

Determinación de la capacidad toxicogénica de mohos aislados de jugos cítricos

Alemandri, V.¹; Sobrero, M.S.¹; Basílico, M.L.²; Sanchis, J.C.¹; Basílico, J.C.²

1- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

2- Facultad de Ingeniería Química.

Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829. (3000) Santa Fe.

RESUMEN: La elevada acidez de los jugos reduce al mínimo el ataque bacteriano, por lo que los hongos son la flora predominante en los procesos de alteración. Estos, además, son capaces de producir micotoxinas que pueden resistir los tratamientos térmicos de pasteurización, alterando la calidad de los jugos de consumo masivo. Por tal motivo se las utiliza como indicadores de calidad. Existen numerosos estudios sobre la presencia de aflatoxinas, patulina y citrínina en jugos de frutas. En el presente trabajo se determinó la capacidad toxicogénica de mohos aislados de jugos cítricos, utilizando diferentes métodos analíticos tradicionales como: cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), enzima inmuno ensayo (ELISA) y no tradicionales como: electroforesis capilar (EC). Los mohos estudiados fueron: *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Penicillium expansum* y *P. griseofulvum*. Las micotoxinas evaluadas fueron patulina, citrínina y aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂). Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *A. clavatus* y *A. flavus* aisladas de jugos cítricos, son capaces de producir patulina y aflatoxinas, respectivamente. Esta última se halló en concentraciones inferiores a los establecidos por los Entes Regulatorios. Las demás cepas no mostraron producción de toxinas, o bien las concentraciones fueron inferiores al límite de detección de las técnicas utilizadas.

Palabras claves: jugos-micotoxinas-mohos-determinación.

SUMMARY: Assessing the toxicogenic capacity of mould isolated from citric juice. Alemandri, S.¹; Sobrero, M.S.¹; Basílico, M.L.²; Sanchis, J.C.¹; Basílico, J.C.². High acidity in juices reduces bacterium attack to the minimum, so that the fungi is predominant flora in the alteration processes. Besides they are capable of producing mycotoxins that can resist pasteurization temperature treatments thus altering the quality of juice for massive consumption. Due to this, they are used as quality indicators. There have been many studies about the presence of aflatoxins, patuline and citrinin in fruit juice. In this work we determined the toxicogenic capacity of moulds isolated in citric juice, using different traditional analytical methods such as TLC, HPLC, ELISA and other methods like capillar electrophoresis. The moulds studied were: *Aspergillus clavatus*, *A. Flavus*, *A. terreus*, *Penicillium expansum* and *P. griseofulvum*. The mycotoxins evaluated were patulin, citrinin and aflotoxins (B₁ B₂ G₁ G₂). The results showed that strains of *Aspergillus clavatus* and *A. flavus* isolated in citric juices are capable of producing patulin and aflatoxins respectively. The latter were found in quantities lower than those required by the Regulations. The either strains did not show toxin production or concentration was below the detection level of the techniques applied.

Key words: juice, micotoxin, mould, determination.

* **Correspondencia:**

E-mail: ssobrero @ fbcb .unl .edu .ar

Recibido: 01-07-04

Aceptado: 14-10-04

Introducción

Los jugos cítricos por su baja acidez son alterados predominantemente por mohos y levaduras (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 y 16). Dentro de los mohos, los teleomorfos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son más resistentes al calor. Los ascosporos son capaces de sobrevivir a la pasteurización y hasta se favorece su germinación luego de recibir un *shock* térmico (15,17 y 18). Por otra parte es conocido el efecto protector de algunos compuestos presentes en el alimento como los azúcares.

Estos hongos además de alterar las características organolépticas de los jugos pueden producir micotoxinas, que son metabolitos secundarios nocivos para la salud (16,17 y 19). Se han reportado mohos capaces de hacerlo sobre la matriz de los jugos, ejemplo de ello es *Aspergillus flavus* que puede producir aflatoxina B₁ (20). Como además pueden resistir el calor se las usa como indicador de calidad, éste es el caso de patulina en jugos de manzana y sidras. (21,22,23 y 24). También existen trabajos que reportan la co-ocurrencia de patulina y citrinina en manzanas (25)

El objetivo del presente trabajo es determinar la capacidad toxicogénica de mohos aislados de jugos cítricos, utilizando diferentes métodos analíticos: cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Electroforesis capilar (EC) y enzimo inmuno ensayo (ELISA). Las micotoxinas evaluadas fueron patulina, citrinina y aflatoxinas.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Se utilizaron hongos aislados de jugos cítricos provenientes de una planta productora de la República Argentina, ubicada en la provincia de Entre Ríos. El muestreo se realizó directamente en la planta elaboradora. Las muestras se recogieron en recipientes estériles y se conservaron a 4 °C de temperatura hasta su procesamiento (dentro de las 24 h. de extracción). Se procedió a la identificación de los mohos aislados de acuerdo al método de Pitt and Hocking (15, 26 y 27).

Capacidad productora de patulina: Se estudiaron cepas de *Pexpansum*, *A.clavatus* *P.griseofulvum* provenientes de jugos y una cepa de *Byssochlamys nivea* productora de patulina como control. Los mohos se sembraron en tubos con medio agar-papa-dextrosa (PDA) y se incubaron a 25°C, durante 7 días. Los conidios se resuspendieron tween 80, se sonicó, filtró y por último se realizaron diluciones en agua destilada hasta lograr una concentración de 10⁶ conidios.ml⁻¹ (28,29 y 30). Para la producción de patulina se sembraron estas suspensiones en caldo Czapek suplementado con 0,2 % de extracto de levadura y 0,8 % de glucosa y se incubó a 25°C durante 14 días. En todos los casos se trabajó por duplicado. La extracción de la toxina se realizó con acetato de etilo, luego se evaporó hasta residuo seco que posteriormente se redisolvió en 2 ml de acetato de etilo (29, 30 y 31). También se estudió la capacidad productora de las cepas en jugos de naranjas reconstituidos a partir de dos lotes de jugos concentrados. Se ensayó un clean up utilizando una columna de sílica gel, eluyendo con n-hexano:acetato de etilo (EtAc) (90:10) y 30 ml de n-hexano:acetato de etilo (60:40). Luego se evaporó y redisolvió como en el caso anterior (32).

Capacidad productora de citrinina: Se estudiaron cepas de *P.citrinum*, *Pexpansum* y *A.terreus* aislados de jugos y dos cepas de *P.citrinum* productoras como control. Se procedió de la misma manera que en el caso anterior, pero para la producción de la toxina se utilizó caldo Czapek suplementado con 5 % de glucosa. Se inoculó las suspensiones de conidios y se incubó a 25°C durante 14 días (33). La extracción se realizó con cloroformo en medio ácido, luego se evaporó a sequedad y se redisolvió en cloroformo (34). La presencia de citrinina se confirmó sobre pequeñas alícuotas de medio de cultivo; donde se agregaron gotas de HCL 1N a fin de precipitar la toxina (35).

Capacidad productora de aflatoxinas: Se estudiaron cepas de *Aspergillus flavus* potencialmente productoras de aflatoxinas aisladas de jugos cítricos. Se sembraron en medio MEA a 28°C hasta tener abundante desarrollo. Se colocaron trozos del medio de cultivo con el hongo desarrollado dentro de erlenmeyers que contenían arroz integral. Se agregó agua estéril y se incubaron durante 15 días a 28°C. La extracción se llevó a cabo con metanol 70 %.

Determinación de micotoxinas por cromatografía en capa delgada (CCD): Para las tres micotoxinas se realizó cromatografía unidireccional ascendente, usando cromatoplasmas de silicagel 60 GF, sobre base de Aluminio. Para citrinitina se trató previamente la cromatoplasma con ácido oxálico 10 % en metanol. Para la determinación semi cuantitativa se sembraron diferentes volúmenes de una solución de 100 µg/ml de patrón de citrinitina, marca Sigma. La tabla 1 resume las condiciones y técnica utilizada para realizar las CCD.

Determinación de patulina por Electroforesis Capilar (EC): Se utilizó un equipo marca SpectraPHORESIS® 100, un módulo detector UV/VIS variable Spectra 100, y un integrador modelo SP4600. El modo de operación empleado fue la Electroforesis Capilar de Zona (CZE). Se siguió la metodología puesta a punto por Bär, J. (36). Se empleó un capilar de sílice de 75 µm de diámetro, con una longitud de 45 cm hasta el detector y de 75 cm de extensión total. Las distintas soluciones tanto patrón como las muestras fueron filtradas con acetato de celulosa de 0,20 µm de porosidad, marca Sartorius. Las corridas se realizaron a la longitud de onda de 276 nm (37), el buffer usado para la corrida fue de 35 mM de B₇O₄Na₂·10H₂O (Borato de Sodio o Borax), pK = 9,2 a 25 °C. La inyección de las muestras fue por vacío con una duración de 1 segundo; la tensión empleada fue constante, de 20 Kvoltios; y con polaridad positiva.

Determinación de patulina por HPLC: Se trabajó con un cromatógrafo líquido provisto de una bomba Perkin Elmer Serie 200, un detector Pekin Elmer 785 A UV/VIS e interface NCI 900 marca Nelson. Las condiciones del análisis fueron (38): columna: Phenomenex-Júpiter C18, de 250 mm x 4,6 mm, 300A y 5 µl de solución acuosa de acetonitrilo 10ml/100ml como fase móvil. Se siguió la metodología puesta a punto por Beltzer, P. (39).

Determinación cuantitativa de aflatoxinas por ELISA: Se utilizó el kit RIDASCREEN®FAST Aflatoxin, inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxinas. El límite medio de detección del kit fue encontrado a concentraciones menores a 1,7 ppb y el límite de cuantificación a 5 ppb (5 µg/kg).

Resultados y discusión

Capacidad productora de patulina

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos por CCD, EC y HPLC para la determinación de patulina, en medio de cultivo y en jugo de naranja, para los mohos en estudio y para la cepa productora.

Como se puede observar en la Tabla 2, *Penicillium expansum* y *P. griseofulvum* no muestran capacidad productora de patulina, tanto en las condiciones ideales para su producción, como en los jugos estudiados. Esto indica, que son cepas no productoras de la toxina, o bien, lo serían pero en cantidades inferiores a las detectables por las técnicas aquí empleadas. Los resultados del screening (CCD), fueron confirmados por HPLC. Los Cromatogramas 1 y 2 comparan la corrida de los extractos de medio de cultivo de ambos mohos con la de la cepa testigo. Se puede observar que en la zona del pico de patulina no hay producción de metabolitos.

Con respecto a *Aspergillus clavatus*, resultó productora de patulina, tanto para la técnica de screening, como para su confirmación con HPLC (Cromatograma 3).

Los resultados obtenidos con EC se muestran en los Electroferogramas 1, 2 y 3. En los mismos se advierte una gran interferencia en la zona de absorbancia de la micotoxina; se observan picos con tiempos de retención similares al de patulina (6 minutos), pero con pobre resolución. No obstante, los resultados obtenidos por EC se correlacionan, ya que para el caso de los extractos de medio de cultivo, los extractos de jugos y los extractos de jugos con clean up, *Aspergillus clavatus* que es positivo con las otras técnicas, si bien no se pudo arrojar un resultado preciso, no es descartado por EC. *Penicillium expansum* y *P. griseofulvum* que habían resultado negativos no se puede garantizar la presencia/ausencia de la toxina o la presencia de otros compuestos. En los extractos de jugos con clean up, en los que se esperaba encontrar mejor resueltos los picos que interferían en la zona de absorbancia de patulina, un resultado negativo podría llevar a pensar que la metodología de limpieza de extractos podría resultar desventajosa ya que se puede perder gran parte del compuesto buscado. Este inconveniente ocurre con muchos procedimientos de análisis y de allí la impor-

tancia que tiene el diseño de pasos en un protocolo de investigación cuando se busca determinado compuesto. En este caso, como *Aspergillus clavatus* no resultó negativo, por lo que se descarta esta posibilidad.

La cepa *Byssoschlamys nivea* productora de patulina utilizada como referencia, mostró presencia de la toxina.

Los extractos a los que se les realizó el clean up con la columna de sílica gel, mostraron resultados similares a los extractos sin este procedimiento, por lo que no se justificaría introducir esta etapa en la metodología, ya que podría ocasionar pérdidas del analito.

Capacidad productora de citrinina

Se muestran en la Tabla 3 los resultados obtenidos por CCD para la determinación de citrinina en medio de cultivo, para los mohos en estudio y para las cepas productoras de referencia.

Las cepas productoras de referencia manifestaron presencia de citrinina a diferencia de las cepas estudiadas que resultaron ser no productoras de la toxina, o bien productoras en una cantidad inferior a la detectada por la técnica aquí empleada. El límite de detección de la técnica de 0,02 µg.

Capacidad productora de aflatoxinas

La cepa *Aspergillus flavus* estudiada resultó ser productora de aflatoxinas en una muy baja concentración (1,9 ppb), resultado obtenido con la técnica de ELISA. Este valor es bajo comparándolo con los niveles de tolerancia que se encuentran entre 5 y 300 ppb para las cuatro aflatoxinas principales (B₁, B₂, G₁, G₂) dependiendo si se trata de alimentos para humanos o animales (40,41 y 42); en Argentina se establecieron límites de 20 µg de aflatoxinas totales/kg para el contenido en alimentos de consumo humano, mientras que las FAO y WHO fijaron 15 µg de aflatoxinas totales/kg (43).

Este resultado concuerda con lo obtenido por CCD ya que se habían sembrado volúmenes de hasta 50 µl, que según la concentración aquí hallada y teniendo en cuenta que se tomaron 5 g de muestra a

los que se les agregaron 25 ml, correspondería a una cantidad de siembra de 0,019 ng, la cual es muy pequeña como para ser detectada por CCD, ya que en un estudio se encontró el límite de detección para aflatoxinas de 0,5 ng para esta técnica (38).

Conclusiones

De acuerdo con los resultados presentados se puede concluir:

- Que la cepa de *Penicillium expansum* y la de *P. griseofulvum*, aisladas de jugos cítricos, en condiciones óptimas para la producción de la toxina en medio de cultivo y en jugo de naranja, no mostraron capacidad productora de patulina a diferencia de la de *A. clavatus* que resultó productora.

- Que la cepa de *Penicillium citrinum*, la de *P. expansum* y la de *Aspergillus terreus*, aisladas de jugos cítricos, en condiciones óptimas para la producción de la toxina, no mostraron capacidad productoras de citrinina.

- Que la cepa *Aspergillus flavus*, aislada de jugos cítricos, en condiciones óptimas para la producción de la toxina, resultó ser productora de aflatoxinas en concentraciones inferiores a las establecidas por los Entes Regulatorios.

Con respecto a las técnicas utilizadas, CCD es una buena técnica de screening (sencilla, económica y rápida). Como técnicas de confirmación HPLC es exacta, confiable y se obtienen concentraciones mínimas detectables más bajas que por CCD; pero no es rápida y es costosa. Con respecto a electroforesis capilar, es rápida, de muy alta resolución y económica, elimina el problema de los solventes de HPLC, pero, para el caso de la toxina estudiada, sería necesario seguir investigando y encontrar las condiciones de trabajo que permitan resolver adecuadamente los picos. Por último la técnica de ELISA es selectiva y rápida, adecuada cuando se necesita investigar una gran cantidad de muestras, los procedimientos de limpieza no son tan intensivos y no requiere de equipos sofisticados, pero no se disponen de anticuerpos para todas las micotoxinas.

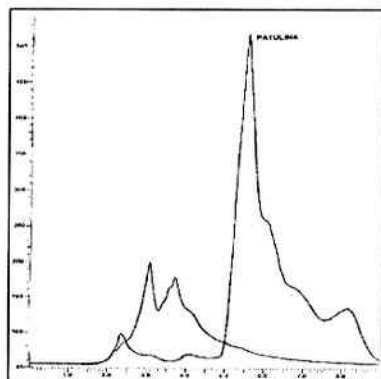
Tabla 1: Metodología para determinar Patulina, Citrinina y Aflatoxinas por CCD

| Micotoxina | Patulina | Citrinina | Aflatoxina |
|---------------------|--|--|---|
| Solvente de corrida | Tolueno-acetato de etilo-acido fórmico (5: 4: 1 V/V) | Tolueno-acetato de etilo-acido fórmico (5: 4: 1 V/V) | Cloroformo-acetona (9:1 v/v) |
| Volumen sembrado | 10 μ l | 10 μ l | 10 μ l |
| Revelador | Acido sulfúrico al 50% en etanol (V/V) en caliente | No se utilizó | No se utilizó |
| Color de la mancha | Pardo a la luz visible | Amarillo verdoso bajo luz UV 366 nm | Azul para B ₁ y B ₂ y verde para G ₁ y G ₂ bajo luz UV ² de onda larga. ¹ |
| Método utilizado | Cole, 1981 | Scott et al., 1972 | Izquierdo y col., 1995; AOAC, 1995 |

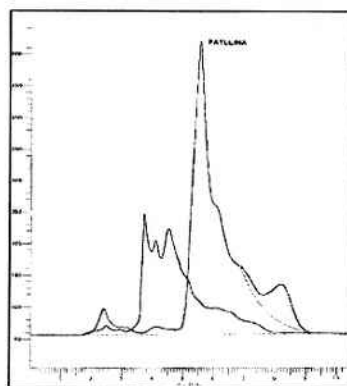
Tabla 2: Determinación de patulina, en medio de cultivo y en jugo de naranja por CCD, EC y HPLC

| Moho | Extractos de medio de cultivo ¹ | | | Extractos de jugos | | | Extractos de jugos con clean up | | |
|---------------------------|--|----|------|--------------------|----|------|---------------------------------|----|------|
| | CCD | EC | HPLC | CCD | EC | HPLC | CCD | EC | HPLC |
| <i>P. expansum</i> | - | D | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>A.clavatus</i> | + | D | + | + | D | D | + | D | D |
| <i>P.griseofulvum</i> | - | D | - | - | D | - | - | - | - |
| <i>Byssochlamys nivea</i> | + | D | + | NR | NR | NR | NR | NR | NR |

D = Dudoso, NR = No se realizó. ¹ caldo Czapek suplementado con 0,2 % de extracto de levadura y 0,8 %



Cromatograma n° 1:
P. expansum en medio de cultivo. *



Cromatograma n°2:
P. griseofulvum en medio de cultivo. *

* Ambos con cromatograma de *Byssochlamys nivea* superpuesto.

Bibliografía

1. Hays, G.L.; Riester, D.W. (1952). The control of "off-odor" spoilage in frozen concentrated orange juice. *Food Technol.* 6: 386-389.
2. Berry, J.M.; Witter, L.D.; Folinazzo, J.F. (1977). Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice. *Food Technol.* 10: 553-556.
3. Faville, L.W.; Hill, E.C. (1951). Incidence and significance of microorganisms in citrus juice. *Food Technol.* 5: 923-925.
4. Murdock, D.I.; Hatcher, W.S., Jr. (1975). Growth of microorganisms in chilled orange juice. *J. Milk Food Technol.* 38: 393-396.
5. Kopelman, I.L.; Efon, D. (1977). Shelf life and microbial growth kinetics of chilled reconstituted orange juice. *Lebensm. -Wiss. u.- Technol.* 10: 131-134.
6. Fellers, P.J. (1988). Shelf life and quality of freshly squeezed, unpasteurized, polyethylene-bottled citrus juice. *J. Food Sci.* 53: 1699. *Food Sci.* 53: 645-646.
7. Parish, M.E.; Higgings, D.P. (1989). Isolation and identification of lactic acid bacteria from samples of citrus molasses and unpasteurized orange juice. *Journal of Food Science.* 53: 645-646.
8. Parish, M.E.; Higgings, D.P. (1989). Yeast and moulds isolated from spoiling citrus products and by-products. *J. Food Protect.* 52: 261-263.
9. Parish, M.E.; Higgings, D.P. (1990). Investigation of the microbial ecology of commercial grapefruit sections. *J. Food Protect.* 53: 685-688.
10. Parish, M.E.; Hill, E.C. (1959). Microbiology of citrus fruit processing. Gainesville, Florida, Fl. Ag. Expt. Sta. Bull. 618.
11. Wyatt, M.K.; Parish, M.E. (1995). Low temperature germination of conidia and arthrospores from citrus related filamentous fungi. *Food Microbiol.* 12: 237-243.
12. Wyatt, M.K.; Parish, M.E.; Widmer, W.W., Kimbrough (1995). Characterization of mould growth in orange juice. *Food Microbiol.* 12: 347-355.
13. Narciso, J.A.; Parish, M.E. (1997). Endogenous mycoflora of gable-top carton paperboard used for packaging fruit juice. *Journal of Food Science.* 62: 1223-1225.
14. Nussinovitch, A.; Rossen, B. (1989). Could destruction in aseptically filled citrus juice. *Lebensm. -Wiss. u.- Technol.* 22:60.
15. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (1997). Fungi and food spoilage. 2 ed. Blackie A. & London U.K.
16. Sobrero, M.S. (2002). Identificación de mohos en el proceso de elaboración de jugos cítricos concentrados. Tesis de Magister en Cs. Y Tec. De los alimentos. FIQ.UNL.
17. Beuchat, L.R. (1986). Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. *J. Food Science*, 51: 1506-1510.
18. Douglas King, A.; Halbrook, J.R. and W.U. (1987). Ascospores heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. *J. Food Science*, 52: 1252-1266.
19. Basílico, J.C. (1995). Micotoxinas en Alimentos. El riesgo sobre la mesa. Centro de publicaciones Universidad Nacional del Litoral.
20. Bankole, S.A. (1993). Fungi associated with post-harvest rot of sweet and aflatoxin B1 production by isolates of *Aspergillus flavus* on plain and supplemented orange juice. *Die Nahrung*, 37: 380-385.
21. E.M.A.N.a European Mycotoxin Awareness Network. (2002). Kits de pruebas-Curso de aprendizaje 1. Disponible en: http://www.lfra.co.uk/eman/train1_1.htm. Acceso el: 01-09-03.
22. E.M.A.N.b European Mycotoxin Awareness Network. (2002). Fact Sheet 6 Patulin. Leatherhead Food Research Association. Disponible en: <http://www.lfra.co.uk/eman/fsheet6.htm>. Acceso el: 17-02-03.
23. E.M.A.N.c European Mycotoxin Awareness Network. (2002). Fact Sheet 9 Citrinin. Leatherhead Food Research Association. Disponible en: <http://www.lfra.co.uk/eman/fsheet9.htm>. Acceso el: 16-02-03.
24. E.M.A.N.d European Mycotoxin Awareness Network. (2002). Fact Sheet 2 The Aflatoxins. Leatherhead Food Research Association. Disponible en <http://www.lfra.co.uk/eman/fsheet2.htm>. Acceso el: 01-09-03.
25. Gimeno, A.; Martins, H.M. and Bernardo, F. (2002). «Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots" published by M.L Martins, in *Food Additives and Contaminants*, Vol.19, No.6, 568-574
26. Pitt, J.I. (1991). A laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO Division of Food Processing. Australia.
27. Pitt, J.I.; Hocking, A.D.; Samson, R.A.; King, A.D. (1992). Recommended Methods for Mycological Examination of foods. En: *Modern Methods in Food Mycology*. 1 ed., Elsevier Sc. Publishers B.V. Holland.
28. Sanchis, V.; Lafuente, F.; Viñas, I.; Torres, M.; Canela, R. (1992). Influencia de las condiciones de incubación en la producción de patulina por *Penicillium griseofulvum* Dierckx. *Revista Ibérica de Micología*, 9: 88-90.
29. Torres, M.; Sanchis, V.; Sala, N.; Canela, R. (1986). Caracterización de una cepa de *P. griseofulvum* productora de patulina y griseofulvina. *Revista Ibérica de Micología*, 3: 69-76.

30. Viñas, I.; Vela, E.; Sanchis, V. (1993). Capacidad productora de patulina de cepas *Penicillium expansum* procedentes de centrales hortofrutícolas de Lleida. Revista Ibérica de Micología, **10**: 29-31.
31. Rice, S.L.; Beuchat, L.R. and Worthington, R.E. (1977). Patulin Production by *Byssochlamys* spp. In Fruit Juices. Applied and Environmental Microbiology, vol. **34**. p: 791-796.
32. Müller, H.M. and Amed, R. (1997). Formation and Disappearance of Mycophenolic Acid, Patulin, Penicilic Acid and PR toxin in Maize Silage Inoculated with *Penicillium roqueforti*. Arch. Anim. Nutr., vol. **50**. p: 213-225.
33. Comerio, R.M. (1998). Influencia de la actividad acuosa sobre la producción de citrulina y deoxynivalenol en trigo. Tesis doctoral de la UBA.
34. Jackson, L.K. and Ciegler, A. (1978). Production and analysis of citrinin in corn. Appl. and Environ. Microbiol. **36**:408-411.
35. Smith, J.E. and Moss, M.O. (1985). Mycotoxins. Formation, Análisis and Significance. John Wiley & Sons. Great Britain. 148 pp.
36. Bär, J. (2002). Producción de patulina en ensilados de alfalfa inoculados con *Byssochlamys nivea* toxicogénico. Tesis de Lic. En Biotecnología. FBCB. UNL.
37. Cole, R.J. and Cox, R.H. (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, Inc. New York, U.S.A.
38. Técnicas de determinación de micotoxinas en alimentos. (2002) Disponible en: www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/guiastp/guiastp.html. Acceso el: 05-08-03.
39. Beltzer, P. (2003). Estudio de *Byssochlamys nivea* en ensilados de alfalfa y potencialidad de los mismos para producir patulina en microsilos experimentales. Tesis de Magister en Cs. Y Tec. De los alimentos. FIQ.UNL.
40. Rosner, H. (1998). Regulaciones de la micotoxina: una actualización. Revue de Médecine Vétérinaire **149**: 679-680.
41. Schuler, P.L., Van Egmond H.P. y Stoloff, L. (1983). Límites y reglamentaciones de las micotoxinas. En "Proceedings International Symposium on Mycotoxins" El Cairo, Egipto, 6-8 de septiembre de 1981. P. 111-129.
42. Van Egmond, H.P. (1989). Situación actual de la reglamentación de las micotoxinas. Informe sobre las tolerancias y el estado de los métodos estándar de muestreo y análisis. Aditivos y contaminantes alimenticios **6**:139-188.
43. World Center research Fund. Food, Nutrition and Prevention of Cancer. (1997). Washington American Institute for Cancer Research. pp 488-489.