios amarillos o blancos en asociación con un anamorfo típico de *Penicillium*, *Paecilomyces* o *Geosmithia*.

El más comúnmente aislado es *T. macrosporus*, que al igual que *T. flavus*, crece relativamente rápido en MEA, produce colonias amarillas tanto a 25 como a 37 °C y usualmente abundantes gymnotecios amarillos. Sus ascosporas miden más de 5 micrómetros de longitud (Pitt, 1997).

El principal atributo industrial de *T. macrosporus* es la alta termorresistencia de sus ascosporas. Ha sido frecuentemente reportado en jugos pasteurizados a veces como causante de daño (Hocking, 1987; King, 1990; Quintavalla, 1993).

En el caso de *T. flavus*, sus ascosporas miden menos de 5 micrómetros de longitud, más pequeñas que aquellas de *T. macrosporus*. Esta es la especie de *Talaromyces* más común, encontrada universalmente en suelos de climas cálidos.

La resistencia térmica de las ascosporas de *T. flavus* fue sustancialmente menor que la de aislados de *T. macrosporus* (Beuchat, 1988; Quintavalla, 1993).

I. 4. 2. 3. Género *Eupenicillium*

Eupenicillium se caracteriza por la producción de cleistotecios macroscópicos de paredes lisas y vivamente coloreados, en asociación con un anamorfo *Penicillium*.

En muchas especies los cleistotecios se vuelven extremadamente duros durante su desarrollo, pudiendo tardar semanas o meses en madurar. Esto dificulta la observación de sus ascosporas y, por lo tanto, su identificación.

La mayoría de las especies de *Eupenicillium* son hongos del suelo que de tanto en tanto aparecen como sobrevivientes a los procesos térmicos, ya que han sido aislados como contaminantes resistentes al calor de jugos de frutas en varias ocasiones (Pitt, 1997).

I. 4. 2. 4. Género *Neosartorya*

Desde el punto de vista de la tecnología de alimentos, la mayor importancia de las especies de *Neosartorya* es la alta resistencia al calor de sus ascosporas. *Neosartorya fischeri* es la única especie de relevancia en alimentos. Se relaciona fenotípicamente al patógeno oportunista de humanos: *Aspergillus fumigatus* y causa contaminación de productos procesados por calor (Girardin, 1995).

Las colonias de *N. fischeri* son blancas y se extienden rápidamente tanto a 25 como a 37 °C, producen cleistotecios blancos y discretas cabezas de *Aspergillus* verde grisáceas.

El estado teleomorfo se produce en la mayoría de las condiciones de crecimiento y es el responsable de la propiedad más importante que presenta esta especie: la termorresistencia. Es un hongo ubicuo que crece comunmente en ambientes húmedos tales como suelo, vegetación putrefacta y desechos orgánicos donde produce gran número de ascosporas (Raper, 1965). Se ha convertido en un problema industrial por contaminación de productos de frutas procesadas (Girardin, 1995).

Caracterización de las variedades de *N. fischeri*

La variabilidad dentro de la especie *N. fischeri* puede ser determinada por:

- * Morfología de las ascosporas a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- * Resistencia térmica de las ascosporas.
- * Perfil de metabolitos secundarios por Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).
- * Patrón de proteínas de extractos de ascosporas por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - Sodio duodecilsulfonato (SDS - PAGE).
- * Ensayos genómicos de complementación de DNA.

El desarrollo de inmunoensayos para esta especie, permitiría una rápida y más sensible detección (Girardin, 1995).

Neosartorya fischeri es una especie con variedades bien definidas: *N. fischeri* var. *glabra*, *N. fischeri* var. *spinosa* y *N. fischeri* var. *fischeri* (Samson, 1990, 1995), teniendo claramente diferenciada la ornamentación de las ascosporas y el perfil de micotoxinas y otros metabolitos (Kozakiewicz, 1989; Samson, 1990; Nielsen, 1991).

Existen estudios moleculares que muestran una muy cercana relación entre *N. fischeri* var. *glabra* y *N. fischeri* var. *spinosa* y entre *N. fischeri* var. *fischeri* y *Aspergillus fumigatus* (Girardin, 1995).

En la literatura aparecen numerosos datos acerca de la termorresistencia de las ascosporas de *N. fischeri* (Quintavalla, 1993; Scott, 1987; Beuchat, 1986). Estos datos muestran una comparable o algo menor resistencia térmica que *Talaromyces macrosporus*, pero mayor que *Byssoscllamys fulva* o *B. nivea* (Beuchat, 1986; Scott, 1987).

• **Especies y variedades del género *Neosartorya***

El género *Neosartorya* incluye siete especies y tres variedades, las cuales se detallan a continuación:

Especies

Variedades

N. aurata

N. aureola

N. fennelliae

<i>N. fischeri</i>	<i>glabra</i>
	<i>spinosa</i>
	<i>fischeri</i>

N. quedricincta

N. spathulata

N. stramenia

Raper, 1965; Samson, 1990.

• **Morfología de las ascosporas y resistencia térmica**

La ornamentación de las ascosporas de las distintas variedades de *Neosartorya fischeri* es característica y puede ser visualizada por SEM. Las ascosporas son biconvexas con dos crestas ecuatoriales (Nielsen, 1991).

Las ascosporas de *N. fischeri* var. *fischeri* poseen, bajo SEM, una superficie típicamente reticulada originada por crestas anastomosadas, mientras que las ascosporas de *N. fischeri* var. *spinosa* muestran espinas y cierto grado de rugosidad en la superficie diferenciable de dichas espinas. *N. fischeri* var. *glabra* presenta una superficie finamente rugosa (Nielsen, 1992).

I.5.MICOTOXINAS

I. 5. 1. Desarrollo fúngico y la producción de toxinas

Los hongos se desarrollan sobre los alimentos y sobre sus materias primas.

Bajo condiciones favorables, no sólo ocasionan deterioro de su calidad, sino que también pueden producir micotoxinas.

La mayor parte de la contaminación fúngica es claramente visible, se detecta como crecimiento mohoso. Sin embargo, también existe una contaminación fúngica menos obvia la cual conduce al consumo humano de toxinas fúngicas que no se ven (Wainwright, 1995).

Los hongos productores de micotoxinas están ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Los avances en el conocimiento de la fisiología fúngica y de los factores que afectan el crecimiento de los hongos y la biosíntesis de las micotoxinas, conducen a la aplicación de medidas preventivas eficaces. El hecho de que muchos de estos contaminantes son peligrosos para la salud, es lo que ha impulsado el estudio de los hongos como grupo microbiano con características propias.

Los hongos requieren diferentes medios y condiciones para su aislamiento. Existe una gran diversidad de géneros y especies, es por eso que se debe identificar correctamente las especies toxicogénicas, esencialmente para evaluar el riesgo de contaminación de los alimentos con micotoxinas (Fernandez Pinto, 1996).

I. 5. 2. Definición de micotoxinas:

Son productos naturales producidos por algunas especies de hongos que provocan una respuesta tóxica cuando se introducen a bajas concentraciones en vertebrados superiores y otros animales por una ruta o vía natural (Bennett, 1987).

Desde el punto de vista de la contaminación de alimentos, la ruta más importante es la ingestión, pero también pueden ser rutas naturales de administración la absorción a través de la piel y la vía inhalatoria, ésta última, importante en las enfermedades que afectan a los trabajadores que manipulan granos almacenados o alimentos para animales.

Estos compuestos no tienen un rol fisiológico definido ni son esenciales para el crecimiento del microorganismo productor y se producen en las etapas tardías del ciclo de vida.

Por consenso general, la denominación de micotoxinas está restringida a las toxinas que producen los hongos transmitidos por alimentos, excluyendo las toxinas producidas por Basidiomycetes, tales como las setas (ICMSF, 1996).

En general las micotoxinas son de bajo peso molecular, la mayoría heterocíclicas, poco solubles en agua, con gran estabilidad al calor por su estructura cíclica.

Son indestructibles frente a procesos de pasteurización y cocción de alimentos.

La mayoría son solubles en solventes orgánicos polares. Presentan estructuras químicas muy diversas.

Muchas de las micotoxinas son mutagénicas, cancerígenas e inmunosupresoras.

Por ser metabolitos secundarios, se forman cuando cesa el desarrollo fúngico, sintetizándose en mayor cantidad cuando en el alimento, el porcentaje de hidratos de carbono es alto en relación a la fuente nitrogenada, de tal forma que cuando se agota ésta última, el organismo se estresa y acumula micotoxinas.

Sus efectos tóxicos también son muy variados, ya que pueden producir desde simples trastornos gastrointestinales hasta daños mucho más graves como la carcinogénesis.

Una única especie de hongo puede producir más de una toxina, en tanto que las toxinas individuales pueden ser producidas por más de una especie de hongos (Wainwright, 1995).

Si bien actualmente se conocen muchos metabolitos secundarios de hongos que presentan efectos adversos para diferentes sistemas biológicos, los de mayor importancia son aquellos que han sido detectados como contaminantes naturales de los alimentos, pues en este caso existe un riesgo de exposición del hombre y los animales a sus efectos tóxicos (Fernandez Pintos, 1996).

I. 5. 3. Micotoxicosis:

Enfermedad ocasionada por la ingesta, inhalación y/o contacto con toxinas producidas por diferentes especies de hongos.

Existen dos formas diferentes de micotoxicosis:

- **Micotoxicosis primaria:** las micotoxinas se producen en el alimento contaminado al crecer el hongo sobre el mismo y éste se consume directamente.

- **Micotoxicosis secundaria:** el alimento contaminado con micotoxina es ingerido por el animal, la toxina es metabolizada y excretada en la leche o huevos, o queda como residuo en tejidos y órganos, luego se ingieren los residuos de micotoxina que se encuentra en estos productos.

En animales, las micotoxinas a altas concentraciones, pueden producir síndromes agudos que incluyen daños en el hígado y riñón, ataque al sistema nervioso central, efectos dérmicos y efectos hormonales pudiendo producir la muerte de los mismos (Swmith, 1985), mientras que a bajas concentraciones pueden ser carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, estrogénicas, disminuyendo el ritmo de crecimiento de animales jóvenes y pueden interferir con los mecanismos de resistencia natural y deprimir su sistema inmunológico, de tal manera que los animales se vuelven más susceptibles a las infecciones (Pier, 1980).

En el hombre, las micotoxinas han sido las responsables de diversas patologías. En algunos casos con alta mortalidad como la ATA (Aleucemia tóxica alimentaria) que provocó la muerte lenta de personas en la antigua URSS entre 1941 y 1947 (Kurata, 1990); el ergotismo

conocido desde la edad media como Enfermedad del Fuego de San Antonio, debido al consumo de centeno contaminado por *Claviceps purpurea* (Worshop, 1989).

En Rusia entre 1831 y 1940 se informó acerca de una enfermedad masiva en caballos. Los estudios indicaban que la enfermedad estaba asociada a la ingestión de heno infectado con *Stachybotrys atra*. Esta micotoxicosis era estacional y también afectaba a granjeros, posiblemente por inhalación de compuestos volátiles provenientes del heno infectado (Kurata,1990).

En la década del 40 fueron estudiadas en Japón micotoxicosis humanas atribuidas a la ingesta de arroz enmohecido. La toxicidad del arroz fue demostrada en animales. Los síntomas eran similares a los del beri - beri cardíaco; en los casos fatales la muerte se producía en tres días. Mucho tiempo después se descubrió que la causa era la contaminación del cereal con varias toxinas producidas por diversas especies de *Penicillium* (Saito,1971).

En 1961 se produjo en Inglaterra el brote de una enfermedad que afectó a aves de corral, especialmente pavos, causando la muerte de miles de animales. Por su etiología desconocida se la denominó "enfermedad de los pavos", pero al poco tiempo se produjeron otros brotes similares que afectaron a patos y faisanes. Poco después pudo comprobarse que la causa de esta enfermedad había sido la presencia de metabolitos tóxicos producidos por el hongo *Aspergillus flavus*, contaminante del maní empleado en la preparación de las raciones

suministradas a las aves. Estas sustancias, desconocidas hasta entonces, se denominaron aflatoxinas (Alcroft, 1963).

I. 5. 4. Daños producidos por micotoxinas:

□ ***Dosis altas:***

- Daño hepático
- Daño renal
- Daño neurológico
- Daño gastrointestinal

□ ***Dosis bajas:***

- Daño inmunológico
- Trastornos reproductivos
- Baja producción de leche y huevos
- Tumores malignos (a largo plazo en el hombre)

El daño inmunológico ocasiona mayor predisponibilidad a las infecciones.

Los trastornos reproductivos ocasionan una producción deficiente y la consecuente menor ganancia en peso y pérdida económica.

Los tumores malignos provocan grave riesgo en la salud humana.

I. 5. 5. Alimentos susceptibles de estar contaminados con

micotoxinas:

Los hongos crecen sobre productos agrícolas durante la cosecha y el almacenamiento. Los hongos que crecen sobre granos de cereales pueden ser clasificados en tres tipos:

1) Hongos de campo, que invaden los granos antes de la cosecha y requieren valores de aw para el crecimiento, mayores de 0,93. Este grupo incluye especies de *Alternaria*, *Fusarium* y *Cladosporium*.

2) Hongos del almacenamiento, que invaden los granos después de la cosecha, principalmente incluyen especies de *Aspergillus* y *Penicillium*; estos hongos pueden crecer a niveles reducidos de aw, hasta 0,70.

3) Hongos que producen un deterioro avanzado como *Fusarium graminearum*, *Chaetomiun* y *Sordaria*, requieren niveles altos de aw para crecer (Wainwright, 1995).

Las toxinas principales formadas sobre los granos incluyen a las aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, toxina T-2, vomitoxina y fumonisinias.

I. 5. 6. Factores que gobiernan la síntesis de micotoxinas:

Los factores que afectan la síntesis pueden ser biológicos o ambientales.

Factores biológicos:

- Diferencias varietales
- Stress de la planta
- Cepa fúngica
- Ecosistema microbiano

Factores ambientales:

- Temperatura
- Humedad relativa
- Daños: mecánicos, insectos y pájaros, etc.

Su producción está condicionada tanto por el genotipo del microorganismo productor, como por el sustrato y el medio ambiente en el cual se desarrolla (Smith, 1985).

Una característica de los metabolitos secundarios es que frecuentemente son específicos no sólo de especies sino también de cepas (Fernandez Pinto, 1996).

Si una cepa fúngica tiene el potencial para producir una micotoxina, el nivel producido dependerá de los nutrientes disponibles en el sustrato. Ciertos componentes, como metales y azúcares, juegan un rol importante en el proceso biosintético, determinando que algunos sustratos sean más propensos que otros a la contaminación (FAO, 1982; Bresler, 1998; Bilotti, 1998).

En condiciones naturales, otros factores influyen también sobre la biosíntesis de micotoxinas. La interacción con otros microorganismos, la presencia de biocidas, la acción de otros entes biológicos tales como insectos, roedores y el genoma de la planta, influyen sobre la cantidad de micotoxinas que puede producir un hongo que ha colonizado al sustrato en la etapa pre y post cosecha (Smith, 1985).

El crecimiento fúngico y la biosíntesis de micotoxinas también son afectados por parámetros ambientales, entre los cuales los más importantes son la temperatura y la humedad relativa de la atmósfera. Estos parámetros interactúan y, en general, a valores subóptimos de uno de ellos se reduce el rango del otro parámetro dentro del cual el hongo puede crecer y producir toxinas. En general, los rangos de temperatura y aw que permiten la biosíntesis de las micotoxinas son más estrechos que aquellos que posibilitan el crecimiento fúngico (Arora, 1991; Frisvad, 1995).

La contaminación con micotoxinas es una consecuencia de una compleja interacción de factores, su conocimiento permite establecer medidas preventivas para minimizar el riesgo de contaminación de los alimentos con peligrosos agentes tóxicos.

I. 5. 7. Hongos productores de micotoxinas:

Los hongos productores de micotoxinas están ampliamente difundidos en el medio ambiente y son contaminantes frecuentes de alimentos especialmente los de origen vegetal. Los géneros que se

destacan en el contexto de la salud humana y animal son tres: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos microorganismos con características fisiológicas y requerimientos ecológicos particulares, son capaces de colonizar los sustratos y biosintetizar las toxinas en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos (Fernandez Pinto, 1996).

Las especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se desarrollan principalmente en granos y semillas y otros alimentos almacenados en condiciones deficientes. En cambio, las especies de *Fusarium* prosperan mejor en el mismo campo, dependiendo de las condiciones ambientales adecuadas para el hongo.

5 **El género *Aspergillus*** está ampliamente distribuido en la naturaleza, pero se lo encuentra con mayor frecuencia en climas tropicales y subtropicales, por lo que las toxinas producidas generalmente están asociadas a productos provenientes de dichas regiones. Muchas especies de *Aspergillus* son capaces de proliferar en sustratos de bajo aw.

Las aflatoxinas, producidas por *A. parasiticus* y *A. flavus* son potentes hepatocarcinógenas cuya presencia en ciertos alimentos como el maní y el maíz ha sido correlacionada, a través de estudios epidemiológicos, con alta incidencia de cáncer de hígado en la población humana de ciertos países africanos y del sudeste asiático. (Fernandez Pinto, 1996). Aunque se asume que los humanos sufren problemas

médicos asociados con las micotoxinas, la mayor parte de los efectos se han visto en animales alimentados con piensos contaminados.

Algunas cepas de *A. flavus* producen conjuntamente con las aflatoxinas otras toxinas como el ácido ciclopiazónico, con la posibilidad de una acción sinérgica entre ambos metabolitos tóxicos (Fernandez Pinto, 1996).

La ocratoxina A, causante de nefropatías, puede ser sintetizada por algunas especies de *Aspergillus*, como *A. ochraceus*. Estudios recientes han demostrado que la ocratoxina A posee además propiedades carcinogénicas, teratogénicas e inmunotóxicas (Abarca, 2000).

Otras toxinas producidas por especies de este género, los tremorgenos, causan disturbios neurológicos en animales (Fernandez Pinto, 1996).

• El género *Penicillium* se asocia frecuentemente al deterioro de alimentos en regiones de climas templados , dado que su crecimiento se ve favorecido por temperaturas relativamente bajas.

Numerosas especies de este género son xerofílicas.

Existen micotoxinas que son producidas por especies de distintos géneros, como el ácido ciclopiazónico y la ocratoxina A. Algunas cepas de *P. verrucosum* producen simultáneamente ocratoxina A y citrinina, ambas nefrotoxinas, existiendo nuevamente la posibilidad de sinergismo.

La patulina es producida por *P. expansum*, agente de la podredumbre marrón de la manzana, por lo cual es común encontrarla en jugos y concentrados elaborados con esta fruta. Es altamente tóxica y carcinogénica y es producida además por *P. patulum* (Rice, 1977), y por cepas de *B. nivea*, aisladas de frutillas procesadas por calor.

† El género *Fusarium* es contaminante frecuente de cereales, oleaginosas y leguminosas. Muchas especies son fitopatógenas. Debido a su asociación con vegetales y a sus requerimientos de alto aw, generalmente contaminan los cultivos en la etapa precosecha. Algunas especies pueden crecer y producir toxinas a baja temperatura (Fernandez Pinto, 1996).

La zearalenona es una micotoxina estrogénica que causa trastornos en el aparato reproductor de animales de granja, especialmente cerdos alimentados con maíz enmohecido, con las consiguientes pérdidas económicas (Fernandez Pinto, 1996).

Las micotoxicosis producidas por tricotecenos son en general caracterizadas por presentar hemorragias gastrointestinales, vómitos, ataxia y pérdida del apetito (Smith, 1992).

Dentro de los tricotecenos producidos por especies del género *Fusarium* se han descrito alrededor de 45 compuestos de origen natural, pero los estudios toxicológicos más extensivos han sido desarrollados en relación con toxina T-2, toxina HT-2, deoxinivalenol y fusarenona-x (Ueno, 1983).

Se absorben a partir del tracto digestivo y se distribuyen a los diferentes tejidos y órganos sin que se produzca una acumulación evidente en ningún órgano específico. Sin embargo, los estudios de distribución realizados al presente, están principalmente limitados a la toxina T-2 y a su metabolito natural la toxina HT-2 (Environmental Health Criteria, 1990).

Las fumonisinas, asociadas a enfermedades del ganado como la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar en cerdos, han demostrado ser cancerígenas y se sospecha que puedan estar involucradas en la alta incidencia de cáncer de esófago en ciertas áreas de Africa y Asia (Fernandez Pinto, 1996). Se ha citado su capacidad hepatotóxica y hepatocarcinogénica en ratas y se ha correlacionado estadísticamente su presencia en alimentos con la prevalencia de cancer de esófago en el hombre (Abarca, 2000).

La presencia del hongo en el alimento no asegura que en éste se haya producido la toxina, sin embargo la misma sirve de alerta de un peligro potencial. Por otra parte la micotoxina puede permanecer en un producto aún cuando el hongo ya no esté viable en el mismo y el alimento no presente modificaciones en sus propiedades organolépticas (Fernandez Pinto, 1996).

Géneros toxicogénicos y sus toxinas**Género *Aspergillus***

<u>Micotoxina</u>	<u>Especie productora</u>
Aflatoxina B1 y B2	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i>
Aflatoxina G1 y G2	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus tamarii</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> y especies relacionadas.
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i>
Fumitremorgenos	<i>Neosartorya fischeri</i>
Triptoquivalina	<i>Aspergillus clavatus</i>
Territremorgenos	<i>Aspergillus terreus</i>

Equinulina	<i>Eurotium chevalieri</i>
	<i>E. amstelodami</i>

Hocking, 1997

Género *Penicillium***Micotoxina****Especie productora**

Citreoviridina	<i>P. citreonigrum</i>
	<i>Eupenicillium ochrosalmoneum</i>
Citrinina	<i>P. citrinum</i>
	<i>P. expansum</i>
	<i>P. verrucosum</i>
Acido ciclopiazónico	<i>P. camemberti</i>
	<i>P. chrysogenum</i>
	<i>P. viridicatum</i>
Ocratoxina A	<i>P. verrucosum</i>
Patulina	<i>P. expansum</i>
	<i>P. griseofulvum</i>
	<i>P. roqueforti</i>

Penitrem A	<i>P. crustosum</i>
	<i>P. glandicola</i>
Pr toxina	<i>P. roqueforti</i>
Roquefortina C	<i>P. roqueforti</i>
	<i>P. crustosum</i>
Acido D. secalónico	<i>P. oxalicum</i>

Pitt, 1997

Género *Fusarium*

<u>Micotoxina</u>	<u>Especie productora</u>
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>
Tricotecenos Grupo A	<i>F. graminearum</i>
	<i>F. poae</i>
Toxina T-2, DAS,	<i>F. sporotrichoides</i>
Neosolaniol	<i>F. equiseti</i>

Grupo B

DON, 3 Ac. DON, *F. graminearum*

15 Ac. DON, Nivalenol, *F. culmorum*

Fusarenona

Fumonisinias *F. verticillioides*

F. proliferatum

Logrieco, 2000

1. 5. 8. Control de las micotoxinas:

A los fines de prevenir la ingestión de metabolitos tóxicos peligrosos, es necesario controlar el desarrollo de estos microorganismos que también son activos agentes de biodeterioro. Se debe evitar el crecimiento del hongo durante la cosecha o almacenamiento (Rainer, 1985).

La producción puede restringirse:

- Impidiendo el crecimiento del hongo antes de la cosecha, frecuentemente mediante el uso de fungicidas.
- Las condiciones ambientales después de la cosecha, particularmente los niveles de humedad y temperatura durante el almacenamiento.
- Ajustando los niveles osmóticos de los alimentos, añadiendo azúcares o sales.

- Evitando la contaminación por insectos durante el almacenamiento ya que estos aumentan la contaminación fúngica (Rainer, 1985).

1. 5. 9. Incidencia económica de las micotoxinas:

Las micotoxinas están ligadas al sector productivo, debido a que la contaminación fúngica se lleva a cabo durante el cultivo y/o durante el almacenamiento.

A los efectos perjudiciales sobre la salud, se suman graves pérdidas económicas. Estas últimas se refieren por una parte a la disminución de la disponibilidad de alimentos, a la comercialización de materias primas contaminadas, a la mortalidad de los animales de producción y a las pérdidas derivadas (Resnik, 1997).

Las micotoxinas producen un amplio rango de efectos perjudiciales en los animales. El impacto económico de la reducción de la productividad del animal, incrementa la incidencia de enfermedades debido a inmunodepresión, daño en órganos vitales e interferencia con capacidad reproductiva, es muchas veces más grande que el impacto causado por la muerte debido a un envenenamiento con micotoxinas (Extraído de una publicación electrónica: "Understanding and Coping with effects of Mycotoxins in Livestock Feed and Forage", 1994. Dirección electrónica: <http://www.ces.ncsu.edu/drought/dro-29.html>).

I. 6. HONGOS RESISTENTES AL CALOR

PRODUCTORES DE MICOTOXINAS

I. 6.1. Género *Byssoschlamys*

Algunos aislados de *B. fulva* y *B. nivea* pueden producir patulina en frutas bajo ciertas condiciones experimentales. Patulina fue considerada una micotoxina de significativa potencia (Rice, 1977; Roland, 1984). Muy bajos niveles de patulina fueron producidos en atmósferas con menos de 0,5 % de oxígeno y 20-30 % de dióxido de carbono (Tamawaki, 1995). El mínimo valor de aw para la producción de patulina fue de 0,92 a 21 °C y 0,87 a 30 y 37 °C (Roland, 1984).

Originariamente fue un antibiótico y estudios toxicológicos concluyeron que este antibiótico era tóxico para uso terapéutico (Doores, 1984). Posteriormente se la consideró de baja toxicidad y como indicador de la calidad de la materia prima utilizada para elaborar dichos productos (Pitt, 1997; Samson, 1992). En la actualidad Lee y Rösenthaller mostraron que causa rotura de una de las cadenas de DNA en *Escherichia coli* a una concentración de 10 µg/ml y rotura de la doble cadena a una concentración de 50 µg/ml. Se han reportado también rotura de la simple y doble cadena de DNA en células FM3A y en células HeLa (células eucariotas) (Dirheimr, 1998).

I. 6. 2. Género *Neosartorya*

N. fischeri produce principalmente fumitremorgenos A, B, C (Horie, 1981) y verruculogeno (Beuchat, 1988; Nielsen, 1988; Samson, 1990; Frisvad, 1991; Patterson, 1981), todas ellas toxinas tremorgénicas.

I. 7. TOXINAS TREMORGÉNICAS

I. 7. 1. Generalidades:

El incremento en investigaciones sobre micotoxinas en general en la década pasada, ha llevado a descubrir metabolitos fúngicos que son capaces de producir temblores intermitentes en animales vertebrados.

Las micotoxinas tremorgénicas pueden ser convenientemente clasificadas en cuatro grupos, basados sobre semejanzas químicas.

Estos grupos son:

- 1. Grupo *penitrem***
- 2. Grupo *fumitremorgeno - verruculogeno***
- 3. Grupo *paspalítem***
- 4. Grupo *triptoquivalina***

Todos los tremorgenos tienen en común una mitad indol derivada del triptofano.

Los hongos capaces de producir metabolitos secundarios tremorgénicos pertenecen a especies taxonómicamente diversas. Estos

hongos son capaces de contaminar a variedades agronómicas como granos de cereal, ensilados, etc., y se conoce o se sospecha que varias enfermedades animales son causadas por estos hongos.

Los tremorgenos contienen una base biológica activa con núcleos químicos derivados de geranilgeraniol y triptofano (Koul, 1993).

Las toxinas tremorgénicas son neurotoxinas que en bajas dosis producen temblores por largos períodos de tiempo y no causan efectos adversos en animales, pero pequeños incrementos en la dosis pueden ser letales. Se confirmaron las propiedades tremorgénicas de extractos conteniendo fumitremogeno B por bioensayo en ratón, cuando se inoculó intraperitonealmente causó temblores (a veces violento), convulsiones y en varios casos muerte dentro de los cinco minutos de la administración de la toxina (Paterson, 1979).

Los fumitremogenos A, B y C son dipéptidos cíclicos tóxicos que afectan el sistema nervioso central (Cole, 1981). Incorporados en la dieta de ratas y ratones de laboratorio causan temblores y la muerte del 70 % de los animales testeados (Golinski, 1991), como resultado de cambios bioquímicos que afectan la neurotransmisión (Parera, 1982; Yamazaki, 1979).

Fumitremogeno C es un agente quimiosensibilizante frente a líneas de células de carcinoma de colon, su modo de acción sería por reversión de la resistencia a drogas tales como colchicina (Sridhar, 1988).

La administración intraperitonealmente (IP) de 1 miligramo de toxina pura (fumitremogeno A y B) por ratón, causa temblores

sustanciales con convulsiones intermitentes, pero no se observa toxicidad

aguda a este dosis leve. La administración de 5 miligramos por ratón causa la muerte del 70 % de los animales en 96 horas (Cole, 1972; Yamazaki, 1979).

Verruculogeno tiene una estructura similar a la de los fumitremorgenos pero con una diferencia en la cadena lateral. Es tremorgénica para ratón y pollo (Golinski, 1991) y se postula que causa la inhibición de las células alfa motoras del asta anterior (Cole, 1981).

Verruculogeno administrado oral o IP causa severos temblores y toxicidad aguda en ratones y gallos. Aparecen temblores en los 5 minutos luego de la administración oral dependiendo del nivel de dosis. Signos clínicos severos en ratones y gallos jóvenes, se sumaron a temblores y estos signos fueron: sensibilidad al sonido, espasmos tetánicos y afixia (Cole, 1972).

Experiencias en grandes animales sugieren que los tremorgenos producidos por hongos contaminantes del suelo pueden estar implicados en la patogénesis de migrañas y temblores de ryegrass (Patterson, 1979).

La triptoquivalina, junto a triptoquivalona y otros compuestos relacionados, también son toxinas tremorgénicas producidas por *N. fischeri* (Samson, 1990).

Debido a que fue demostrado el crecimiento del hongo y producción de fumitremorgenos A y B y verruculogeno a tan bajos niveles de oxígeno como 0,1 %, la presencia de este moho en productos

de frutas procesados por calor, debe ser una preocupación para la salud pública (Nielsen, 1989).

De hongos aislados de pasturas, se obtuvo verruculogeno y el mismo se asoció con una enfermedad que presenta migrañas y temblores en ganado vacuno y ovejas (Patterson, 1981; Gallagher, 1977).

Se sabe que verruculogeno es producido por *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium verrucosum*. Además se comprobó por estudios sobre toxigenicidad que existen ciertas especies que podrían considerarse productoras potenciales de verruculogeno. Estas especies son: *Neosartorya fischeri*, *Penicillium piceum*, *P. nigricans* (Gallagher, 1977).

I. 7. 2. Géneros fúngicos productores de toxinas tremorgénicas:

I. 7. 2. 1. Género *Talaromyces*

T. macrosporus es productor de duclauxin, un metabolito secundario cuya significancia como micotoxina aún no ha sido establecida (Pitt, 1997).

No se conoce la producción de micotoxina de *T. flavus* (Pitt, 1997).

I.7. 2. 2. Género *Eupenicillium*

Algunos aislados de *E. javanicum* han sido reportados como productores de xanthomegnin y palitantin (Frisvad, 1990), probablemente con poca importancia práctica.

I. 7. 2. 3. Género *Neosartorya*

La mayoría de las especies de *Neosartorya* son capaces de producir los siguientes metabolitos secundarios tóxicos:

Taxon	Micotoxina y Antibiótico
<i>N. aurata</i>	Ac. helvólico
<i>N. aureola</i>	Triptoquivalina
<i>N. fennelliae</i>	Tripacidina, viridicatumtoxina
<i>N. fischeri</i> var. <i>glabra</i>	Avenaciolide, mevinolinas, triptoquivalina, tripacidina
<i>N. fischeri</i> var. <i>spinosa</i>	Triptoquivalina, terreina
<i>N. fischeri</i> var. <i>fischeri</i>	Fumitremorgenos A, B, C y verruculogeno, terreina, triptoquivalina
<i>N. quadricincta</i>	Acido ciclopáidico

N. stramentia

Canadensolide

Samson, 1990

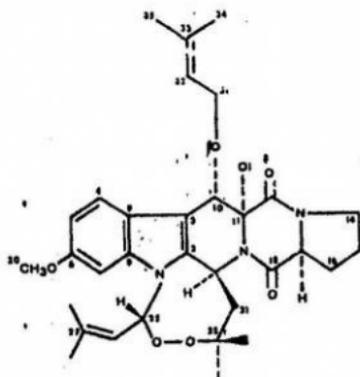
La baja temperatura de 4 °C favorece la acumulación de toxina tremorgénica cuando los hongos que la producen se desarrollan sobre diferentes materias agrícolas. Sin embargo el grado de formación de toxina es más rápido a la temperatura de 20 °C. Se sugiere que el sinergismo entre tremorgenos puede ser un factor de síndrome de temblores ryegrass (RGS) (Hou, 1971).

1. 7. 3. Fumitremorgeno A

Peso molecular: 579.2943

Fórmula molecular: C₃₂H₄₁O₇N₃

Fórmula química:



Características generales: produce prismas incoloros en metanol. Es soluble en cloroformo y acetato de etilo, ligeramente soluble en metanol y etanol. Inestable por exposición prolongada a la luz.

Datos de UV: $\lambda_{m\acute{a}x}^{etanol}$ nm (ϵ): 226

277

296

Hongos productores: *Aspergillus caespitosus*
Neosartorya fischeri var. *Fischeri*

Datos de TLC: Absorbente: silicagel GHR.
 Solvente A: cloroformo - acetona (93:7 vol./vol.).
 Solvente B: tolueno - acetato de etilo - ácido fórmico
 (5:4:1 vol./vol./vol.).
 RfA: 0,30 RfB: 0,65

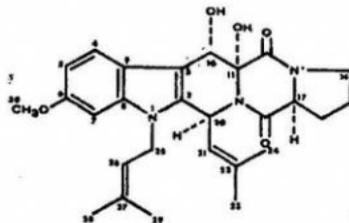
Detección: mancha azul - verdosa bajo luz visible o mancha mostaza bajo luz UV, desarrollada inmediatamente luego de sprayar con solución de ácido sulfúrico - etanólico (50 %) (Cole, 1981).

1. 7. 4. **Fumitremorgeno B**

Peso molecular: 479.2420

Fórmula molecular: C₂₇H₃₃O₅N₃

Fórmula química:



Características generales: produce agujas incoloras en metanol.

Datos de UV: $\lambda_{m\acute{a}x}^{etanol}$ nm (ϵ): 228
278
297

Hongos productores: *Aspergillus caespitosus* (NRRL 1929)
Neosartorya fischeri var. *fischeri*

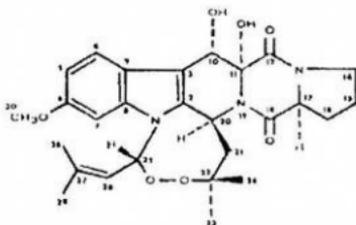
Datos de TLC: Absorbente: silicagel 60 HR.
Solvente A: dietil éter
Solvente B: acetona - cloruro de metileno
(5:95 vol./vol.).
RfA: 0,67 RfB: 0,38

Detección: mancha azul brillante fluorescente bajo luz UV, desarrollada inmediatamente luego de sprayar con solución de $AlCl_3$ al 20 % en etanol y calentar por 10 minutos a 100 °C (Cole, 1981).

1. 7. 5. Verruculogeno

Peso molecular: 511.2318

Fórmula molecular: $C_{27}H_{33}O_7N_3$



Características generales: produce láminas incoloras en benceno - alcohol etílico 1:1 (vol./vol). Es soluble en benceno, acetato de etilo y acetona. Ligeramente soluble en etanol. Muy soluble en CHCl_3 . Inestable por exposición prolongada a la luz.

Datos de UV: $\lambda_{\text{máx}}^{\text{etanol}}$ nm (ϵ): 226
277
295

Hongos productores: *Neosartorya fischeri* var. *fischeri*
Penicillium verruculosum

Datos de TLC: Absorbente: silicagel GHR.
Solvente A: cloroformo - acetona (93:7 vol./vol.).
Solvente B: tolueno - acetato de etilo - ácido fórmico
(5:4:1 vol./vol./vol.).
RfA: 0,30 RfB: 0,65

Detección: mancha azul - verdosa bajo luz visible o mancha mostaza bajo luz UV, desarrollada inmediatamente luego de sprayar con solución de ácido sulfúrico - etanólico (50 %) (Cole, 1981).

I.8. DETERIORO DE LAS FRUTAS

Virtualmente, todas las frutas en su estado natural son susceptibles de deterioro por acción de microorganismos, a una velocidad que depende de diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Por esta causa, procedimientos como secado, fermentación, congelación, refrigeración, enlatado o inactivación, son en la actualidad utilizados para su preservación (ICMSF, 1980).

Las formas microbianas predominantes de los frutos son fúngicas, no bacterianas y causan extenso daño a las frutas y vegetales (Burchill, 1986; Snowden, 1990).

En muchos casos los hongos atacan la fruta durante la cosecha y siguen creciendo durante el almacenamiento.

Los microorganismos que causan el deterioro de las mismas pueden ser clasificados como:

- a) parásitos de las heridas, que atacan los tejidos dañados
- b) auténticos parásitos que directamente invaden productos no dañados (Wainwright, 1995).

La presencia de hongos en productos de frutas procesadas puede representar una preocupación para la salud pública.

I. 8.1. Microflora de los frutos:

La población residente o primaria consiste en organismos que generalmente se adhieren sobre la superficie de la fruta. La microflora

secundaria está representada por vectores externos tales como: el suelo, insectos, roedores, etc., que puedan depositarse sobre la superficie de la misma. Es muy dificultoso diferenciar entre estas dos poblaciones (Doores, 1984).

Muchos frutos poseen mecanismos de defensa naturales, tales como una gruesa piel o sustancias antimicrobianas, como son los aceites esenciales (ICMSF, 1980).

La mayor parte de las investigaciones se ha dirigido hacia la prevención de las enfermedades en el campo, más que a las alteraciones sufridas tras la recolección, puesto que las mayores pérdidas económicas se verifican antes de que ésta se lleve a cabo (ICMSF, 1980).

La naturaleza nutritiva de las frutas, los convierte en un rico hábitat para los microorganismos. Es así que una serie de factores seleccionan los tipos de poblaciones microbianas particulares en ellos. Tal vez el más importante de estos factores esté relacionado con el estado biológico de la fruta.

Lo que determina el daño de los alimentos frescos, es la habilidad de los microorganismos específicos de superar los mecanismos de defensa, atravesando la cubierta exterior o cutícula del fruto (Alderman, 1974).

I. 8. 2. Frutos frescos:

Alteración: Las frutas se encuentran dentro del grupo de alimentos

frescos constituidos por células vivas, o sea que después de su recolección continúan respirando activamente y produciendo calor. Se ha llegado a definir a la fruta fresca como agua envasada en un recipiente de fantasía. Este envase presenta el inconveniente de que a veces es excesivamente permeable, lo que facilita en gran medida la transición. Las pérdidas de agua representan no sólo una disminución del peso comercial, sino que también provocan un descenso importante de la calidad sensorial al afectar la apariencia y textura del fruto (Olias, 1995).

Fundamentalmente tres son las causas de estas pérdidas: las características fisiológicas propias del fruto, la influencia de factores externos y la inadecuada manipulación post cosecha.

Al ser alimentos biológicamente activos, tienen extremadamente desarrollado un efectivo mecanismo de defensa contra la invasión de sus predadores. Cuando éstos son capaces de vencerlo aparece el deterioro (Pitt, 1997).

Si bien poseen un elevado contenido de agua (aw de 0,98 o superior) son generalmente ácidas, en el rango de pH 1,8 - 2,2 las más ácidas, a 4,5 - 5,0 las menos ácidas (Splittstoesser, 1987), lo que origina una elevada resistencia a la invasión bacteriana, siendo su descomposición casi siempre causada por mohos.

Los mecanismos de defensa de las frutas, son altamente efectivos, para casi todos los mohos, siendo un pequeño número de géneros y especies capaces de invadir y causar deterioro. Algunos

patógenos son altamente especializados, atacando sólo uno o dos tipos de frutas (Pitt, 1997).

Durante la maduración, las frutas se vuelven cada vez más susceptibles a la invasión fúngica, porque el pH de los tejidos se incrementa, las capas externas se ablandan, los carbohidratos solubles se acumulan, y las barreras ceden (Pitt, 1997).

La influencia de la temperatura en la prevención del daño fúngico de un alimento tiene dos aspectos:

- temperatura durante el procesamiento
- temperatura durante el almacenamiento

Las condiciones de calentamiento afectan profundamente la resistencia térmica. Los niveles altos de azúcar son generalmente protectores (Beuchat, 1977).

Los pH bajos y la presencia de preservativos incrementan el efecto del calentamiento y también impiden la recuperación de células dañadas (Beuchat, 1988; Beuchat, 1978).

Las esporas fúngicas resistentes al calor pueden sobrevivir los procesos de pasteurización dados a los alimentos ácidos.

I. 8. 3. Frutas pasteurizadas:

Alteración:

Los procesos de calentamiento de alimentos ácidos como frutas y

productos a base de fruta son tradicionalmente suaves, debido a que las esporas bacterianas no son un problema.

Para la mayoría de las frutas, una pasteurización a temperatura cercanas a los 70 - 75 °C es efectiva, inactivando la mayoría de las enzimas, levaduras y conidias de hongos contaminantes. Sin embargo, los hongos productores de ascosporas son capaces de sobrevivir tales procesos y causar alteración (Pitt, 1997).

Byssoschlamys nivea y *B. fulva* fueron reportados como causa de alteración de frutillas en latas o botellas y geles frutales para bebés (Pitt, 1964; Richarson, 1969; Hocking, 1984).

Por su parte, *Neosartorya fischeri* fue aislada de alimentos ácidos pasteurizados como frutillas enlatadas (Kavanagh, 1963; Mc Evoy, 1970), jugos de frutas (Jesenska, 1985; Scott, 1987) y polvos de frutas (Beuchat, 1992 b). Además, las frutas frescas tratadas con calor producen frecuentemente aislados de esta especie (Spotti, 1992), por la activación que las ascosporas presentes sufren con el calor (APHA, 1984).

Sólo aislados de *Neosartorya* han sido encontrados en alimentos y bebidas sometidos a tratamientos térmicos (Kavanagh, 1963; Mc Evoy, 1970; Splittstoesser, 1977; Hocking, 1984; Jesenska, 1984; Jesenska, 1985; Scott, 1987; Splittstoesser, 1989).

Pero no fue documentado daño del alimento debido a su presencia (Kavanagh, 1963; Mc Evoy, 1970).

Talaromyces macrosporus, *T. flavus* y diferentes especies de

Eupenicillium son también potenciales causantes de daño en productos procesados por calor (Hocking, 1984).

I. 9. LAS FRUTILLAS

La frutilla pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Rosoideas, género *Fragaria* (del latín: fragancia) (Vigliola, 1987).

I. 9. 1. Origen e historia:

La antigüedad de las especies de frutillas se estima en unos 50 millones de años, apareciendo las primeras referencias escritas sobre su aprovechamiento en la época romana que mencionaban a las frutillas como producto de cosecha silvestre (Vigliola, 1987).

Desde la Edad Media, en que las plantas silvestres comenzaron a cultivarse en los jardines, y hasta el siglo XVIII, la variedad de frutilla silvestre predominante en el hemisferio norte fue *Fragaria vesca* L., caracterizada por el pequeño tamaño de sus frutos. Se cree que los indios del sur de Chile, cultivaban *F. chiloensis* antes de la llegada de los españoles. Esta variedad fue introducida en Europa por los franceses, constituyéndose en la base para la creación de las variedades comerciales modernas (Vigliola, 1987).

La frutilla moderna es una planta que presenta frutos de mayor tamaño, y cuyo origen es el resultado del cruzamiento.

La frutilla puede prosperar en diferentes tipos de suelos, pero prefiere los ácidos o subácidos, con pH comprendido entre 5 y 6. Con

relación a la estructura, son preferibles los primeros 30 cm, fundamentalmente para que las raíces alcancen un mayor desarrollo. El cultivo no tolera la falta de drenaje (Pilotti, 1995). Las condiciones ideales de cultivo se dan en suelos con tenores elevados de materia orgánica para que haya buena retención de agua y nutrientes. El exceso de nitrógeno afecta a los frutos tornándose insípidos, de mala conservación (Vigliola, 1987).

El consumo de frutillas como producto fresco o como alimento procesado en forma de confitura, mermelada, helado, yoghurt, ha experimentado una rápida difusión en los últimos años (Olías, 1995). Entre las causas impulsoras de este incremento del consumo, podemos destacar los aspectos intrínsecos del fruto y aspectos psicológicos del consumidor.

◆ Aspectos intrínsecos

Delicado sabor y aroma, su valor nutritivo, en el que destacan su elevado contenido en vitamina C (Tabla 1), superior al de los cítricos y su alto contenido en ácido eláxico, de gran interés por sus propiedades anticarcinogénicas.

◆ Aspectos psicológicos

Su estacionalidad o disponibilidad limitada, que le confiere un mayor atractivo al producto y la hacen más deseable que las frutas a las que se tiene acceso todo el año.

Si tuviésemos que elegir una sola característica del fruto como principal atractivo para el consumidor, tendríamos que destacar el aspecto estético, la apariencia externa de las frutillas, que hacen de ella una fruta tentadora y apetecible.

Cuidar la calidad y aspecto de la frutilla, evitando el deterioro causado por el marcado carácter perecedero de este fruto, constituye el principal reto de productores y distribuidores para incidir en un aumento del consumo (Ollás, 1995).

TABLA 1

Composición química media de las frutillas según FAO (1995)

Contenido por 100 g de fruta

Valor energético	40 calorías
Proteínas	0,9 g
Grasas	0,5 g
Carbohidratos	13 g
Calcio	21 mg
Fósforo	21 mg
Potasio	164 mg
Sodio	1 mg
Hierro	1 mg
Vitamina A	100 UI
Vitamina B1	0,03 mg

Continuación Tabla 1

Vitamina B2	0,07 mg
Vitamina B5	0,90 mg
Vitamina C	90 mg

1. 9. 2. Producción e Industrialización:

En nuestro país se cultivan unas 1000 Ha de frutilla, distribuidas de la siguiente manera: Buenos Aires, Santa Fe y otras provincias entre las que se encuentran Mendoza, Salta, Tucumán y Río Negro (Pilatti, 1997).

1. 9. 3. Zonas productoras:

Se puede dividir la Argentina en tres zonas principales de cultivo según las características ecológicas propias.

- 1) Zona norte: delimitada al sur por una línea imaginaria que pasa por Concordia, Coronda y Mendoza.
- 2) Zona sur: limitada al norte por un arco que pasa por San Rafael (Mendoza), sur de San Luis, norte de La Pampa hasta Necochea en Buenos Aires.
- 3) Zona intermedia: es la que se ubica entre las anteriores.

El centro productor más importante se encuentra en la localidad de Coronda (Provincia de Santa Fe), el cual representa el 50 % de la superficie cultivada (aproximadamente 500 Ha); luego se ubica Buenos Aires con 250 Ha, Corrientes con 150 Ha y Salta, Jujuy y Tucumán, con aproximadamente 100 Ha (Vigliola, 1987).

La mayor parte del cultivo de frutilla en la provincia de Santa Fe se encuentra en la zona de Coronda, que abarca los distritos de Coronda, Arocena y Desvío Arijón. Es una franja de 35 Km de largo y 3-4 Km de ancho sobre el río Coronda (Pilatti, 1995).

La producción regional de frutillas tiene una gran importancia por su historia, ubicación geográfica, especialización y por constituir un nicho ecológico exclusivo (SAPyA, 1996).

I. 9. 4. Situación de la región de Coronda:

Superficie cultivada:	470 Ha
Rendimiento promedio:	20000 Kg/Ha
Producción anual:	10000 Ton
Destino de la producción:	50 % consumo fresco y 50 % para industrias.
Industrialización:	Dulces, pulpas, congelados, cubeteados (INTA, 1999).

La provincia de Santa Fe, con la riqueza de sus suelos y la

variedad de sus climas, ofrece muy buenas condiciones naturales para desarrollar una estrategia global de producción competitiva que le permita acceder a nuevos mercados (INTA, 1999).

En la región de Coronda (Departamento San Jerónimo) se desarrolla el cultivo de la frutilla, obteniéndose un producto de excelente calidad, reconocido en los mercados más exigentes.

En los suelos arenosos de la región centro este de la provincia de Santa Fe, nacen las FRUTILLAS DE CORONDA. Los corondinos presentan un producto diferenciado por su particular sabor, color y aroma, haciéndolo inconfundible al gusto de los exigentes consumidores (Magic, 1999).

En el período 1994-1998 se registró un sostenido aumento de los rendimientos por Ha debido a la incorporación de tecnología como el "mulching" de polietileno, nuevos cultivares de plantines (origen meristemático), fertirrigación, tratamiento de suelo, túneles, invernáculos, etc.

Por las características genéticas y agronómicas de los plantines utilizados y la diferente época de trasplante, se ha logrado ampliar el período de cosecha. Santa Fe representa el 40 % de la producción nacional (Magic, 1999).

Debido al constante crecimiento de la producción regional de frutilla, los productores y el gobierno provincial plantearon la necesidad de establecer una estrategia agroalimentaria: la "Denominación de Origen". Esta persigue como metas el mejoramiento de las condiciones

de comercialización en los mercados nacionales e internacionales, el establecimiento de un vínculo entre la calidad del producto y su origen, disponer de un elemento jurídico que proteja la diferenciación de productos y el funcionamiento de una "marca colectiva" que compartan los productores de la región. Esto implica elaborar un producto con aplicación de controles en cada uno de los procesos, desde la etapa inicial hasta la presentación al consumidor, con el objeto de lograr seguridad y calidad (Magic, 1997; Magic, 1999).

El Consejo de la Denominación de Origen Frutillas de Coronda controla exhaustivamente todas las fases del proceso productivo: desde las tareas de laboreo del suelo y la selección de plantines, hasta el manejo del cultivo, ajustándolo a los criterios que el protocolo de calidad exige (Magic, 1999).

Al tener dirigida la atención directamente al control de los factores claves que intervienen en la sanidad y en la calidad en toda la cadena alimentaria, el gobierno, el productor, el fabricante y el consumidor del alimento pueden estar seguros que se alcanzan y se mantienen los niveles deseados de sanidad y calidad (ICMSF, 1991).

I. 9. 5. Cosecha:

Se efectúa manualmente evitando los golpes y el exceso de manipuleo.

Debido al carácter altamente perecedero de la frutilla, es conveniente cosecharlas en las primeras horas de la mañana. El fruto

debe estar casi totalmente pigmentado y debe presentar todas sus cualidades organolépticas, ya que luego de cosechado no aumenta los azúcares ni los sólidos solubles y el grado de acidez permanece constante.

En Argentina se cosecha en canastos revestidos de tela, también suele usarse bandejas plásticas. La periodicidad de las recolecciones depende de la época, estado del cultivo y lluvias, realizándose desde una cosecha semanal al iniciarse la época hasta una diaria en plena producción (Vigliola, 1987).

Epoca de cosecha:

La época difiere según la región: en Coronda, de fines de Agosto a mediados de Noviembre.

I. 9. 6. Comercialización:

La fruta se lleva a galpón donde se embala en cajas de madera de 3 Kg de capacidad o cajitas de 0,5 - 1 Kg

También se utilizan cajas de cartón corrugado de 300 g de capacidad y a veces envases plásticos.

La totalidad de la producción de frutilla de la región, se destina al mercado interno. La exportación de productos frescos y elaborados es poca y en 1998 se enviaron productos congelados con destino a Holanda, Alemania y Brasil por un total de 600 Ton (Magic, 1999).

I. 9. 6. Fuentes de contaminación:

Debido a la forma que las frutillas tienen y su desarrollo muy próximo al suelo, son fáciles de contaminar con tierra y esporas fúngicas (Pitt, 1997; Beuchat, 1986). Además son susceptibles al ataque de insectos, roedores y contaminación fecal de animales mayores. Esto implica un riesgo potencial de gérmenes patógenos entéricos ya que parte de la cosecha se consume cruda (ICMSF, 1991).

Las ascosporas fúngicas, una vez formadas pueden permanecer en estado latente por meses y aún años en los recipientes y equipos utilizados para su cosecha, transporte y procesamiento (Beuchat, 1986; Samson, 1992).

La frutilla posee una piel muy fina que se rompe con facilidad y una pulpa blanda con elevado contenido de humedad, muy susceptible al aplastamiento y herida. Esta estructura la hace por lo tanto especialmente vulnerable al daño mecánico, de forma que la calidad del fruto cuando llega al consumidor, depende en gran medida del trato recibido de las distintas etapas por las que puede pasar una vez recolectada (Oliás, 1995).

Las principales alteraciones fúngicas son causadas por *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Mucor piriformis* (Snowdon, 1990) y además por *Neosartorya*.

La podredumbre gris o *Botrytis*:

Es la enfermedad más seria y más frecuente. El tejido afectado

adquiere un color rosa mate a marrón, pudiendo extenderse a todo el fruto sin desintegración y con poca exudación.

Pasado un tiempo, la lesión exhibe en la superficie del fruto un micelio blanco que se transforma en gris cuando se produce la esporulación (Oliás, 1995).

Las pérdidas pueden ser grandes con la diseminación del hongo por contacto y forman "nidos" de frutas en descomposición.

Podredumbre acuosa:

Causada por hongos del género *Rhizopus*, tales como *R. nigricans* y *R. stolonifer*, que infectan al fruto una vez maduro a través de las heridas, manifestándose durante la conservación y transporte por ablandamiento del fruto y el característico exudado.

Otra enfermedad de similar sintomatología está causada por el hongo *Mucor piriformis*, el cual causa grandes pérdidas en la producción de frutillas.

Levaduras:

Son colonizadores normales de las frutillas, estando presentes en cantidades superiores a 10^5 UFC/g en macerados de frutas maduras (Bukagian, 1971). Producen pérdida de vigor, tamaño menor de la fruta y decaimiento de la productividad (Vigliola, 1987).

Neosartorya fischeri:

Es un hongo que crece comunmente en ambientes húmedos tales como suelo, vegetación putrefacta y desechos orgánicos donde produce gran número de ascosporas (Raper, 1965). Estas ascosporas resistentes al calor están extensamente distribuidas en el suelo, por lo que los problemas de contaminación aparecen con frecuencia en productos que contienen frutas cosechadas del suelo o cerca de él (Hocking, 1984).

Es importante señalar que las especies de *Neosartorya* son capaces de producir metabolitos secundarios tóxicos (Beuchat, 1989).

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto respecto de la importancia del cultivo de frutilla en la zona de Santa Fe, como así también el riesgo que implica la sobrevivencia de ascosporas de *Neosartorya fischeri* en productos a base de frutilla, se proponen los siguientes objetivos.

Objetivos generales

1. Adquirir destreza en la identificación de cepas fúngicas resistentes al calor contaminantes de alimentos, mediante la observación de las características macro y microscópicas.
2. Poner a punto técnicas cromatográficas en Capa Delgada y Líquida para estudiar la presencia de fumitremorgenos A, B, y verruculogeno.

Objetivos específicos

- A. Investigar la flora fúngica resistente al calor en frutillas frescas de la zona de Coronda y en pulpas de frutillas para incorporar a yogur, previo tratamiento térmico de 80 ° por 15 minutos con especial énfasis en *Neosartorya fischeri*.

- B.** Estudiar la capacidad productora de fumitremorgenos A, B, y verruculogeno de las cepas de *Neosartorya fischeri*, aisladas en el objetivo A.

CAPITULO II

**MATERIALES Y
METODOS**

II.1. MUESTRAS

Se estudiaron 10 muestras de frutillas frescas y 20 muestras de pulpa de frutilla envasada para agregar a yogur.

Se trabajó con frutillas naturales cosechadas y comercializadas a granel en la zona de Coronda durante los meses de Setiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre del año 1999. Las muestras fueron recogidas en recipientes estériles y conservadas hasta el momento de su análisis a -18 °C. Los envases conteniendo pulpa de frutilla fueron tomados al azar de un comercio de la ciudad de Santa Fe durante los meses de Febrero, Marzo y Abril del año 2000.

II. 2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA FLORA FÚNGICA RESISTENTE AL CALOR

II. 2. 1. Aislamiento:

II. 2. 1. a) Preparación de las muestras:

En condiciones de esterilidad, se retiraron los cabos y sépalos de las frutillas y se trituraron las mismas durante 60 segundos en molinillo de cuchillas, esterilizado con alcohol etílico 70:30 hasta la formación de un puré.

II. 2. 1. b) Proceso térmico:

Se tomaron tres alícuotas de 100 g de frutillas trituradas. Se realizó un tratamiento térmico de 80 °C durante 15 minutos (Samson, 1992), en un baño maría dejándose alcanzar la temperatura deseada, con agitación permanente de la muestra para asegurar la difusión térmica. Luego se enfriaron rápidamente a 50 °C en baño de agua helada.

Se realizó este tratamiento térmico porque en estudios anteriores se observó que a esta temperatura se consigue muy buena activación de las ascosporas de *Neosartorya fischeri*, principal moho resistente al calor aislado de frutillas frescas, y se consigue eliminar los mohos no termorresistentes. Con este tratamiento se logra una recuperación del 50 % en el medio MEA (Extracto de Malta Agar) y del 25 % en DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol) (Vicenzini, 1999).

II. 2. 1. c) Siembra:

La pulpa se mezcló 1:1 con tres medios de cultivo diferentes, todos ellos doble concentración (Samson, 1992).

Los medios utilizados fueron MEA (Extracto de Malta Agar), PDA (Papa Dextrosa Agar), ambos con agregado de cloranfenicol (100 mg/l) y DRBC (Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol). Los medios MEA y PDA con antibiótico se recomiendan para el aislamiento de hongos resistentes al calor (Pitt, 1997; Hocking, 1992).

El medio DRBC se utilizó ya que este medio con agregado de inhibidor de desarrollo no es un obstáculo para la recuperación de hongos resistentes al calor (Vicenzini, 1999).

II. 2. 1. d) Incubación:

Las cajas de Petri se introdujeron en bolsas de polietileno para prevenir la evaporación y se incubaron durante 30 días a 26 - 28 °C.

Se observaron periódicamente las cajas para detectar el desarrollo de nuevas colonias (Pitt, 1997).

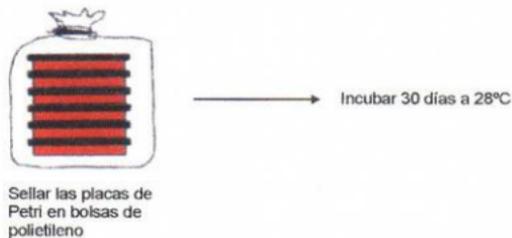
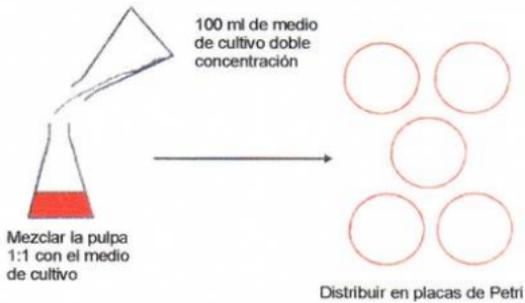
II. 2. 1. e) Aislamiento:

Se realizó con el objeto de obtener cultivos puros, libres de contaminación y listos para la identificación (Pitt, 1997).

Las distintas colonias encontradas con apariencia de *N. fischeri* fueron aisladas por inoculación, con aguja fina a partir de pequeños trozos de hifas o esporas en el centro de tubos estrías conteniendo MEA, PDA ó DRBC. La pureza de las colonias fue constatada por la uniformidad en la apariencia de las mismas luego de la incubación en placas de MEA, PDA y DRBC a 26 - 28 °C.

Las colonias que resultaron estar puras, fueron mantenidas en los tubos estrías a temperatura 5 °C hasta el momento de su identificación.

II. 2. 1. f) **Esquema utilizado:**



Vincenzini, A. 2000

II. 2. 2. Estudio de la presencia de *N. fischeri* en frutillas para agregar al yogur:

Se trabajó con pulpa de frutillas de una marca conocida que se vende en el mercado junto con el yogur y para incorporar al mismo y que contiene los siguientes ingredientes:

- frutilla entera
- jarabe a base de fructosa, dextrosa y maltosa
- sorbato de potasio
- aromatizante artificial de fantasía frutilla
- colorante: amaranto y rojo punzó

Se siguió la misma metodología que para frutillas frescas.

II. 2. 3. Identificación:

La identificación de hongos resistentes al calor, se llevó a cabo según Pitt y Hocking, 1997 y bibliografía accesoria (Klich, 1994 y Pitt, 1991).

Se realizaron:

- a) **Observaciones macroscópicas** de las colonias en MEA, PDA y DRBC.

Las características de las mismas se observaron bajo un estereomicroscopio.

Se tuvo en cuenta:

- color de las conidias
- color del micelio
- exudado
- pigmento soluble
- reverso
- presencia o no de teleomorfo

b) **Observaciones microscópicas:** se llevó a cabo la observación de las estructuras características de los distintos géneros y especies.

Para ello se realizó un montaje húmedo sobre una gota de ácido láctico y en los casos que fue necesario se coloreó con azul de algodón o colorante de güğüen.

Se observó en microscopio óptico Zeiss, utilizándose los objetivos de la siguiente manera:

10 X estructura de fructificación

40 X detalles

100 X textura y ornamentación de esporas

Tabla N° 2

Características microscópicas de géneros teleomorfos correspondiente a *Aspergillus*

Género	Metula	Cleistotecio	Ascosporas	Células de Hülle
<i>Emericella</i>	Presente	Blanco	Púrpura	Presente
<i>Eurotium</i>	Ausente	Amarillo	Amarillas	Ausente
<i>Neosartorya</i>	Ausente	Blanco	Incoloras	Ausente

Tabla N° 3

Características microscópicas de géneros teleomorfos correspondiente a *Penicillium*

Género	Características
<i>Byssocladium</i>	Ascos solitarios o en grupos
<i>Eupenicillium</i>	Ascos dentro de un cleistotecio
<i>Talaromyces</i>	Ascos dentro de un gymnotecio

II. 3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXICOGÉNICA DE *N. fischeri* AISLADOS DE FRUTILLAS Y CULTIVADOS EN ARROZ

Los métodos para estudiar la capacidad de una cepa para producir micotoxinas en general, se basan en la producción de la toxina sobre un sustrato adecuado sólido o líquido, luego se extrae la toxina con un solvente orgánico, en algunos casos seguido de un procedimiento de purificación y finalmente la solución de micotoxinas se concentra y se detecta por Cromatografía en Capa Delgada (TLC) o Cromatografía Líquida (HPLC).

II. 3. 1. Producción y extracción de la toxina:

Se pesaron 100 g de arroz integral con 25 % de agua. Se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml y se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos.

Se sembró luego con un cultivo de *Neosartorya fischeri* desarrollado en caja de petri con los medios MEA, PDA y DRBC (Punto II. 2. 1. e)).

En las fotos que se muestran a continuación, se observan los granos de arroz integral estériles (foto N° 1) y los granos de arroz integral luego de ser inoculados con *N. fischeri* e incubados por 1 mes a 26 - 28 °C (foto N° 2).



Foto N° 1

Foto N° 2

♦ **Producción de la toxina:**

Los aislados de *N. fischeri* se cultivaron en este erlenmeyer durante un mes a 26 - 28 °C (Jiang, 1996).

♦ **Extracción de la toxina:**

La extracción de la toxina se realizó con cloroformo durante una hora en agitador mecánico. Se utilizó un volumen de cloroformo que cubriera todo el cultivo de arroz.

Posteriormente se procedió a la filtración por papel de filtro Wathman N° 1 y concentración hasta el 50 % de su volumen en un rotavapor marca Büchi RE 111 a 70 °C.

Los extractos se colocaron en frascos color caramelo y se conservaron en heladera hasta su estudio posterior.

II. 3. 2. Estandares utilizados:

- **Fumitremorgeno A:** de pureza desconocida.
- **Fumitremorgeno B:** de pureza desconocida.

Los Fumitremorgenos A y B fueron donados gentilmente por el Dr. Haruhiro Fujimoto de Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japon.

- **Verruculogeno:** 95 % de pureza, marca SIGMA.

II. 3. 3. Determinación de las toxinas por Cromatografía en Capa Delgada (TLC):

□ **Desarrollo de las placas:**

Se utilizó el método de desarrollo unidimensional ascendente.

II. 3. 3. a) Detección de Fumitremorgeno A:

Preparación del estandar:

1,5 mg de toxina



Disolución en 2 ml de cloroformo



Distribución

en 10 frascos (0,15 mg/frasco)



Secado con corriente
de nitrógeno

Se conservaron en freezer hasta su uso.

Cada frasco con 0,15 mg de toxina se disolvió en 1 ml de cloroformo y se sembraron por placa: 1,5 µg y 3,0 µg respectivamente.

Se utilizaron dos sistemas de solventes:

Sistema A: Cloroformo - Acetona (93:7 v/v)

Sistema B: Tolueno - Acetato de Etilo - Acido Fórmico (5:4:1 v/v/v)

Adsorbente: Silica Gel 60 (Cromatofolios 25 DC Aulofien 20 x20 cm
Marca Merck).

RfA: 0,30

RfB: 0,65

Detección: mancha azul grisácea a la luz visible o mostaza bajo luz UV (254 nm), desarrollada inmediatamente después de pulverizar con Acido sulfúrico etanólico al 50 % (v/v) (Cole, 1981).

II. 3. 3. b) Detección de Fumitremorgeno B:

Preparación del estándar:

1,5 mg de toxina

⇓

Disolución en 2 ml de metanol

⇓

Distribución

en 10 frascos (0,15 mg/frasco)

⇓

Secado con corriente
de nitrógeno

Se conservaron en freezer hasta su uso.

Cada frasco con 0,15 mg/toxina se disolvió en 1 ml de metanol y se sembraron por placa: 1,5 µg y 3,0 µg respectivamente.

Se utilizaron dos sistemas de solventes:

Sistema A: Dietil Eter

Sistema B: Acetona - Cloruro de metileno (5:95 v/v)

Adsorbente: Silica Gel 60 (Cromatofolios 25 DC Aufolien 20 x20 cm
Marca Merck).

RfA: 0,67

RfB: 0,38

Detección: mancha azul brillante fluorescente bajo luz UV (254 nm),
desarrollada inmediatamente después de rociar con solución

etanólica de AlCl_3 (20 % p/v) y calentar por 10 minutos a 100 °C (Cole, 1981).

II. 3. 3. c) Detección de Verruculogeno:

Preparación del estandar:

1 mg de toxina

⇓

Disolución en 1 ml de cloroformo

⇓

Distribución

en 5 frascos (0,20 mg/frasco)

⇓

Secado con corriente

de nitrógeno

Se conservaron en freezer hasta su uso.

Cada frasco con 0,20 mg de toxina se disolvió en 1 ml de cloroformo y se sembraron por placa: 2 μg y 4 μg .

Se utilizaron dos sistemas de solventes:

Sistema A: Cloroformo - Acetona (93:7 v/v)

Sistema B: Tolueno - Acetato de Etilo - Acido Fórmico (5:4:1 v/v/v)

Adsorbente: Silica Gel 60 (Cromatofolios 25 DC Aufolien 20 x20 cm

Marca Merck).

RfA: 0,30

RfB: 0,65

Detección: mancha azul grisácea a la luz visible o mostaza bajo luz UV (254 nm), desarrollada inmediatamente después de pulverizar con Acido sulfúrico etanólico al 50 % (v/v) (Cole, 1981).

El Rf y el color de Fumitremorgeno A son idénticos al Verruculogeno en las mismas condiciones cromatográficas.

Otros sistemas de solventes:

Sistema A: Dietil eter

Sistema B: Acetona - Cloruro de metileno (5:95 v/v)

Adsorbente: Silica Gel 60 (Cromatofolios 25 DC Aufolien 20 x20 cm
Marca Merck).

RfA: 0,63

RfB: 0,46

Detección: mancha verde azulada fluorescente bajo luz UV (254 nm), desarrollada inmediatamente después de rociar con solución etanólica de $AlCl_3$ (20 % p/v) y calentar por 10 minutos a 100 °C (Schroeder, 1975).

La ventaja de este sistema de solvente es la de diferenciar el Verruculogeno de Fumitremorgeno A, ya que con el sistema de solvente anterior el color de las manchas de ambas toxinas es idéntico.

II. 3. 3. d) Comparación de las propiedades de Fumitremorgeno A (FTA), Fumitremorgeno B (FTB) y Verruculogeno (V):

En la tabla que se detalla a continuación, se observan los valores de Rf de los patrones (FTA, FTB y V) en los distintos sistemas de solvente según los datos de la bibliografía.

Tabla N° 4:

Tipo de comparación y parámetro	FTA	FTB	V
Rf (a)	0,30	-	0,30
Rf (b)	-	0,38	0,46
Rf (c)	-	0,67	0,63
Rf (d)		-	0,65
Fotodescomposición (f)	Si	Si	Si
Mancha azul verdosa (g)	-	Si	-

Referencias:

(a): Silicagel, cloroformo - acetona (93:7 v/v)

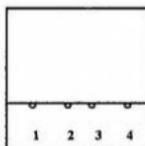
(b): Silicagel, acetona - cloruro de metileno (5:95 v/v)

- (c): Silicagel, eter etílico (100 % v/v)
- (d): Silicagel, tolueno - acetato de etilo - ácido fórmico (5:4:1 v/v/v)
- (e): Con sprayado de solución etanólica de AlCl_3 (20 % p/v) y calentamiento por 10 minutos a 100 °C.
- (f): Ultravioleta, 254 nm
- (g): Con sprayado de solución etanólica de H_2SO_4 (50 % v/v)

II. 3.3. e) Siembra del extracto clorofórmico:

Se sembraron 10 μl y 20 μl del extracto clorofórmico dejando 1 cm de separación entre cada siembra.

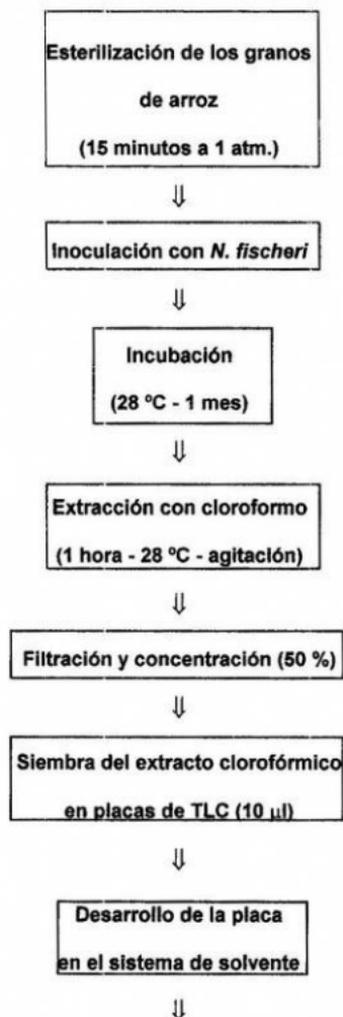
Se sembró según el siguiente esquema:



- 1: Patrón 10 μl
- 2: Muestra 10 μl
- 3: Muestra 20 μl
- 4: Muestra 10 μl + 10 μl de patrón

Las placas se observaron bajo luz UV (254 nm). Se utilizó un gabinete de UV de alta y baja frecuencia marca Chromato - UVE, ultra violeta, Products, Inc.

II. 3. 3. f) Diagrama para estudiar la capacidad toxicogénica de *Neosartorya fischeri* aisladas de frutillas y cultivadas en arroz:



Revelado de la placa



Detección y observación al UV

II. 3. 3. g) Ensayo de recuperación:

Se realizaron ensayos de recuperación para los Fumitremorgenos A y B y Verruculogeno.



100 g arroz con

N. fischeri (1 mes - 26 - 28 °C)

- Sembrar 20 μ l de patrón
- Extracción y concentración (Punto II.3.1.)
- Cromatografía en Capa Delgada (TLC)

Se comprobó que la recuperación era del 90 % por observación visual de la mancha.

II. 3. 4. Determinación de las toxinas por Cromatografía Líquida (HPLC):

- **Puesta a punto de la metodología para estudiar la capacidad toxicogénica en frutillas naturales**

II. 3. 4. a) Equipo:

Cromatógrafo líquido: Konik 500

II. 3. 4. b) Descripción:

- **Reservorio de solventes:** reservorios de vidrio con tapa a rosca de teflón de un litro de capacidad.

- **Sistema de desgasificación:** burbujeo de helio de alta pureza.

II. 3. 4. c) Válvula de mezcla: tipo cuaternaria, rango de trabajo entre 1 - 100 %.

II. 3. 4. d) Bomba: tipo reciprocante de dos pistones alternativos que permite disminuir los pulsos generados en la admisión y expulsión. Sistema automático de purga y autolavado controlado por el microprocesador.

- **Caudal de trabajo:** 10 microlitros/min - 5 ml/min.

- **Presión de trabajo:** 0 - 400 atmósferas.

II. 3. 4. e) Sistema de inyección: válvula de seis vías.

- **Volumen de inyección:** loop de carga de 20 microlitros.

II. 3. 4. f) **Columna:** Phenomenex RP ODS 250 mm x 4,6 mm.

II. 3. 4. g) **Detector:** Konik 200 UV.

- Longitud de onda variable: 190 - 380 nm.

- Lámpara: deuterio

- Ancho de banda: 6 nm.

- Ajuste de cero: auto - cero.

- Rango AUFS: 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05; 0,02; 0,01; 0,005; 0,002; 0,001; 0,0005.

II. 3. 4. h) **Microprocesador:** control de:

Presión

Temperatura

Caudal

Proporción de la mezcla

Corte por presión

Gradiente de solventes

II. 3. 4. i) **Integrador:** Spectra Physics.

Control de:

Atenuación

Velocidad de carta

Integración y altura de áreas

Tiempo de retención

Auto cero.

II. 3. 4. j) Reactivos: calidad HPLC

Metanol

Acetonitrilo

Agua

II. 3. 5. Preparación de las soluciones estandares:

II. 3. 5. a) Preparación de Fumitremorgeno A:

Partiendo del frasco que tenía 0,15 mg (Punto II. 3. 3. a)), se disolvió en 200 µl de dimetilsulfóxido.

Estandar de 5 ppm: tomo 30 µl de la solución madre y la llevo a 1 ml con acetonitrilo.

II. 3. 5. b) Preparación de Fumitremorgeno B:

Partiendo del frasco que tenía 0,15 mg (Punto II. 3. 3. b)), se disolvió en 1 ml de metanol.

Estandar de 5 ppm: tomo 30 µl de la solución madre y la llevo a 1 ml con acetonitrilo.

II. 3. 5. c) Preparación de Verruculogeno:

Partiendo del frasco que tenía 0,20 mg (Punto II. 3. 3. c)), se disolvió en 1 ml de acetona.

Estandar de 10 ppm: tomo 10 μ l de la solución madre y la llevo a 1 ml con acetonitrilo.

Todos los solventes usados, fueron grado HPLC.

Se trabajó sobre los siguientes parámetros para determinar las condiciones óptimas de trabajo:

- *Fase estacionaria*: se trabajó con una columna C18 fase reversa.
- *Fase móvil*
- *Longitud de onda*
- *Temperatura*: este no es un factor determinante en la separación en la cromatografía líquida, por lo que la adopción de la misma sólo obedece a valores que permiten favorecer la vida útil de la columna.
- *Caudal*: este parámetro influye en el tiempo de retención del analito. Para flujos menores a 1 ml/min, el tiempo de retención aumenta considerablemente, permitiendo el ensanchamiento de los picos, disminuyendo la resolución y aumentando el tiempo de análisis innecesariamente.

Para flujos mayores a 1 ml/min, el tiempo de retención es menor pero esto hace que la presión interna de la columna aumente con posibilidades de compactar la fase estacionaria y disminuir la vida útil de la misma.

II. 3. 6. Preparación y purificación de los extractos clorofórmicos:

II. 3. 6. a) Tratamiento previo

El procedimiento de extracción del compuesto a analizar de la matriz que lo contiene suele ser complejo.

Los extractos clorofórmicos (obtenidos como en punto II. 3. 1.) se purificaron para el análisis por HPLC. Para ello, los extractos crudos se pasaron por una columna rellena de silicagel de 7 mm de diámetro y 15 cm de longitud. Luego se diluyó con acetonitrilo. Se filtró por membrana de 0,2 micrones para evitar que las partículas ingresen al equipo y lo dañen y se inyectó en el equipo de HPLC.

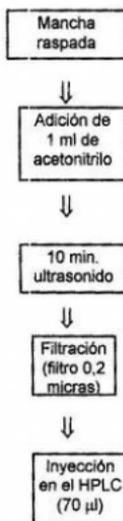
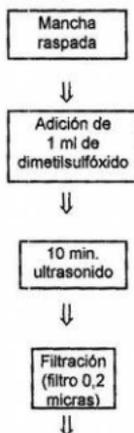
Cromatograma N° 0

Debido a que los extractos así obtenidos se encontraban muy impuros, se debió realizar una purificación mejor.

II. 3. 6. b) Purificación de los extractos:

Para obtener los extractos lo más puros posible, se realizó una cromatografía en placa (TLC), con el sistema de solvente adecuado para cada toxina, sembrando en la placa el patrón de cada toxina y los extractos positivos por triplicado.

Luego de terminada la corrida cromatográfica, se reveló solamente el patrón y se rasparon las manchas cuyo Rf era igual al del patrón. Se colocó en un tubo y luego se disolvió en el solvente adecuado para cada toxina. Se aplicó 10 minutos ultrasonido y se filtró por jeringa con filtro de 0,2 micrones para luego ser inyectada en el equipo de HPLC.

♦ **Fumitremorgeno A:**♦ **Fumitremorgeno B:**

Resuspensión
de
50 μ l en 1 ml
de acetonitrilo



Inyección
en el HPLC
(70 μ l)

♦ **Verruculogeno:**

Mancha
raspada



Adición de
1 ml de
acetona



10 min.
ultrasonido



Filtración
(filtro 0,2
micras)



Resuspensión de
10 μ l en 1 ml de
acetonitrilo)



inyectar en el
HPLC (70 μ L)

II. 4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXICOGENICA DE *N. fischeri* AISLADAS DE FRUTILLAS Y CULTIVADAS EN FRUTILLAS

Para observar lo que ocurría sobre las frutillas naturales, se realizó la siguiente experiencia:

BLANCO



100 g frutillas frescas (esteriliz.: 15 min. - 1 atm.)

MUESTRA INOCULADA
CON CEPA TOXICOGENICA



100 g frutillas frescas
(esteriliz.: 15 min. -1 atm.)

- Enfriado
- Inoculación con ascosporas de *N. fischeri*
- Incubación a 26 - 28 °C - 1 mes
- Extracción y concentración al 50 % (Flujo Punto II. 3. 1.)

➤ Cromatografía Capa Delgada (TLC)

Cada toxina se corrió con su sistema de solvente (Punto II. 3. 3. a), b), y c)).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

III. IDENTIFICACIÓN DE LA FLORA FÚNGICA RESISTENTE AL CALOR

III. 1. Características macroscópicas y microscópicas:

Todos los hongos aislados fueron Ascomycetes, cuyas ascosporas mostraron elevada resistencia al calor a excepción de *Arthrinium phaeospermum*, el cual es un Hiphomycete que posee conidias con propiedades termorresistentes (Anon, 1967).

Las características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados de cada una de las especies encontradas en frutillas frescas fueron las siguientes:

III.1. 1. a) *Byssochlamys nivea*:

Características macroscópicas:

Medio MEA:

Color del micelio: Blanco

Color de las conidias: no se observa

Exudado: transparente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: marrón pálido

Medio PDA:

Color del micelio: Blanco cremoso

Color de las conidias: no se observa

Exudado: transparente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: marrón pálido

Medio DRBC:

Color del micelio: Blanco

Color de las conidias: no se observa

Exudado: transparente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: rosa pálido

Teleomorfo: nidos de hifas

Esclerocio: ausente

Características microscópicas:

Pinceles: esparcido

Teleomorfo: ascas sueltas, adheridas a hifas, sin ascocarpo

Fialide: cilíndrica

Conidias: elipsoidales

Aleuroconidias: periformes

Ascas: subesféricas incoloras

Ascosporas: elipsoidales

III.1.1. b) *Neosartorya fischeri*:

Características macroscópicas:

Medio MEA:

Color del micelio: Blanco

Color de las conidias: gris verdoso

Exudado: transparente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: gris pálido a crema

Medio PDA:

Color del micelio: Blanco

Color de las conidias: no se observa

Exudado: transparente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: crema pálido

Medio DRBC:

Color del micelio: Blanco

Color de las conidias: no se observa

Exudado: transparente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: rosa pálido

Teleomorfo: abundantes cleistotecios blancos en medio MEA

Esclerocio: ausente

Características microscópicas:

Aspergillus: uniseriado, radial a columnar con dos tercios del área fértil

Vesícula: piriforme

Fialide: con cuello, incolora

Conidias: esféricas

Cleistotecios: globosos, blancos

Ascas: subesféricas incoloras

Ascocarpo: lenticular con dos crestas ecuatoriales incoloras,
ligeramente rugosas

III.1.1. c) *Arthrinium phaeospermum*:

Características macroscópicas:

Medio MEA:

Color del micelio: blanco

Color de las conidias: marrón

Exudado: ausente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: marrón oscuro

Medio PDA:

Color del micelio: blanco

Color de las conidias: marrón

Exudado: ausente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: marrón oscuro

Medio DRBC:

Color del micelio: blanco

Color de las conidias: marrón

Exudado: ausente

Pigmento soluble: ausente

Reverso de la colonia: rosa amarronado

Características microscópicas:

Conidióforo: corto, sinuoso

Célula conidiógena: integrada, terminal o intercalar, denticulada

Conidias: circulares a elipsoidales con hendidura longitudinal hialina, color pardo, textura lisa, disposición solitaria

Debido al choque térmico que se realizó a las muestras sólo se aislaron estos 3 géneros.

III. 2. MICROFOTOGRAFÍAS DE GÉNEROS Y ESPECIES DE MOHOS RESISTENTES AL CALOR

Referencias:

Foto N° 1: Conidias de *Arthrinium phaeospermum* (100X)

Foto N° 2: Ascas y ascosporas de *Byssochlamys nivea* (100x)

Foto N° 3: Ascas y ascosporas de *Byssochlamys nivea* (40x)

Foto N° 4: Cleistotecios y ascosporas de *Neosartorya fischeri* (40x)

Foto N° 5: Ascosporas de *Neosartorya fischeri* (100x)

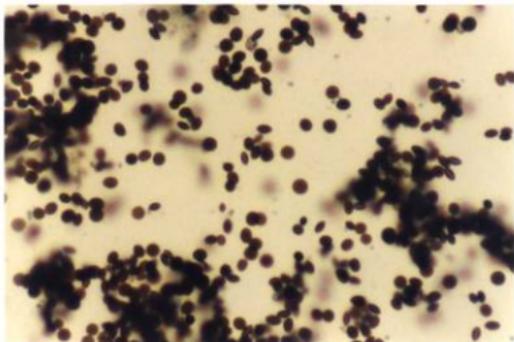


Foto N° 1

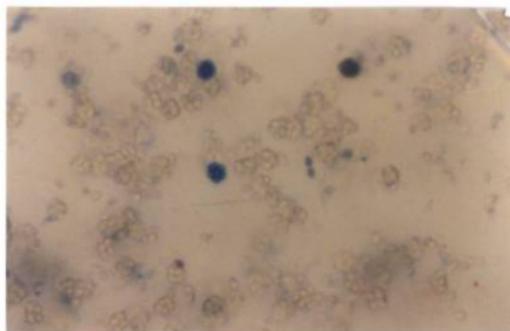


Foto N° 2

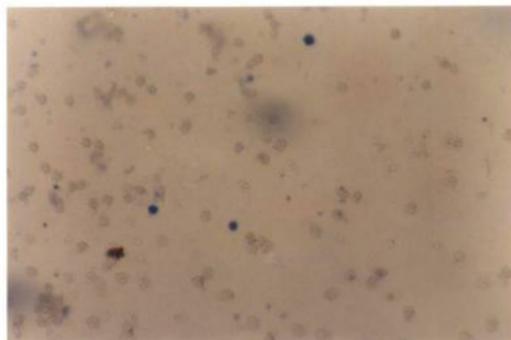


Foto N° 3

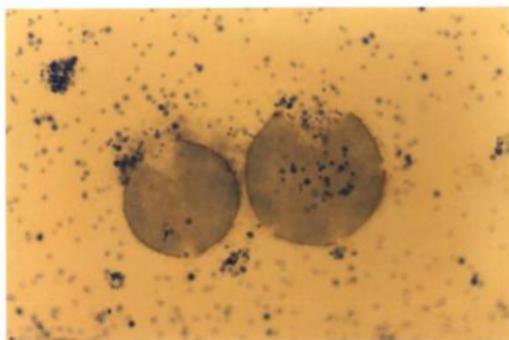


Foto N° 4

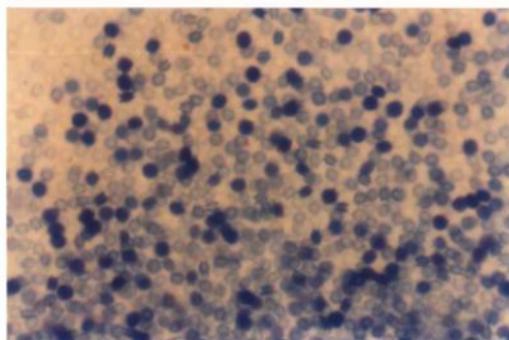


Foto N° 5

Con el tratamiento de 80 °C por 15 minutos, se obtuvieron hongos en forma variable en los distintos medios de cultivo (MEA, PDA, DRBC), pero el medio MEA fue el medio donde se obtuvo mayor porcentaje de cepas de *N. fischeri* (Tabla N° 5).

Algunos autores afirman que *N. Fischeri* ha sido reportada sólo raramente en alimentos que no han sido tratados por calor o procesados (Spotti, 1992).

Tabla N° 5 :

Frecuencia relativa porcentual de especies aisladas de frutillas naturales

(tratamiento 80 °C - 15 minutos)

Especies	Frecuencia relativa porcentual		
	MEA	PDA	DRBC
<i>B. nivea</i>	36,4	20	36,8
<i>N. fischeri</i>	54,5	44	21,1
<i>A. phaeospermum</i>	9,1	36	42,1

Es notable la condición de calentamiento que pueden soportar las conidias del género *A. phaeospermum* presente en las frutillas junto a los demás géneros Ascomycetes (Vicenzini, 1999).

III. 3. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE *N. fischeri* EN FRUTILLAS PARA AGREGAR AL YOGUR

Las muestras analizadas, mostraron ausencia de mohos termorresistentes. Estos hallazgos estarían indicando que el acondicionamiento y tratamiento de las frutillas por parte de las empresas elaboradoras es presuntivamente satisfactorio. Si bien sería conveniente continuar el estudio de las mismas. Así mismo debería encararse el estudio de la presencia de *N. fischeri* en estos productos elaborados.

III. 4. DETERMINACIÓN DE LAS TOXINAS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC)

A los extractos obtenidos anteriormente (punto II. 3. 1.), se les efectuó TLC para evaluar la capacidad toxicogénica.

En este trabajo se utilizó arroz para producir la toxina, mientras que otros autores utilizan trigo molido y extracto de levadura (Cole, 1972), otros desarrollan el hongo productor de la toxina sobre maíz partido (Schroeder, 1975) y otros sobre avena (Gallagher, 1977).

En las Tablas 6, 7, y 8, se detallan los resultados obtenidos para evaluar la producción en arroz de Fumitremorgenos A y B (FTA, FTB) y

Verruculogeno (V) en aislados de *N. fischeri* aisladas a partir de los medios de cultivo MEA (M), PDA (P) y DRBC (D).

Tabla N° 6 :

Presencia de Fumitremorgenos y Verruculogeno en los extractos clorofórmicos

Extractos	FTA	FTB	V
M1	(-)	(-)	(-)
M2	(-)	(-)	(-)
M3	(-)	(-)	(-)
M4	(+)	(+)	(+)
M5	(-)	(+)	(-)
M6	(-)	(-)	(-)
M7	(-)	(-)	(-)
M8	(+)	(+)	(+)
M9	(-)	(-)	(-)
M10	(-)	(-)	(-)
M11	(-)	(-)	(+)
M12	(-)	(+)	(+)
M13	(-)	(-)	(-)
M14	(-)	(-)	(-)
M15	(-)	(-)	(-)

Extractos	FTA	FTB	V
M16	(-)	(-)	(-)
M17	(-)	(+)	(-)
M18	(-)	(-)	(-)
M19	(-)	(-)	(-)
M20	(-)	(-)	(+)
M21	(-)	(+)	(+)
M22	(-)	(-)	(-)
M23	(-)	(-)	(-)
M24	(-)	(-)	(-)

M: Extractos obtenidos a partir de aislados de *N. fischeri* de frutillas naturales en MEA doble concentración y cultivados en arroz integral (1 mes a 28 °C).

En este medio MEA doble concentración, se obtuvo mayor proporción de extractos productores de toxinas. Algunas de estos extractos produjeron las 3 toxinas en forma variable.

Los extractos M4 y M8 fueron los únicos que produjeron FTA, FTB y V; mientras que los extractos M12 y M21 solo produjeron FTB y V.

Los extractos M5 y M17 solo fueron productores de FTB; a diferencia de los extractos M11 y M20 que solo produjeron V.

Tabla N° 7 :

**Presencia de Fumitremorgenos y Verruculogeno en los
extractos clorofórmicos**

Extractos	FTA	FTB	V
P1	(+)	(-)	(-)
P2	(+)	(-)	(-)
P3	(-)	(-)	(-)
P4	(+)	(-)	(-)
P5	(-)	(-)	(-)
P6	(-)	(-)	(-)
P7	(-)	(-)	(-)
P8	(-)	(-)	(-)
P9	(-)	(-)	(-)
P10	(-)	(-)	(-)
P11	(-)	(-)	(-)

P: Extractos obtenidos a partir de aislados de *N. fischeri* de frutillas naturales en PDA doble concentración y cultivados en arroz integral (1 mes a 28 °C).

A pesar de que en este medio se obtuvo un gran número de aislados de *N. fischeri*, los mismos solamente fueron productores de FTA, como lo indica la Tabla N° 7, los extractos P1, P2, y P4.

Tabla N° 8 :

**Presencia de Fumitremorgenos y Verruculogeno en los
extractos clorofórmicos**

Extractos	FTA	FTB	V
D1	(-)	(-)	(-)
D2	(-)	(-)	(-)
D3	(+)	(-)	(-)
D4	(+)	(-)	(-)

D: Extractos obtenidos a partir de aislados de *N. fischeri* de frutillas naturales en DRBC doble concentración y cultivados en arroz integral (1 mes a 28 °C).

En este medio se obtuvieron muy pocos aislados de *N. fischeri*. Los extractos contenían solamente FTA (extractos D3 y D4), y no hubo presencia de FTB ni V.

Mientras que otros autores desarrollan las corridas sobre placas de silicagel conteniendo un aditivo fluorescente (Patterson, 1979), en este trabajo se usaron placas de silicagel que luego se revelaron y observaron al UV.

III. 5. DETERMINACIÓN DE LAS TOXINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC)

En la Tabla N° 9 se pueden observar los distintos parámetros sobre los que se trabajó para obtener las condiciones óptimas para Verruculogeno.

Tabla N° 9:

Optimización de las condiciones de trabajo para la detección de Verruculogeno

Cromatograma N°	λ (nm)	Caudal (ml/mín.)	Atenuación	Sensib.	Vel. de carta	Fase móvil	
						Isocrática	Gradiente
1	230	1	32	0,5	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 20% a 90% en 8 min.
2	230	1	32	0,5	0,5	—	Acetonitrilo-Agua De 40% a 80% en 11 min.
3	230	1	32	0,2	0,5	—	Acetonitrilo-Agua De 40% a 82% en 10 min.
4	254	1	32	0,2	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 30% a 80% en 22 min.
5	254	1	128	0,2	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 10% a 50% en 20 min.
6	254	1	128	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (50%- 50%)	—

7	254	1	64	0,2	0,25	Acetonitrilo-Agua (50%-50%)	-
8	230	1,5	64	0,2	0,25	Acetonitrilo-Agua (25%-75%)	-
9	230	1	32	0,2	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 18 min.
10	230	1	32	0,2	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 24 min.
11	254	1	64	0,2	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 10% a 50% en 20 min.
12	230	1	64	0,1	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 40% a 82% en 10 min.
13	254	2	32	0,5	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 10% a 90% en 40 min.
14	254	1	128	0,2	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 10% a 30% en 16 min.
15	254	1	128	0,2	0,25	Acetonitrilo-Agua (15%-85%)	-
16	254	1	128	0,2	0,25	Acetonitrilo-Agua (10%-90%)	-
17	254	1	128	0,2	0,25	Acetonitrilo-Agua (5%-95%)	-

Continuación Tabla N° 9							
18	254	0,8	128	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (15%- 85%)	-
19	254	0,8	128	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (15%- 85%)	-

Condiciones óptimas:

Fase móvil:

Acetonitrilo / Agua (15:85 %)

Caudal: 0,8 ml/min

Columna: RP C18

Temperatura: 35 °C

Detector UV:

Longitud de onda: 254 nm

Sensibilidad (AUFs): 0,2

Integrador:

Velocidad de carta: 0,25 cm/min

Atenuación: 128

Bajo estas condiciones óptimas, se corrieron luego las muestras.

Se probaron distintas longitudes de onda: 230 nm (cromatogramas N°: 1, 2, 3, 8, 9, 10, 12) y 254 nm (cromatogramas N°: 4, 5, 6, 7, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) (ver los cromatogramas en el Anexo). Se optó por 254 nm ya que a esa longitud de onda se obtuvo mayor sensibilidad

cromatográfica como lo muestra el cromatograma N° 19. Se probaron distintos caudales: 0,8 ml/min. (cromatogramas N°: 18, 19); 1 ml/min (cromatogramas N°:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17); 1,5 ml/min. (cromatograma N°:8) y 2 ml/min. (cromatograma N°:13)(ver cromatogramas en el Anexo), obteniéndose los mejores resultados a 0,8 ml/min. ya que 1,5 y 2 ml/min. fueron caudales muy elevados.

Las corridas isocráticas resolvieron bien los picos (cromatogramas N°: 6, 7, 8, 15, 16, 17, 18,19), no así las corridas cromatográficas con gradiente de fase móvil (cromatogramas N°: 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14)(ver cromatogramas en el Anexo).

La velocidad de la carta, no influye demasiado en el tiempo de retención del compuesto. Se probaron las velocidades de 0,25 cm/min. (cromatogramas N°: 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) y 0,5 cm/min. (cromatogramas N°: 2, 3)(ver cromatogramas en el Anexo), pero se optó por 0,25 cm/min. porque en el conjunto de variables se obtuvo mejor resolución como lo muestra el cromatograma N°: 19.

La atenuación y sensibilidad se fueron modificando hasta obtener una sensibilidad cromatográfica óptima.

Tabla N° 10 :

**Optimización de las condiciones de trabajo para la
detección de Fumitremorgeno A**

Cromatograma N°	λ (nm)	Caudal (ml/min.)	Atenuación	Sensib.	Vel. de carta	Fase móvil	
						Isocrática	Gradiente
1	254	1	8	0,02	0,25	Acetonitrilo- Agua (50%- 50%)	--

Continuación Tabla N° 10							
2	225	1	64	0,5	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 10% a 90% en 20 min.
3	280	1	64	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (90%- 10%)	-
4	254	1	64	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (90%- 10%)	-
5	225	1,5	512	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (70%- 30%)	-
6	225	1,5	1024	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (70%- 30%)	-
7	225	1,5	2048	0,2	0,25	Acetonitrilo- Agua (70%- 30%)	-
8	225	2	4096	0,1	0,25	Acetonitrilo- Agua (70%- 30%)	-
9	225	1	64	1	0,25	Acetonitrilo- Agua (70%- 30%)	-
10	225	1	32	1	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
11	254	1	32	1	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
12	235	1	128	1	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
13	235	1,5	128	1	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.

14	235	1,5	32	1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
15	235	1,5	32	1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
16	230	1	32	1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 20% a 90% en 8 min.
17	230	1	32	1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.
18	230	1	128	0,1	0,25	Acetonitrilo- Agua (50%- 50%)	—
19	230	1	128	0,1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
20	230	1	64	0,1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
21	230	1	64	0,1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
22	230	1	64	0,1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.
23	235	1	128	1	0,25	—	Acetonitrilo-Agua De 15% a 90% en 15 min.

Condiciones óptimas:

Fase móvil:

Acetonitrilo / Agua (de 15 % a 90 % en 15 min.)

Caudal: 1 ml/min

Columna: RP C18

Temperatura: 35 °C

Detector UV:

Longitud de onda: 235 nm

Sensibilidad (AUFS): 1

Integrador:

Velocidad de carta: 0,25 cm/min

Atenuación: 128

Bajo estas condiciones óptimas, se corrieron luego las muestras.

Se probaron distintas longitudes de onda: 225 nm (cromatogramas N°: 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10), 230 nm (cromatogramas N°: 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22), 235 nm (cromatogramas N°: 12, 13, 14, 15, 23), 254 nm (cromatogramas N°: 1, 4, 11) y 280 nm (cromatogramas N° 3). A la longitud de onda de 254 nm tengo varios picos ya que la mayoría de los compuestos absorben a esa longitud de onda. Se decidió a trabajar a 235 nm ya que a esa longitud de onda se obtuvo mayor sensibilidad cromatográfica como lo muestra el cromatograma N° 23 (ver los cromatogramas en el Anexo).

Con respecto al caudal se probaron 1ml/min. (cromatogramas N°: 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23), 1,5 ml/min. (cromatogramas N°: 5, 6, 7, 13, 14, 15) y 2 ml/min. (cromatograma N° 8), pero se optó por 1 ml/min. como el óptimo para esta toxina (ver los cromatogramas en el Anexo).

Las corridas isocráticas no resolvieron bien los picos (cromatogramas N°: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 18) como lo hicieron las corridas con gradiente de fase móvil (cromatogramas N°: 2, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23)(ver los cromatogramas en el Anexo).

La atenuación y sensibilidad se fueron modificando hasta obtener una sensibilidad cromatográfica óptima.

Tabla N° 11:

**Optimización de las condiciones de trabajo para la
detección de Fumitremorgeno B**

Cromatograma N°	λ (nm)	Caudal (ml/min.)	Atenuación	Sensib.	Vel. de carta	Fase móvil	
						Isocrática	Gradiente
1	230	1	32	1	1	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.
2	230	1	32	1	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.
3	230	1	32	1	0,5	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.
4	230	1	128	1	0,25	Acetonitrilo- Agua (50%- 50%)	-
5	230	1	128	1	0,25	Acetonitrilo- Agua (15%- 85%)	-
6	230	1	128	1	0,25	Acetonitrilo- Agua (85%- 15%)	-

7	230	1	32	0,2	0,25	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.
8	230	1,5	32	1	0,5	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.
9	230	1,5	32	1	0,5	-	Acetonitrilo-Agua De 20% a 80% en 15 min.

Condiciones óptimas:**Fase móvil:**

Acetonitrilo / Agua (de 15 % a 90 % en 15 min.)

Caudal: 1 ml/min

Columna: RP C18

Temperatura: 35 °C

Detector UV:

Longitud de onda: 230 nm

Sensibilidad (AUFs): 1

Integrador:

Velocidad de carta: 0,25 cm/min

Atenuación: 128

Bajo estas condiciones óptimas, se corrieron luego las muestras.

La longitud de onda de 230 nm fue la óptima como lo muestra el cromatograma N° 9 (ver cromatogramas en el Anexo).

Se probaron distintos caudales de fase móvil: 1 ml/min. (cromatogramas N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) y 1,5 ml/min. (cromatogramas N°: 8, 9), siendo el de 1,5 ml/min. el mejor para esta toxina.

Las corridas cromatográficas con gradiente resolvieron mejor los picos (cromatogramas N°: 1, 2, 3, 7, 8, 9) que las corridas isocráticas (cromatogramas N°: 4, 5, 6).

La velocidad de la carta, no influye demasiado en el tiempo de retención del compuesto. Se probaron las velocidades de 0,25 cm/min. (cromatogramas N°: 2, 4, 5, 6, 7); 0,5 cm/min. (cromatogramas N°: 3, 8, 9); y 1 cm/min. (cromatograma N° 1), pero se optó por 0,5 cm/min. porque en el conjunto de variables se obtuvo mejor resolución como lo muestra el cromatograma N° 9 (ver cromatogramas en el Anexo).

La atenuación y sensibilidad se fueron modificando hasta obtener una sensibilidad cromatográfica óptima.

Otros autores utilizan un sistema de gradiente para el análisis de Fumitremorgenos y Verruculogeno donde el solvente A es acetonitrilo y el solvente B es agua (Frisvad,1987), pero este gradiente no resultó conveniente en este trabajo.

III. 5. 1. Extractos clorofórmicos:

Algunos de los extractos clorofórmicos que resultaron positivos para las diferentes toxinas en Cromatografía en Capa Delgada (Tabla 6, 7 y 8) se corrieron en HPLC bajo las condiciones óptimas para cada toxina

para confirmar si también eran positivos con esta técnica cromatográfica mucho más sensible.

Se corrió un extracto clorofórmico sin ningún tratamiento de purificación pero debido a que mostró demasiados picos se recurrió a purificarlo (ver en el Anexo: cromatograma muestra sucia).

Los extractos clorofórmicos purificados (Punto II. 3. 5. b) positivos en TLC se inyectaron en el cromatógrafo, corriendo cada toxina en su condición óptima (cromatogramas N° I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X).

También se inyectaron extractos que resultaron negativos en TLC y se comprobó que eran negativos también en HPLC.

En la Tabla N° 12 se muestran los resultados obtenidos para las diferentes toxinas.

Tabla N° 12:

Corridos cromatográficos en HPLC de los extractos positivos en TLC

Extractos clorofórm. (+) en TLC	V	Cromat. N°	FTA	Cromat. N°	FTB	Cromat. N°
M4	(+)	V	(+)	I	(+)	X
M8	(+)	VI	(+)	II	(+)	IX
M12					(+)	VII
M21					(+)	VIII
D3			(+)	III		
D4			(+)	IV		

Referencias:

V: Verruculogeno

FTA: Fumitremorgeno A

FTB: Fumitremorgeno B

Como se puede observar en la Tabla N° 12 los extractos positivos en TLC (Tablas 6, 7 y 8), fueron confirmadas en HPLC. Esto indicaría que la TLC es un buen método de screening para investigar la producción de toxinas por parte de *N. fischeri*.

Los extractos M4 y M8 fueron los únicos que contenían las 3 toxinas.

Resulta importante investigar la presencia de estas toxinas por sus posibles efectos sobre la salud humana.

Estas toxinas han sido reportadas en ensilados y varias clases de forrajes (Gremmels, 1991); encontrándose Verruculogeno y FTB además sobre pasturas verdes (Weiser, 1991). Los mismos se utilizan como alimento de animales destinados a la producción de carne y leche, de ahí la importancia de su investigación por la posible micotoxicosis secundaria a la que el hombre está expuesto. Aunque algunos autores sostienen que estos compuestos altamente tóxicos raramente se han encontrado en alimentos (Pitt, 1997).

III. 6. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXICOGENICA DE *N. fischeri* AISLADAS DE FRUTILLAS Y CULTIVADAS EN FRUTILLAS

Se comprobó que el hongo crece muy bien sobre el sustrato: frutillas frescas, pero al realizar las cromatografías en placa delgada (TLC), se observó que no producían ni Fumitremorgenos A y B ni Verruculogeno.

Cada toxina se corrió con su sistema de solvente (Punto II. 3. 3. a), b), y c).

Frutillas con tratamiento térmico conservan ascosporas viables de *N. Fischeri* . Se han obtenido aislados con capacidad de producir FTA, FTB y V en condiciones de laboratorio.

No se ha podido comprobar la producción de estas toxinas cuando los aislados toxicogénicos son cultivados en frutilla. Sin embargo la incorporación de frutillas contaminadas a productos lácteos y de pastelería podría dar lugar en estas nuevas condiciones de sustrato, pH, aw, posibilidad de producción de las toxinas antes mencionadas con el riesgo toxicológico que ello implica.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- ◆ Se logró desarrollar una metodología analítica rápida y sencilla por Cromatografía líquida que permite estudiar la capacidad de producción de Fumitremorgenos A, B y Verruculogeno en cepas de *Neosartorya fischeri*.
- ◆ Se constató en frutillas frescas de la zona de Coronda la presencia de las especies fúngicas: *Bysochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri* y *Arthrinium phaeospermum* que resisten tratamientos térmicos de 80 °C durante 15 minutos.
- ◆ Los aislados pertenecientes a la especie *Neosartorya fischeri* poseen capacidad para producir Fumitremorgenos A y B y Verruculogeno en condiciones de laboratorio, algunos de ellos con capacidad para sintetizar las 3 toxinas simultáneamente.
- ◆ Dicha capacidad toxicogénica no se manifiesta cuando los aislados son cultivados en frutillas, sin embargo la incorporación de frutillas contaminadas con dichos mohos a productos lácteos o de panadería podría dar lugar a síntesis de las toxinas con el riesgo toxicológico que ello implica.
- ◆ En pulpas de frutillas que se comercializan en el mercado argentino listas para adicionar a yogur no se observó presencia de mohos

viales. Si bien el número de muestras analizadas al presente no tiene significación estadística.

ANEXO

Medios de cultivo**▪ Extracto de Malta Agar (MEA)**

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Cloranfenicol	100 mg
Agua destilada	1 lt

Disolver los componentes en el agua destilada. Calentar en baño de agua a ebullición hasta disolución completa. Incorporar finalmente el cloranfenicol. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

▪ Diclorán- Rosa de Bengala - Clorangenicol Agar (DRBC)

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
Agar	15 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Cloranfenicol	100 mg
Rosa de Bengala	25 mg
Diclorán	2 mg
Agua destilada	1 lt

Disolver los componentes en el agua destilada. Calentar en baño de agua a ebullición hasta disolución completa. Incorporar finalmente el cloranfenicol, rosa de bengala y diclorán. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

▪ Papa - Dextrosa Agar (PDA)

Infusión de papas (preparada a partir de 200 g de patata)	4 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	100 mg
Agua destilada	1 lt

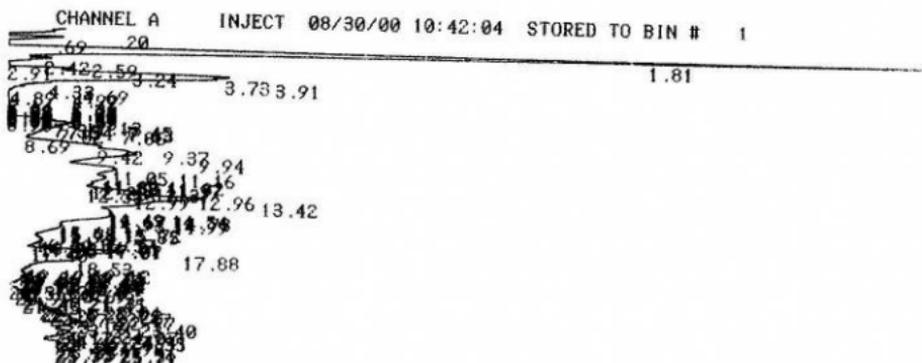
Disolver los componentes en el agua destilada. Calentar en baño de agua a ebullición hasta disolución completa. Incorporar finalmente el cloranfenicol. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

▪ **Medio de arroz para la producción de toxina**

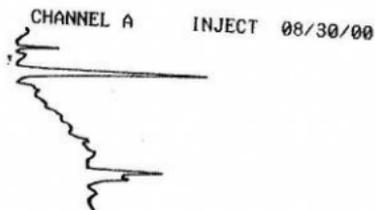
Arroz integral	100 g
Agua	25 ml

Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

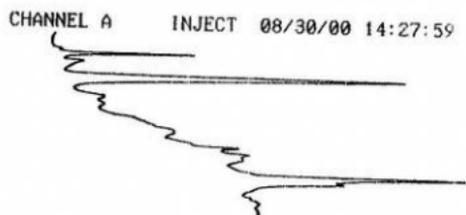
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 1



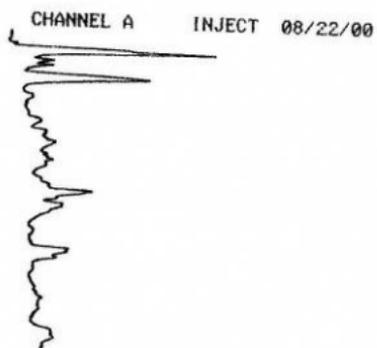
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 2



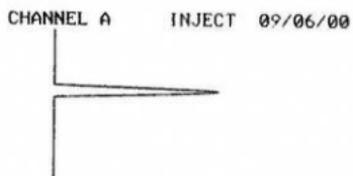
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 3



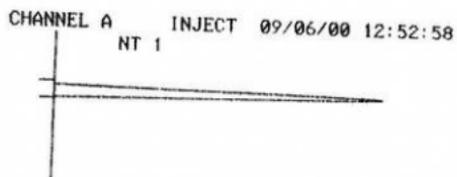
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 4



VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 5

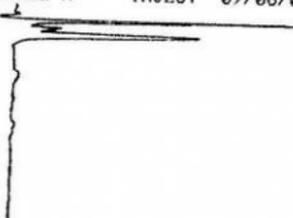


VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 6



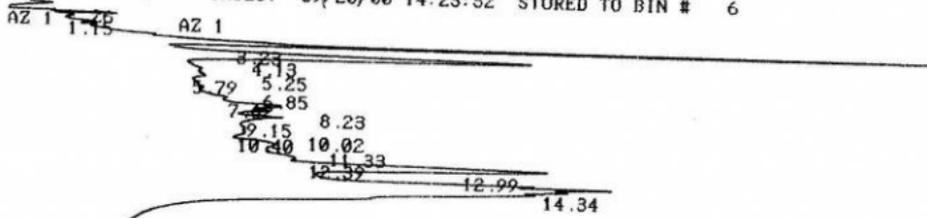
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 7

CHANNEL A INJECT 09/06/00

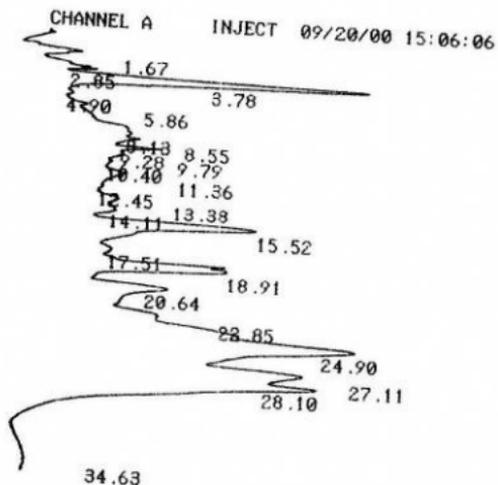


VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 8

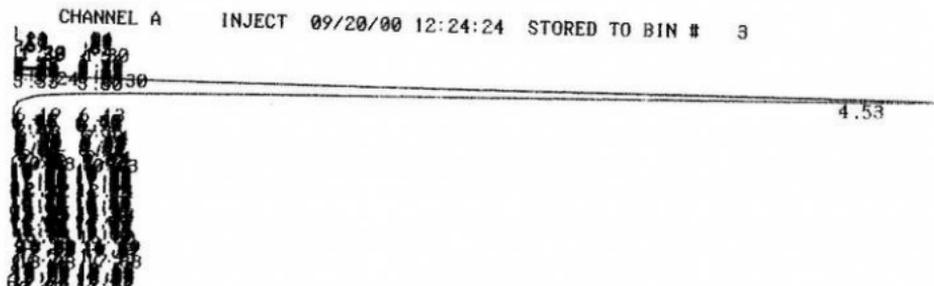
CHANNEL A INJECT 09/20/00 14:23:32 STORED TO BIN # 6



VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 9

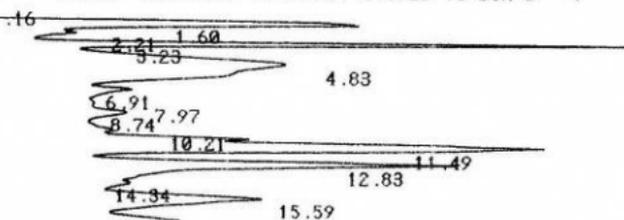


VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 10



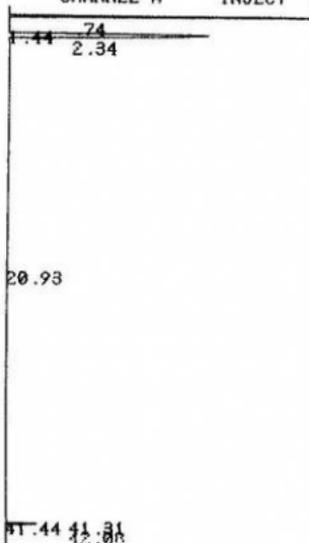
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 11

CHANNEL A INJECT 09/20/00 13:06:30 STORED TO BIN # 4

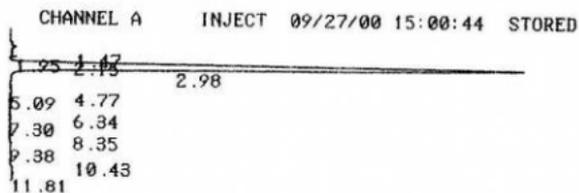


VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 12

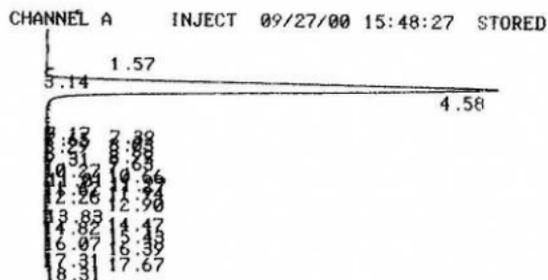
CHANNEL A INJECT 09/27/00 11:46:33



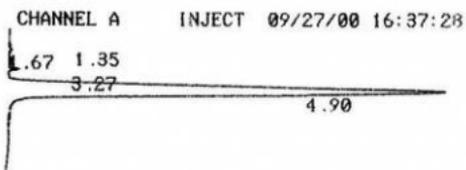
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 13



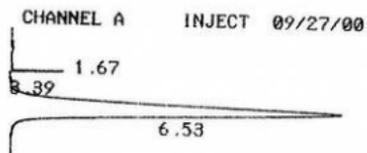
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 14



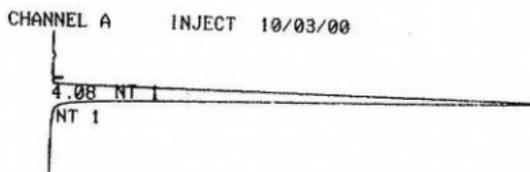
VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 15



VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 16



VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 17



VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 18

CHANNEL A INJECT 10/10/00 14:00:11 STORED TO BIN # 3

3.78 NT 1

NT 1 5.06

VERRUCULOGENO
Cromatograma N° 19

CHANNEL A INJECT 10/10/00 15:13:37 STORED TO BIN # 6

3.07 HT 1

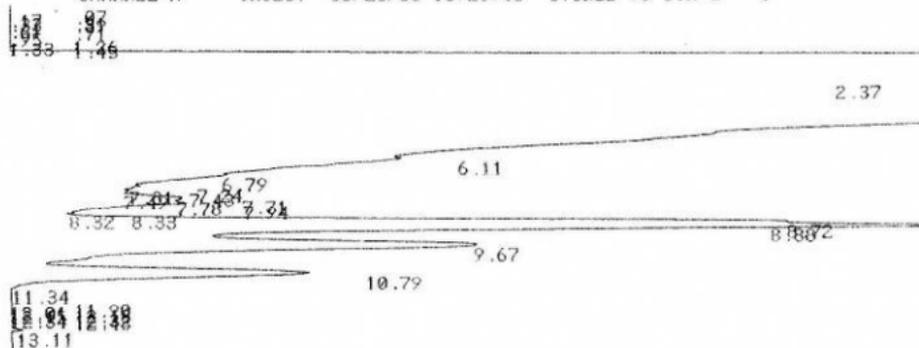
HT 1

5.06

FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 1

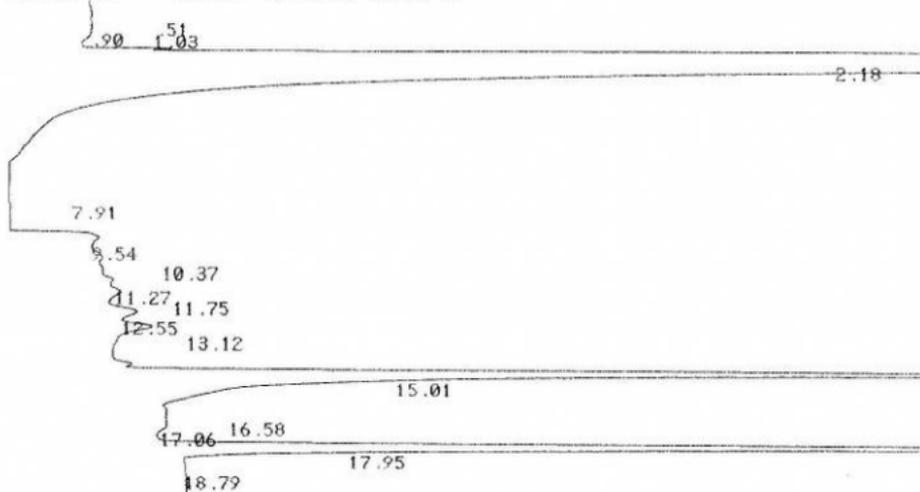
CHANNEL A INJECT 03/23/00 15:28:46 STORED TO BIN # 4



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 2

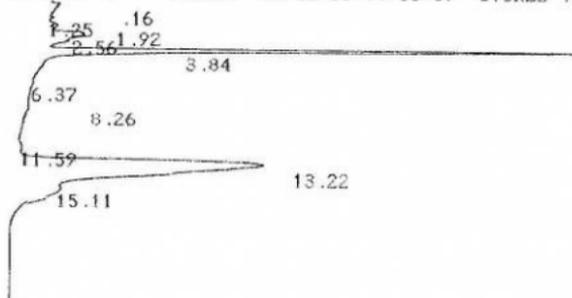
CHANNEL A INJECT 03/24/00 15:33:44



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 3

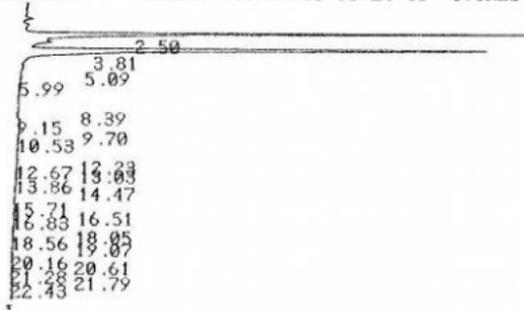
CHANNEL A INJECT 03/30/00 14:56:37 STORED TO BIN



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 4

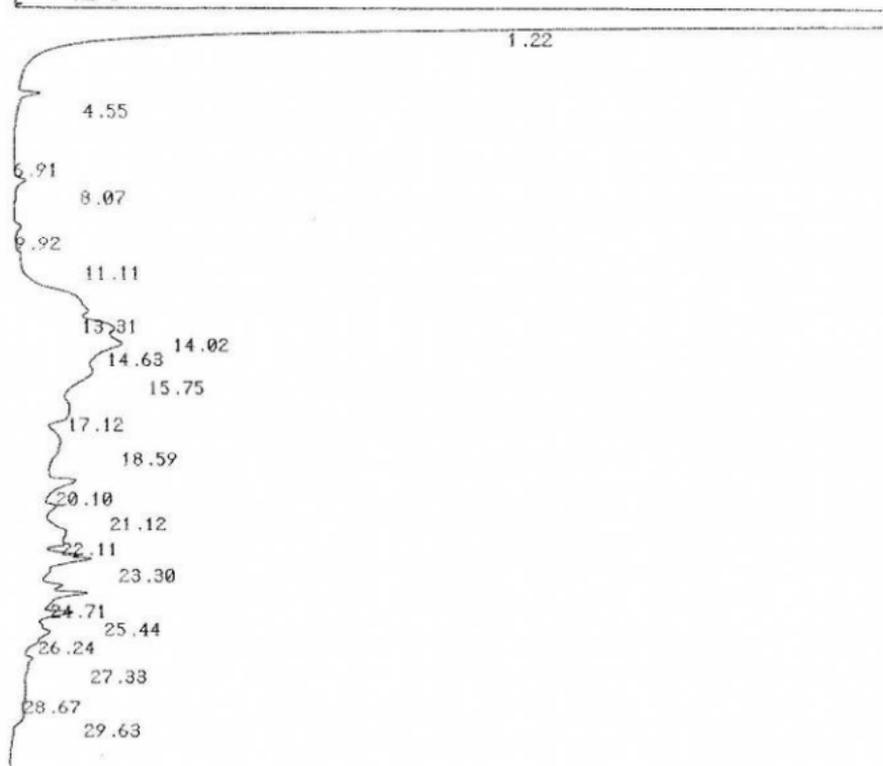
CHANNEL A INJECT 03/30/00 15:24:40 STORED



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 5

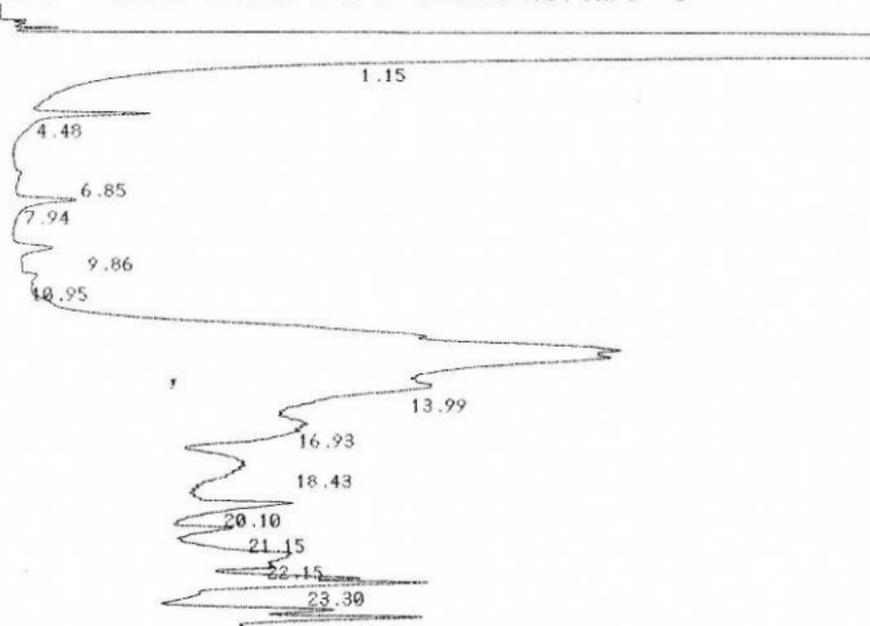
CHANNEL A INJECT 05/26/00 12:19:26 STORED TO BIN # 4
AZ 1



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 6

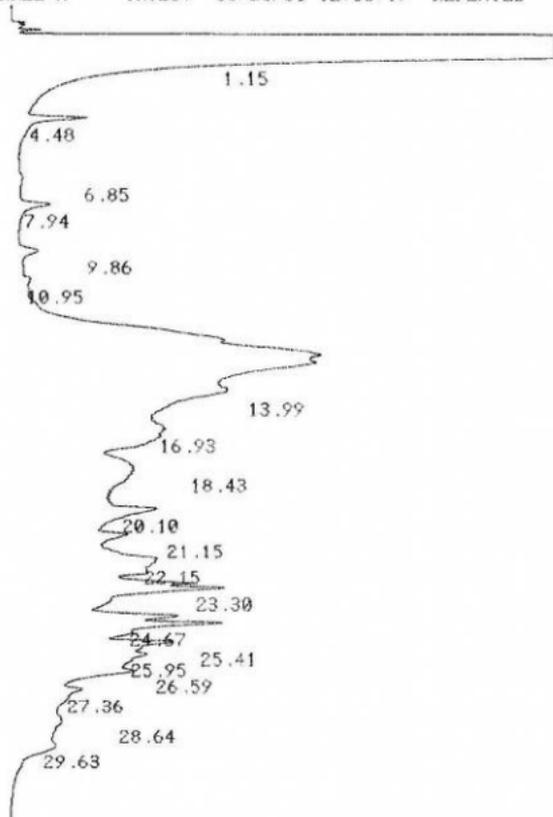
CHANNEL A INJECT 05/26/00 12:56:19 REPLAYED FROM BIN # 5



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 7

CHANNEL A INJECT 05/26/00 12:56:19 REPLAYED



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 8

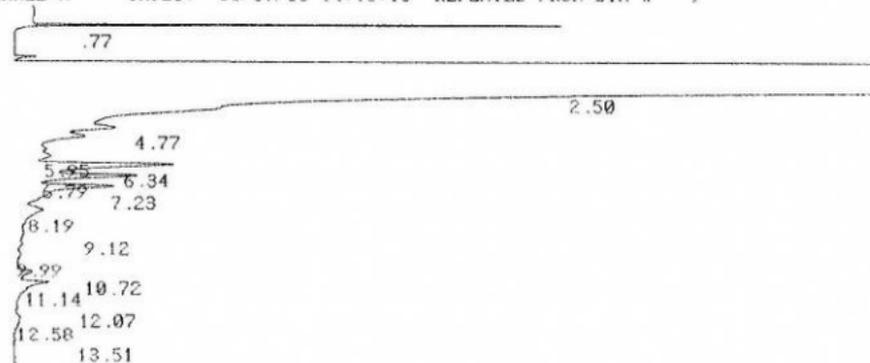
CHANNEL A INJECT 05/26/00 12:56:19



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 9

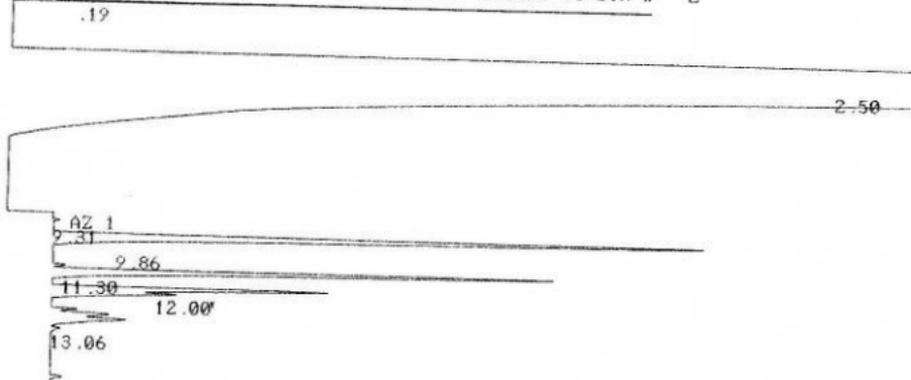
CHANNEL A INJECT 06/07/00 14:15:10 REPLAYED FROM BIN # 1



FUMITREMORGENO A

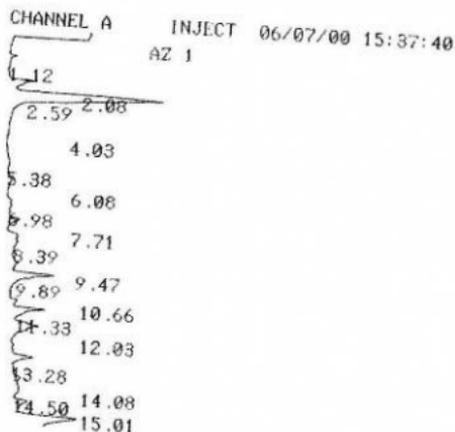
Cromatograma N° 10

CHANNEL A INJECT 06/07/00 15:07:12 STORED TO BIN # 2



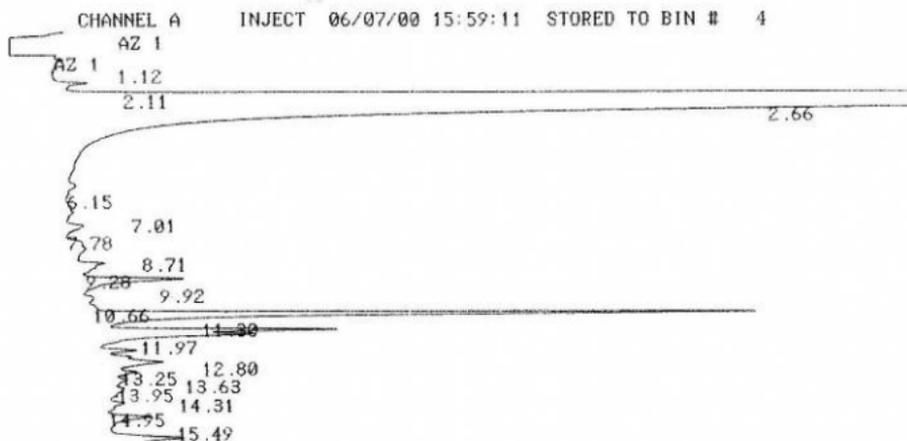
FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 11



FUMITREMORGENO A

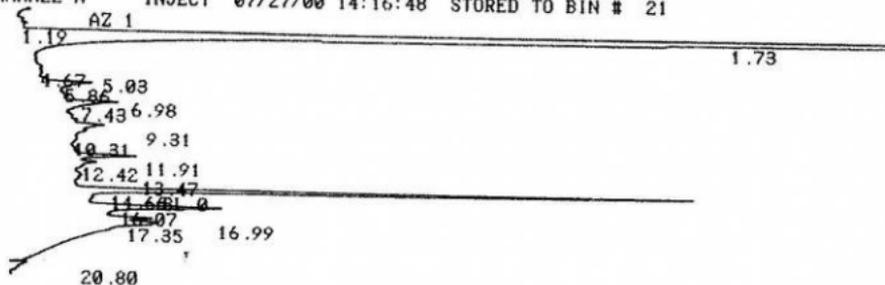
Cromatograma N° 12



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 15

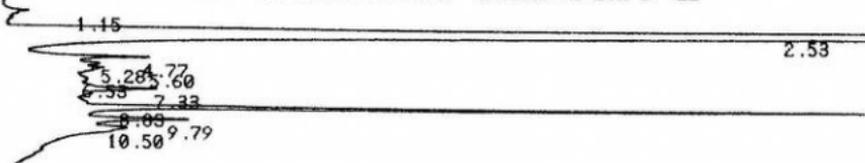
CHANNEL A INJECT 07/27/00 14:16:48 STORED TO BIN # 21



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 16

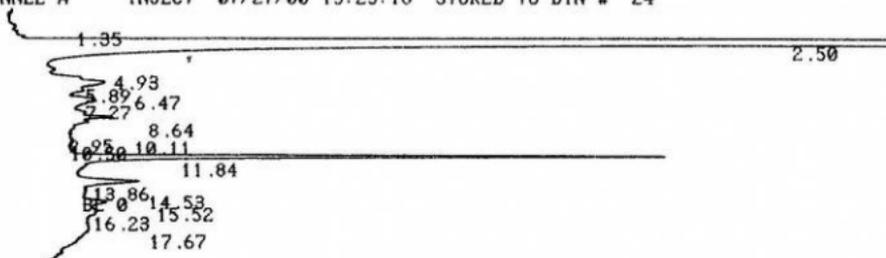
CHANNEL A INJECT 07/27/00 14:57:47 STORED TO BIN # 22



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 17

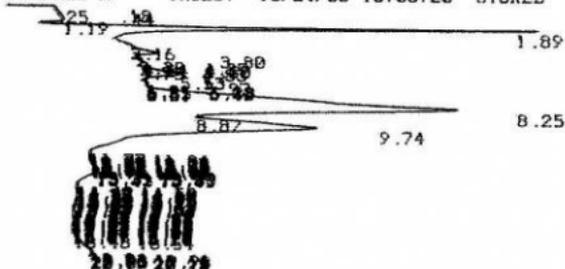
CHANNEL A INJECT 07/27/00 15:25:18 STORED TO BIN # 24



FUMITREMORGENO A

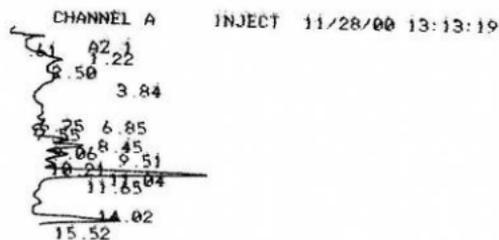
Cromatograma N° 18

CHANNEL A INJECT 10/24/00 13:03:20 STORED



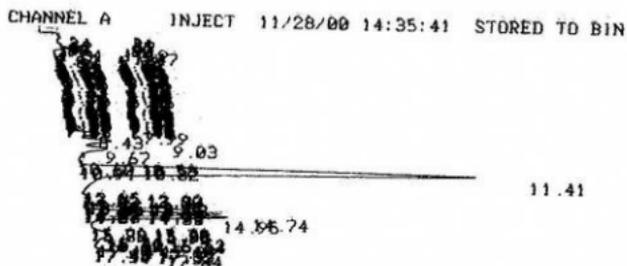
FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 19



FUMITREMORGENO A

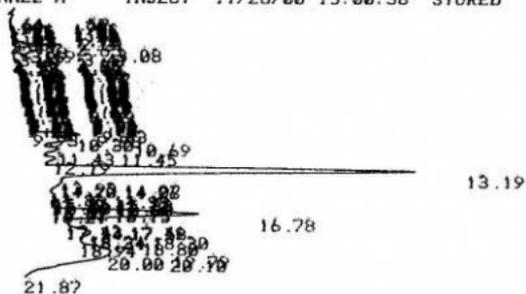
Cromatograma N° 20



FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 21

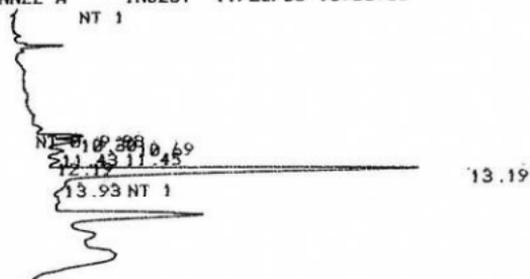
CHANNEL A INJECT 11/28/00 15:00:38 STORED



FUMITREMORGENO A

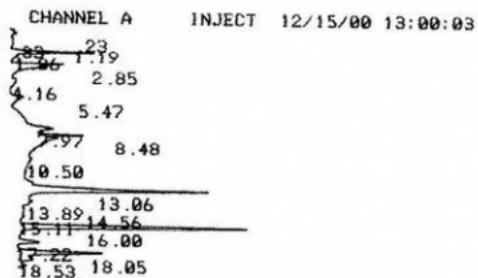
Cromatograma N° 22

CHANNEL A INJECT 11/28/00 15:00:38

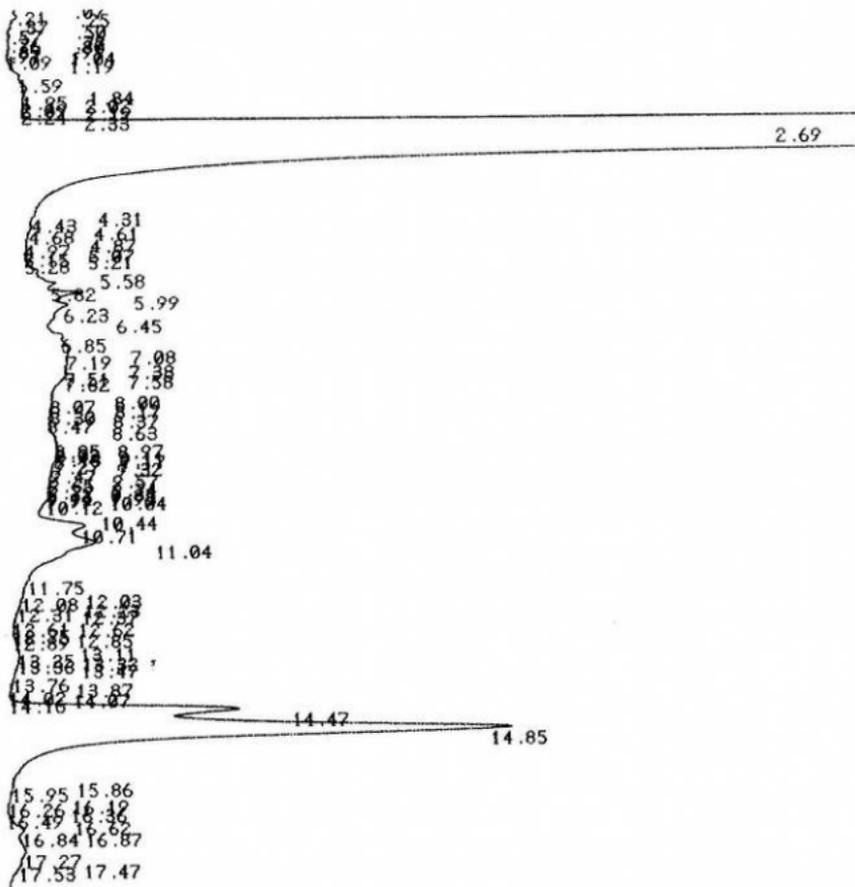


FUMITREMORGENO A

Cromatograma N° 23

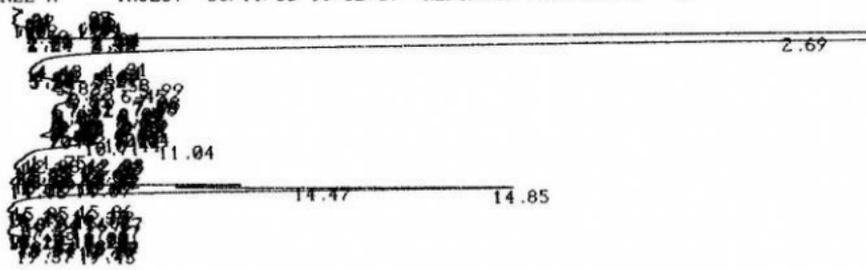


FUMITREMORGENO B
Cromatograma N° 1



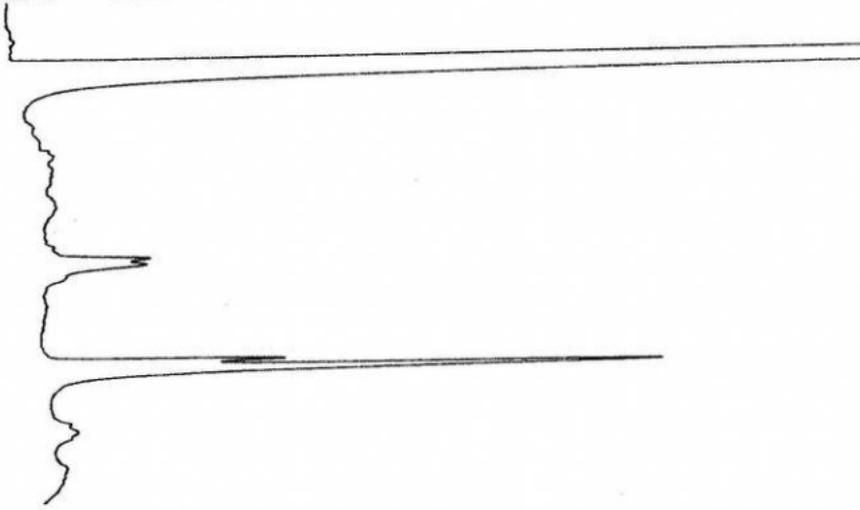
FUMITREMORGENO B
Cromatograma N° 2

CHANNEL A INJECT 08/11/00 11:52:07 REPLAYED FROM BIN # 1



FUMITREMORGENO B
Cromatograma N° 3

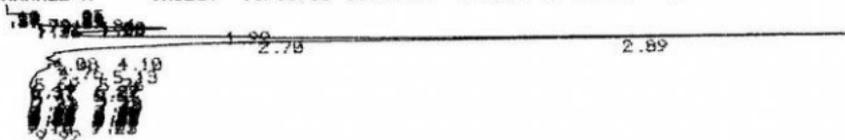
CHANNEL A INJECT 08/11/00 13:05:45 STORED TO BIN # 2



FUMITREMORGENO B

Cromatograma N° 4

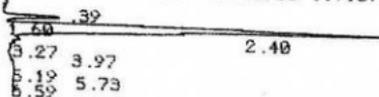
CHANNEL A INJECT 10/18/00 11:00:49 STORED TO BIN # 2



FUMITREMORGENO B

Cromatograma N° 5

CHANNEL A INJECT 10/18/00 11:18:14



FUMITREMORGENO B

Cromatograma N° 6

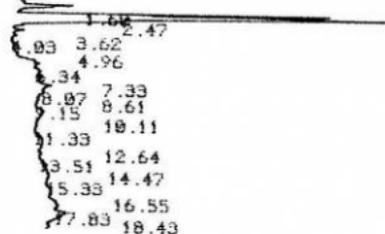
CHANNEL A INJECT 10/18/00 12:23:23 STORED TO BIN # 5



FUMITREMORGENO B

Cromatograma N° 7

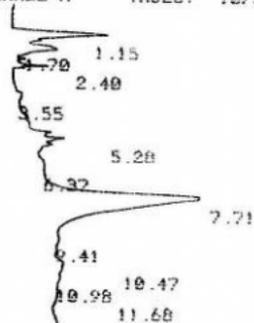
CHANNEL A INJECT 10/18/00 12:58:00



FUMITREMORGENO B

Cromatograma N° 8

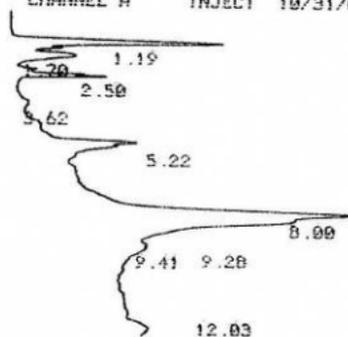
CHANNEL A INJECT 10/31/00 11:29:42



FUMITREMORGENO B

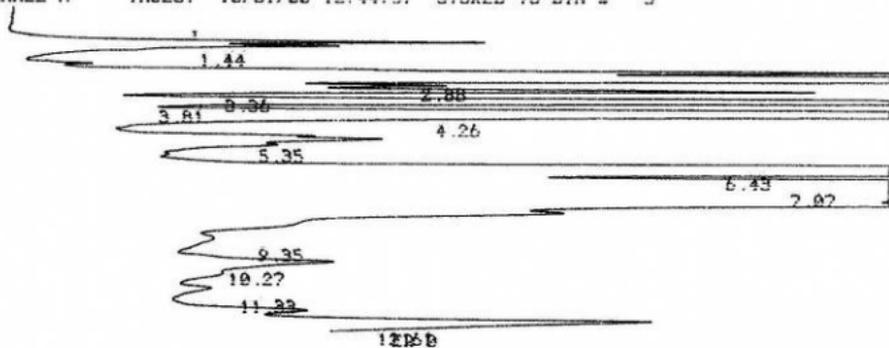
Cromatograma N° 9

CHANNEL A INJECT 10/31/00 12:17:27



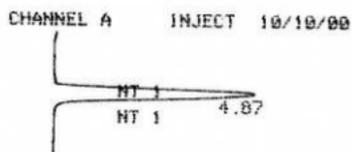
Cromatograma muestra sucia

CHANNEL A INJECT 10/31/00 12:44:57 STORED TO BIN # 5

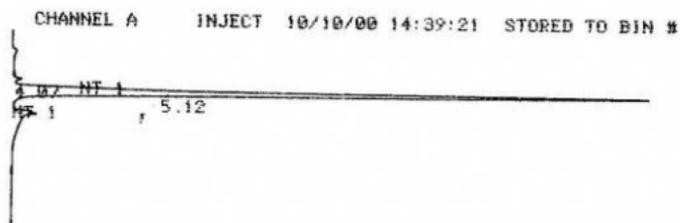


Extractos Clorofórmicos
VERRUCULOGENO (+)

M 4 - Cromatograma V



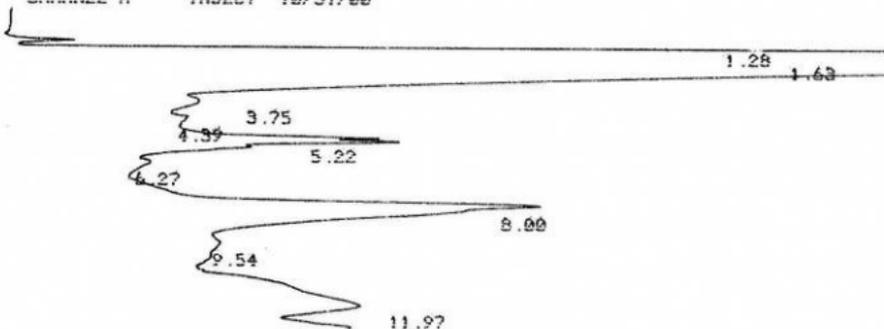
M 8 - Cromatograma VI



Extractos Clorofórmicos
FUMITREMORGENO B (+)

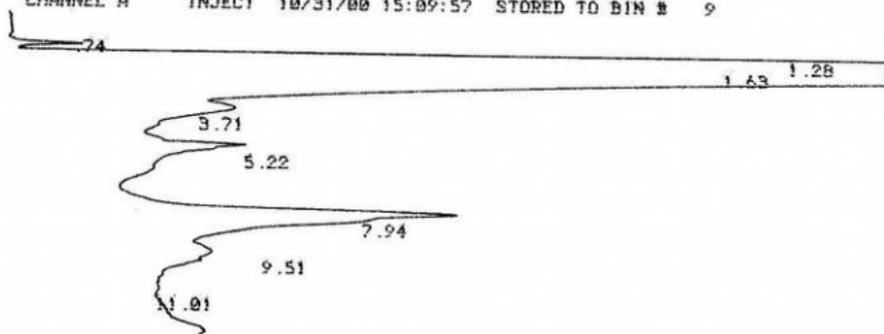
M 4 - Cromatograma X

CHANNEL A INJECT 10/31/00



M 8 - Cromatograma IX

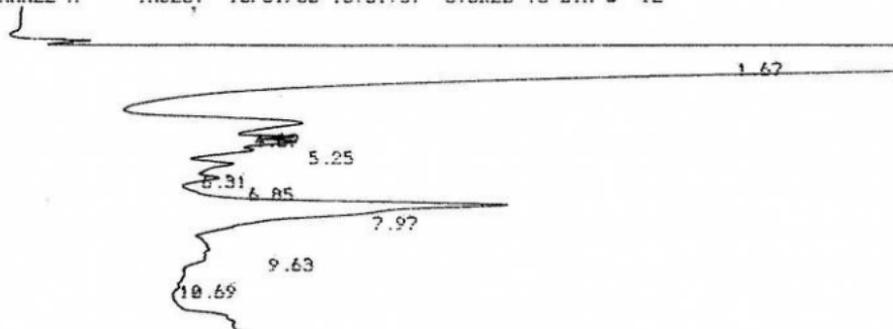
CHANNEL A INJECT 10/31/00 15:09:57 STORED TO BIN # 9



Extractos Clorofórmicos
FUMITREMORGENO B (+)

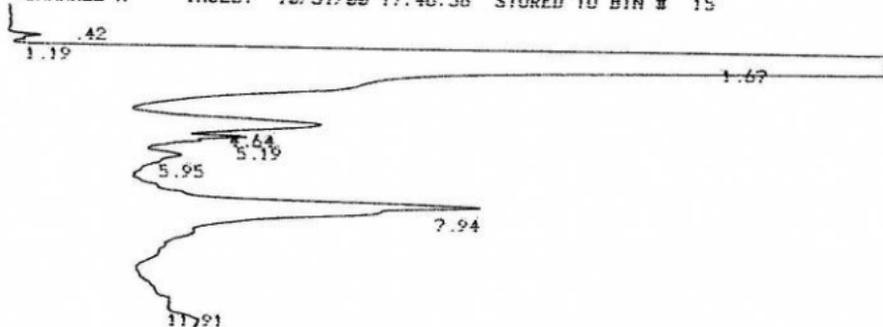
M 12 - Cromatograma VII

CHANNEL A INJECT 10/31/00 16:31:57 STORED TO BIN # 12



M 21 - Cromatograma VIII

CHANNEL A INJECT 10/31/00 17:46:38 STORED TO BIN # 15



Extractos Clorofórmicos
FUMITREMORGENO A (+)

M 4 - Cromatograma I

CHANNEL A INJECT 12/15/00 14:10:37 STORED TO BIN #

2.63 1.73
8.41 5.35
9.01 6.75
8.45 7.91
9.15
10.71 10.85
11.33 12.13
13.09 13.09
14.55 15.20
ER 0

M 8 - Cromatograma II

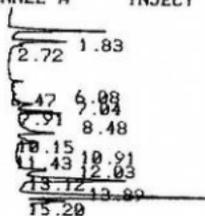
CHANNEL A INJECT 12/15/00 14:31:58 STORED TO BIN # 14

2.69 1.76
6.11
8.07 8.48
8.24 8.28
10.24 10.95
11.43 13.09
14.02 15.20
ER 0

Extractos Clorofórmicos
FUMITREMORGENO A (+)

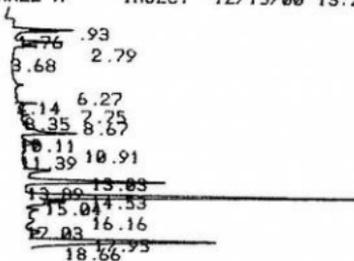
D 3 - Cromatograma III

CHANNEL A INJECT 12/15/00 14:53:48



D 4 - Cromatograma IV

CHANNEL A INJECT 12/15/00 13:26:47



BIBLIOGRAFÍA

Abarca, M. L.; Bragulat, M. R.; Castella, G.; Accensi, F.; Cabanes, J. "Hongos productores de micotoxinas emergentes". Rev. Iberoam. Micol. Nro. 17. pp.63 – 68. **2000**.

Alimentos de Santa Fe. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Industria y Comercio. Gobierno de Santa Fe. **1999**.

Barnett, H. L.; Hunter, B. B. "Illustrated genera of imperfect fungi". Burgess Publishing Co. USA. **1972**.

Bayne, H. G.; Michener, H. D. "Heat Resistance of *Byssoschlamys* Ascospores". Applied and Environmental Microbiology. 37, (3): 449 - 453. **1979**.

Beuchat, L. R. "Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores en fruit products". J. Food Sci. 51, (6): 1506-1510. **1986**.

Carmichel, J. W.; Kendrick, W. B.; Conners, I. L.; Sigler, L. "Genera of hyphomycetes". The University of Alberta Press, Canada. **1980**.

Cole, R. J.; Cox, R. H. Hadbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press. New York. **1981**.

Cole, R. J.; Kirksey, J. W.; Moore, J. H.; Blankenship, B. R.; Diener, U. L.; Davis, N. D. "Tremorgenic Toxin from *Penicillium verruculosum*". Applied Microbiology. 24, (2): 248 – 256. **1972**.

Conner, D. E. "Factors contributing to variations in D values obtained for ascospores of *Neosartorya fischeri*". In Moderns methods in food mycology. Elsevier. pp 189-193. **1992**.

Consejo de Denominación de Origen. MAGIC. "Frutillas de Coronda".
Santa Fe. **1999.**

Consejo de Denominación de Origen. MAGIC. "Frutillas de Coronda".
Santa Fe. **1997.**

Dirheimer, G. "Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins".
Revue med. Vet. 149, (6): 605 - 616. **1998.**

Doores, S. "The Microbiology of Apples and Products". CRC Critical
Reviews in Food Science and Nutrition. 19, (2): 133 – 147. **1984.**

Environmental Health Criteria. "Selected Mycotoxins: ochratoxins,
trichothecenes, ergot". International Programme on Chemical Safety. W.
H. O. Geneva. **1990.**

Fernandez Pinto, V.; Vaamonde, G. "Hongos Productores de
Micotoxinas en Alimentos". Revista Argentina de Microbiología. Nro. 664.
1996.

Filtenborg, O.; Frisvad, J. C.; Svendsen, J. A. "Simple Screening
Method for Producing Intracellular Mycotoxins in Pure Cultures". Applied
and Environmental Microbiology. 45, (2): 581 - 585. **1983.**

Fink-Gremmels, J.; Weiser, M. "Effects of Verruculogen , a Tremorgenic
Mycotoxin, on Neurotransmitter Release Mechanisms in Isolated
Neuroblastoma Cells". 5th. Congress European Assoc. Veterinary
Pharmacology and Toxicology. Copenhagen, D K. pp.191 – 193. **1991.**

Frisvad, J. C. " High-Performance Liquid Chromatographic Determination
of Profiles of Mycotoxins and Other Secondary Metabolites". Journal of
Chromatography. Vol. 392. pp.333 - 347. **1987.**

Frisvad, J. C.; Thrane, U. "Standardized High Performance Liquid Chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and uv-vis spectra (Diode array detection)". Elsevier Science Publishers B. V. **1987**.

Gallagher, R. T.; Latch, G. C. M. "Production of the Tremorgenic Mycotoxins Verruculogen and Fumitremorgin B by *Penicillium piscarium* Westling". Applied and Environmental Microbiology. 33, (3): 730 -731. **1977**.

Girardin H.; Latgé, J.P. "Comparison of *Neosartorya fischeri* varieties based on protein profiles and immunoactivities". In Modern methods in food mycology. Elsevier. pp 177-186. **1992**.

Girardin, H.; Mond, M.; Latge, J. P. "Molecular Characterization of the Food Borne Fungus *Neosartorya fischeri* (Mailloch and Cain)". Applied and Environmental Microbiology. 61, (4): 1378-1383. **1995**.

Gremmels, J. K. "Mycotoxins: Their Implications for Human and Animal Health". The Veterinary Quarterly. 21, (4): 115 - 120. **1999**.

Guarro, J.; Gene, J.; Stchigel, A. M. "Developments in Fungal Taxonomy". Clinical Microbiology Reviews. 12, (3): 454 - 500. **1999**.

Hatcher, W. S.; Weine, J. L.; Murdock, D. I.; Folinazo, J. F.; Hill, E. C.; Albrigo, L. G. "Growth Requirements and Thermal Resistance of Fungi Belonging To The Genus *Byssoschlamys*". Journal of Food Science. 44, (1): 118 - 122. **1979**.

Herrera, T.; Ulloa, M. "El Reino de los Hongos". Micología Básica Aplicada. 1ra. Edición. Mexico. **1990**.

Hocking, A. D.; Pitt, J. I. "Food spoilage fungi II. Heat-resistant fungi". CSIRO Food Res. Q. 44:73-82. **1984**.

Hou, C. T.; Ciegler, A.; Hesseltine, C. W. "Tremorgenic Toxins from *Penicillia*". Applied Microbiology. 21, (6): 1101 - 103. **1971**.

ICMSF. El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos". Acribia. Espana. **1991**.

INTA Ministerio de la Producción. Corredor Frutihortícola Santefesino. Gobierno de Santa Fe. **1999**.

Jiang L.; Zhenjun Y.; Zhaohe M. "The isolation, purification and identification of Fumitremogin B produced by *Aspergillus fumigatus*". Biomedical and Environmental Sciences 9 (1): 1-11. **1996**.

Jiang, L.; Yu S.; Wang, Y.; Meng, Z. "One – step HPLC method for the determination of fumitremogin B in corn". Weisheng Yanjiu 25 (6): 368-370. **1996**.

Jiang, L.; Zhenjun Y.; Zhaohe M. "The preparation and identification of Fumitremogin B-hemisuccinate-carrier proteins". Biomedical and Environmental Sciences 9 (1): 12-16. **1996**.

Jiang, L.; Zhenjun, Y.; Zhaohe, M. "Preparation of Fumitremogin B". Zhonghua Yufang Yixue Zazhi. 30 (5): 282-285. **1996**.

Kavanagh, J.; Larchet, N.; Stuart, M. "Occurrence of a Heat-resistant species of *Aspergillus* in canned strawberries". Nature. Vol. 198. pp1322. **1963**.

Klich, M. A.; Pitt, J. I. "A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs". CSIRO Division of Food Science. Australia. **1994**.

- Koul, P. D.** "Fungal Tremorgens". Prikl Biokhim Mikrobiol. 29 (1): 44-50. 1993.
- Kozakiewicz, Z.** "Aspergillus species on stored Products". Mycological Papers Nro. 161.C. A. B. International Mycological Institute. 1989.
- Logrieco, A.** "Bioactive microorganisms used as BCAs". Proyecto FOMEC 995: "Agriculturally Important toxicogenic Fungi (AITF). 2000.
- Moreau, C.** "Tremorgenic mycotoxins. Cryptogam Mycol. 11 (2): 89-110. 1990.
- Nielsen, P. V.** "Preservative and temperature effect on growth of tree varieties of the heat-resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by impedimetric method". Journal of Food Science 56 (6):1735-1740. 1991.
- Nielsen, P. V.; Beuchat, L. R.; Frisvad, J. C.** "Influence of atmospheric oxygen content on growth and Fumitremogin production by a heat-resistant mold, *Neosartorya fischeri*". J. Food Sci. 54: 679-682. 1989.
- Nielsen, P. V.; Samson, R. A.** "Differentiation of Food-borne taxa of *Neosartorya*". In Moderns Methods in food mycology. Elsevier. pp 159-168. 1992.
- Nishiyama M.; Kuga T.** "Central effects of the neurotrophic mycotoxin fumitremogin A in the rabbit: II. Effects on the brain stem". JPN. J. Pharmacol. 52 (2): 201-208. 1990.
- Olias, J. M.; Sanz, C.; Perez, A. G.** "Acondicionamiento Post-Recolección del Freson de Huelva para consumo en fresco". Colección Huelva Verde. Instituto de la Grasa, C. S. I. C. 1995.
- Patterson, D. S. P.; Roberts, B. A. ; Shreeve, B. J.; Mac Donald, S. M.; Hayes, A. W.** "Tremorgenic Toxins produced by Soil Fungi". Applied and

"Ryegrass Staggers: A role for Fungal Tremorgens". News Zealand Society of Animal Production. Vol. 38 pp 53 - 57. **1978**.

Rice, S. L.; Beuchat, L. R.; Worthington, R. E. "Patulin Production by *Byssoschlamys* spp. In Fruit Juices". Applied and Environmental Microbiology. 34, (6): 791 - 796. **1977**.

Samson, R. A., van Reenen-Hoekstra, E.S., Hartog, B.J. "Influence of pretreatment of raspberry pulp on the detection of heat resistant moulds". In Modern methods in food mycology. Elsevier. pp 155-158. **1992**.

Samson, R. A.; Pitt, J. I. "Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification". Plenum Press, New York. **1990**.

Schroeder, H. W.; Cole, R. J.; Hein, H.; Kirksey, J. W. " Tremorgenic Mycotoxins from *Aspergillus Caespitosus*". Applied Microbiology. 29 (6): 857-858. **1975**.

Scott, P. M.; Lawrence, J. W.; van Walbeek, W. "Detection of Mycotoxins by Thin-Layer Chromatography: Application to Screening of Fungal Extracts". Applied Microbiology. 20, (5): 839 - 842. **1970**.

Scott, V. N.; Bernard, D. T. " Heat Resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolated from commercial fruit juices". Journal of Food Protection. 50, (1): 18 - 20. **1987**.

Smith, T. K. "Recent advances in the Understanding of *Fusarium*. Trichothecene mycotoxicoses". J. Anim Sci Nro. 70 pp 3989 - 3993. **1992**.

Splittstoesser, D. F. "Enumeration of heat Resistant Mold (*Byssoschlamys*)". APHA. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2ed. **1978**.

Splittstoesser, D. F.; Churey, J. J. "Activation and Germination of

Neosartorya Ascospores". In Modern methods in food mycology. Elsevier. pp 169-176. **1992**.

Spittstoesser, D. F.; Kuss, F. R.; Harrison, W.; Prest, D. B. "Incidence of Heat-Resistant Molds in Eastern Orchards and Vineyards". Applied Microbiology. 21, (2): 335 - 337. **1971**.

Spittstoesser, D. F.; Spittstoesser, C. M. "Ascospores of *Byssochlamys fulva* compared with those of a heat resistant *Aspergillus*". Journal of Food Science. 42, (3): 685 - 688. **1977**.

Tourmas, V.; Traxler, R. W. "Heat Resistance of a *Neosartorya fischeri* Strain Isolated from Pineapple Juice Frozen Concentrate". Journal of Food Protection. 57, (9): 814 - 816. **1994**.

Ueno, Y. "Trichothecenes – Chemical, biological and toxicological aspects". Kondasha Ltd & Amsterdam. Elsevier Sci. Pub Bv. Tokyo. **1983**.

Vicencini A.; Zapata M.; Basilico J.C. "Estudio de contaminación fúngica de frutillas y productos derivados". FABICIB. Vol 2. **1999**.

Vigiola, M. I. "Manual de Horticultura". Cátedra de Horticultura. Facultad de agronomía. Universidad de Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur S. A. pp 223 -228. **1987**.

Wainwright, M. "Introducción a la biotecnología de los hongos". Editorial Acribia S. A. **1995**.

Weiser, M.; Fink-Gremmels, J. "Effects of Verruculogen and Fomitremorgin B on Neurotransmitter Release in Vivo". 5th. Congress European Assoc. Veterinary Pharmacology and Toxicology. Copenhagen, D K. pp.193 -195. **1991**.

Yamazaki, M.; Fujimoto, H.; Kawasaki, T. "The structure of a tremorgenic metabolite from *Aspergillus fumigatus* Fres., Fumitremorgin A" *Tetrahedron Letters* Nro. 14 pp 1241-1244. **1975**.

Yamazaki, M.; Suzuki, K.; Fujimoto, H.; Akiyama, T.; Sankawa, U.; Iitaka, Y. "Chemistry of Tremorgenic Metabolites. II. Structure Determination of Fumitremorgin B, a Tremorgenic Metabolite from *Aspergillus fumigatus*". *Chem. Pharm. Bull.* 28, (3): 861 - 865. **1980**.