

Tesis de Posgrado

Detección de hongos toxicogénicos en alimentos por métodos biológicos

Basilico, Juan Carlos

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Basilico, Juan Carlos. (1989). Detección de hongos toxicogénicos en alimentos por métodos biológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2230_Basilico.pdf

Cita tipo Chicago:

Basilico, Juan Carlos. "Detección de hongos toxicogénicos en alimentos por métodos biológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2230_Basilico.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DETECCION DE HONGOS TOXICOGENICOS
EN ALIMENTOS POR METODOS BIOLOGICOS

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

JUAN CARLOS BASILICO

1989

- 2230

y. 2

A mi esposa.

A mis hijos: Francisco y
Lisandro.

Deseo agradecer muy especialmente al Dr. José Luis Parada por haber sido mi consejero y director de tesis.

Deseo agradecer:

Al Dr. Jacques Payen (Institut National Polytechnique de Lorraine, France) con quien me inicié en esta línea de trabajo.

A la Dra. Therese Girard (Faculté de Pharmacie, Nancy, France) por haber contribuido a mi formación y brindado su experiencia en este tema.

Al Dr. Pierre Lafont (Laboratoire de Microbiologie Appliquée a l'alimentation et a la nutrition. INSERM. France) por el desinteresado envío de bibliografía y standares de toxinas.

Al Dr. Martyn Steyn (National Research Institute of Nutritional Diseases of the South African Medical Research Council South Africa) por el desinteresado envío de bibliografía y standares de toxinas.

A la Dra. Celia Coto (Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Exactas, U.N.B.A.) por haberme permitido realizar parte de este trabajo en el laboratorio que dirige.

A la Licenciada Silvia Coronato (Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Exactas, U.N.B.A.) por la colaboración prestada en la realización de los bioensayos con células VERO).

A la Dra. María Cristina Lurá (Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, U.N.Litoral) por la colaboración en la tarea de clasificación taxonómica.

A la Licenciada Adriana Saubois (Departamento Bioingeniería, Facultad de Ingeniería Química, U. N. Litoral) por la colaboración en la puesta a punto de los ensayos biológicos.

A la Bioquímica Ana María González (Cátedra de Microbiología General Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, U. N. Litoral) por la colaboración en los estudios de hemólisis.

A la Dra. Mabel García (Facultad de Veterinaria, U. N. Litoral) por la colaboración prestada en la realización de los ensayos biológicos con embrión de pollo.

A la Licenciada Claudia Cadoche (Cátedra de Estadística, carrera Licenciatura en Matemática Aplicada, U. N. Litoral) por la colaboración en la realización de los estudios estadísticos.

Al Sr. Rubén Pantanali (Facultad de Ingeniería Química, U. N. Litoral) por la realización de las fotografías y figuras.

A la Srta. Graciela Olivera por la paciencia para interpretar mis manuscritos y dactilografiar esta tesis.

A mi esposa por sus consejos, su apoyo y tolerar las horas dedicadas a mi trabajo.

A todos los que de alguna manera hicieron posible la culminación de esta tesis.

	Página
I.- INTRODUCCION .	1
I.1.- Generalidades	1
I.2.- Clasificación de las micotoxinas	9
I.2.1.- Grupo 1: Aflatoxinas	9
I.2.2.- Grupo 2: Esterigmatocistinas	11
I.2.3.- Grupo 3: Versicolorinas.	12
I.2.4.- Grupo 4: Ocratoxinas	14
I.2.5.- Grupo 5: Tricotecenos	15
I.2.6.- Grupo 6: Citocalasinas .	19
I.2.7.- Grupo 7: Rubratoxinas	22
I.2.8.- Grupo 8: Toxinas tremorgénicas .	22
I.2.9.- Grupo 9: Lactonas tóxicas	26
I.2.10.- Grupo 10: Roquefortinas	27
I.2.11.- Grupo 11: Epipolitiopiperazine 3-6 Dionas.	28
I.2.12.- Grupo 12: Toxinas de Alternaria	30
I.2.13.- Grupo 13: Acidos Secalónicos	31
I.2.14.- Grupo 14: Malforminas .	32
I.2.15.- Grupo 15: Toxinas del <u>Penicillium</u> <u>islandicum.</u>	33
I.2.16.- Grupo 16: Toxinas producidas en batatas	34
I.2.17.- Grupo 17: Grupo Viridiol	35
I.2.18.- Grupo 18: Toxinas de <u>Aspergillus.</u>	36

	Página
I.2.19.- Grupo 19: Toxinas de <u>Penicillium</u>	37
I.2.20.- Grupo 20: Toxinas de <u>Fusarium</u> .	39
I.2.21.- Grupo 21: Toxinas misceláneas .	40
I.3.- Factores que afectan el crecimiento de hongos toxicogénicos y la producción de micotoxinas.	45
I.3.1.- Microorganismo .	45
I.3.2.- Factores nutricionales .	47
I.3.3.- Factores ambientales	48
I.4.- Utilización de bioensayos para la detección de micotoxinas y hongos toxicogénicos .	53
I.4.1.- Bioensayo utilizando <u>Bacillus thuringiensis</u>	57
I.4.2.- Bioensayo utilizando <u>Lepidium sativum</u>	61
I.4.3.- Ensayo REC: Bioensayo para la detección de toxinas que lesionan el ADN celular .	63
I.4.4.- Hemólisis en hematíes humanos	65
I.4.5.- Bioensayos con Embrión de pollo.	65
I.4.6.- Bioensayo con cultivo de células de mamíferos	67
I.5.- Objetivos	70
II.- MATERIALES Y METODOS .	72
II.1.- Muestreo de alimentos .	72

	Página
II.2.- Aislamiento de hongos .	72
II.3.- Conservación de las cepas .	73
II.4.- Cultivo de las cepas en sus medios ecológicos	73
II.5.- Extracción de metabolitos tóxicos .	74
II.6.- Identificación de las cepas	74
II.7.- Extractos blanco para bioensayos	78
II.8.- Bioensayos.	78
II.8.1.- Bioensayo utilizando <u>Bacillus thuringiensis</u> .	78
II.8.2.- Bioensayo utilizando <u>Lepidium sativum</u>	82
II.8.3.- Ensayo REC	83
II.8.4.- Hemólisis.	86
II.8.5.- Bioensayo con Embrión de Pollo	87
II.8.6.- Bioensayo con células VERO	88
II.8.7.- Cepas toxicogénicas controles.	90
II.9.- Análisis de micotoxinas por cromatografía en capa delgada	92
II.10.- Fraccionamiento de los extractos fúngicos por cromatografía en capa delgada.	93
II.11.- Análisis estadísticos.	95
III.- RESULTADOS Y DISCUSION	97
III.1.- Evaluación de la capacidad toxicogénica de los hongos contaminantes de alimentos para consumo humano y o animal.	97

	Página
III.2.- Estudios estadísticos.	129
III.3.- Análisis químicos de micotoxinas en los extractos fúngicos correspondientes a especies reconocidas como toxicogénicas	132
III.4.- Caracterización cromatográfica de meta bolitos tóxicos no identificados .	139
IV.- CONCLUSIONES .	143
V.- BIBLIOGRAFIA .	148

I INTRODUCCION

I.1. GENERALIDADES

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertas especies de hongos cuando crecen en condiciones favorables sobre diferentes sustratos. Los hongos productores de micotoxinas están ampliamente distribuidos en el medio ambiente y se los puede encontrar en una gran variedad de alimentos, especialmente vegetales, algunos de ellos de gran importancia en la dieta humana y animal, como son los cereales y oleaginosas. Algunos hongos invaden los cultivos en el campo, antes de ser cosechados, otros son capaces de desarrollar en los productos almacenados en una gran diversidad de condiciones ambientales (1).

El Dr. Alozie define a las micotoxinas como contaminantes ambientales de origen biológico (2).

Tal como su nombre lo indica, son compuestos que causan enfermedades conocidas con el nombre genérico de "micotoxicosis", tanto en el hombre como en los animales. La palabra micotoxicosis es muy general y abarca muchas enfermedades diferentes, que sólo están relacionadas entre sí porque se deben a toxinas producidas por mohos y cuya acción se observa fundamentalmente en hígado, riñón, pulmón y sistema nervioso (3).

Por otra parte, se denominan "micosis" al grupo de afecciones debidas a diversas especies de hongos, los que invaden los tejidos vivos, desarrollándose sobre ellos (4).

Aunque la calidad bacteriológica de los alimentos se controla y estudia desde hace tiempo, sólo en los últimos años ha cobrado importancia el estudio de hongos y levaduras encontrados en alimentos de uso corriente y sus ingredientes (5)

(6) (7) (8).

El conocimiento de las micotoxicosis en seres humanos y ganado datan de muy largo tiempo. El ergotismo, por ejemplo, enfermedad debida al consumo de centeno contaminado con Claviceps purpurea, se manifestó en Europa y Lejano Oriente desde la Edad Media hasta principios del presente siglo, causando en algunos casos numerosas muertes. Los metabolitos tóxicos del hongo responsable del ergotismo fueron identificados como alcaloides en 1875 (6).

Por otra parte, entre 1941 y 1947 se produjo en ciertas regiones de Rusia una epidemia de otra enfermedad denominada "leucopeniatóxica alimentaria" (alimentary toxic aleukia: ATA) (9). En este caso la causa fue la ingestión de cereales, especialmente mijo y trigo, que habían permanecido en el campo durante el invierno y habían sido contaminados por hongos del género Fusarium. Las informaciones indicaron que en algunas comunidades se produjo la defunción del 10 % de la población a causa de esta enfermedad.

Si bien los científicos rusos realizaron varias publicaciones sobre la leucopenia tóxica alimentaria y la identificación de los mohos responsables, no llamaron la atención suficiente acerca de las posibles consecuencias sobre la salud, que podrían derivar de la contaminación fúngica de los alimentos.

Fue recién a partir de 1960, en Inglaterra, como consecuencia de una enfermedad que afectó a las aves de corral, especialmente pavos, causando la muerte de millares de estos animales, que se cambió la actitud adoptada frente a los hongos

en los alimentos para humanos y animales (10). Por su etiología desconocida se la denominó originalmente "Enfermedad X de los pavos" (turkey X disease) pero poco tiempo después se produjeron brotes con iguales características que afectaron a patos y faisanes. Se encontró, estudiando la incidencia de esta enfermedad en distintas regiones de Inglaterra, que el factor común en la alimentación de las aves afectadas era harina de maní proveniente de Brasil. Muestras de estas harinas fueron analizadas para detectar compuestos tóxicos conocidos o presencia de plantas venenosas sin resultados satisfactorios; se observó en cambio la presencia de hifas en más del 20 % del maní de las muestras que habían resultado tóxicas. Este fue el primer indicio que llevó a sugerir la presencia de una toxina de origen fúngico, si bien no fue posible aislar ningún hongo a partir de esas hifas que evidentemente estaban muertas.

Con posterioridad se tuvo conocimiento de otros brotes de enfermedad en cerdos y ganado vacuno, aparentemente del mismo origen. Preparando raciones con estas harinas de maníes brasileños se reprodujo el síndrome tóxico en patos jóvenes. Esto fue la base de un método biológico que resultó útil para detectar la presencia de la toxina aún no identificada. En base a las sugerencias de Austwick (11) acerca del origen fúngico de la misma, Sargent y col. (12) comenzaron a aislar hongos y analizar extractos de los cultivos y así obtuvieron a partir de maníes provenientes de Uganda, la primera cepa productora de la toxina que fue identificada como Aspergillus flavus Link ex Fries (13).

De los extractos se pudieron aislar 2 componentes tóxicos que fueron denominados aflatoxinas B y G. (Más tarde se determinó que cada una de estas fracciones constaba de 2 componentes que recibieron el nombre de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂). Su estructura química fue determinada en el Massachusetts Institute of Technology (14).

Trabajos posteriores pusieron en evidencia que las tortas de maní tóxicas producían cáncer de hígado en ratas. Estudios de alimentación en el laboratorio permitieron comprobar que la aflatoxina B₁ es uno de los carcinógenos naturales más potentes que se conocen.

El hecho de que el problema de las aflatoxinas no se limita a un solo producto quedó demostrado por apariciones simultáneas, casi en la misma época, de cáncer hepático en truchas en los Estados Unidos (15). El origen de la enfermedad en este caso se pudo situar en tortas de semillas de algodón empleadas en la preparación de alimentos deshidratados, de las cuales se lograron aislar aflatoxinas y demostrar que las mismas eran el agente carcinógeno.

La identificación de las aflatoxinas como metabolitos fúngicos causantes de enfermedad en diversas especies animales y el hecho de representar un peligro potencial para el ser humano llevaron a la intensificación inmediata del esfuerzo científico para identificar hongos productores de otras micotoxinas. Actualmente se considera que los hongos principales implicados en micotoxicosis pertenecen a los géneros Aspergillus, Fusarium y Penicillium (16) (17).

Cabe acotar que dentro de cada especie productora de mico

toxinas, existen cepas no productoras, por lo tanto la presencia de mohos en un alimento no implica necesariamente la presencia de micotoxinas.

Por otra parte, un mismo hongo puede producir diferentes tipos de micotoxinas simultáneamente y por esta razón es posible que la dieta diaria esté contaminada con más de un tipo de micotoxinas. Esto es importante, ya que pueden existir efectos sinérgicos entre distintas toxinas.

También es de destacar que puede haber contaminación con estos metabolitos aunque no haya presencia visible de mohos o cambios de aspecto, olor o sabor en el alimento.

En el documento "Micotoxinas" presentado en el IV Congreso Argentino de Microbiología (18), consta que en general el mayor volumen de trabajos, a nivel internacional, se ha concentrado en las siguientes micotoxinas: aflatoxinas, zearalenona, ocratoxinas y tricotecenos. Esto se explica porque estas toxinas comparten las siguientes características:

- a) Son capaces de producir efectos adversos bien definidos en diversas especies animales.
- b) Existe evidencia de exposición humana de grado variable a través de la contaminación de uno o varios componentes de la dieta.
- c) Existe algún tipo de patología humana, de etiología por el momento desconocida, cuya sintomatología puede ser compatible con la que cabe esperar de los efectos de estas toxinas.
- d) Existen numerosos casos de brotes de micotoxicosis en ganado y animales de granja, en los cuales ha sido

bien documentada la presencia de alguna de estas sustancias.

En otros casos sólo se han detectado brotes de micotoxicosis en animales, pero no existe evidencia hasta el momento de exposición o de patología humana, como en el caso de esterigmatocistina, toxinas tremorgénicas o citrinina.

La ingestión por el ganado de pasturas o piensos contaminados pueden ocasionar serias pérdidas a los productores y en diversos casos esto justifica la realización de programas de investigación y control sobre determinadas micotoxinas que hayan demostrado tener una incidencia importante en el medio rural, aún cuando la exposición humana no sea preocupante por el momento.

En último término corresponde considerar aquellas toxinas que sólo han demostrado su toxicidad en sistemas experimentales, es decir que hasta el momento no se ha encontrado que produzcan intoxicaciones naturales en hombres y animales. Dentro de este grupo podemos mencionar la patulina, el ácido penicílico, la toxina PR, el ácido ciclopiazónico y muchas otras que han sido extraídas de cultivos de muy diversas especies de hongos. Sobre estas sustancias debe mantenerse una vigilancia preventiva, en tanto se profundizan los conocimientos sobre sus efectos tóxicos en distintas especies.

Como ocurre con otros componentes naturales o contaminantes de alimentos, se prestará especial atención a aquellas toxinas que puedan producir efectos irreversibles o acumulativos, porque en tal caso aún la presencia de mínimas cantidades en la dieta humana es significativo.

Debe tenerse en cuenta que usualmente, cuando los alimentos se deterioran, no son consumidos por el hombre (o al menos se descartan las partes afectadas), pero son destinados a la alimentación animal. Esto explica que la incidencia de micotoxicosis agudas es fundamentalmente un problema de sanidad animal, en tanto que para el ser humano es de mayor importancia la toxicidad crónica, asociada con el consumo de pequeñas cantidades de toxinas durante períodos prolongados.

En general las micotoxicosis agudas son más fácilmente detectables, por la intensidad y especificidad de los síntomas y también por la posibilidad de identificar el material contaminado y la toxina responsable. En cambio en la toxicidad crónica, resulta muchas veces difícil establecer una relación causa-efecto porque los síntomas se producen a largo plazo y pueden confundirse con los de otras enfermedades. Para dar un ejemplo extremo, podemos mencionar experiencias con animales donde se demostró que puede producirse cáncer hepático muchos meses después de haber cesado la exposición de aflatoxinas. Por esta razón es necesario trabajar experimentalmente, produciendo intoxicaciones crónicas en diversas especies animales bajo condiciones cuidadosamente controladas, para poder conocer adecuadamente el cuadro tóxico, observando si existen en las poblaciones humanas y animales trastornos que hagan sospechar una micotoxicosis. Si esto ocurre se debe tratar de confirmar dicha presunción mediante metodología epidemiológica, correlacionando incidencia de la enfermedad con grado de contaminación de la dieta en distintas áreas geográficas o distintos grupos poblacionales.

Debe tenerse en cuenta que el problema es muy complejo, - porque existe una gran cantidad de factores que pueden modificar las respuestas tóxicas. Hoy se sabe que la naturaleza e intensidad de los efectos varía con el sexo, la edad, el estado nutricional, la composición de la dieta, la exposición simultánea a otros agentes tales como pesticidas, drogas, etc. Debe comprenderse que en la realidad los seres humanos y los animales no están expuestos a una toxina pura, como ocurre en los estudios experimentales. Lo común es que aparezcan mezclas de distintas toxinas que los hongos pueden producir en proporciones variables en los distintos sustratos, no pudiéndose predecir cuál puede ser el efecto combinado de distintas micotoxinas (19).

I.2. CLASIFICACION DE LAS MICOTOXINAS

Richard J. Cole y Richard H. Cox en su "Handbook of Toxic Fungal Metabolites" (20), clasifican a las micotoxinas en 21 grupos. Las mismas fueron agrupadas en base a sus semejanzas químicas, siendo los 4 últimos la excepción. No pudiéndose asociar a las toxinas por sus características químicas, en 3 de ellos se lo hizo de acuerdo al género que las produce (Aspergillus, Penicillium y Fusarium). El grupo restante comprende aquellas micotoxinas que no pudieron ser agrupadas bajo ningún criterio común.

Se describen a continuación las características fundamentales de cada uno de esos grupos.

I.2.1. GRUPO 1: AFLATOXINAS.

Son metabolitos altamente tóxicos y carcinogénicos producidos por Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus y Aspergillus nomius. Las aflatoxinas principales son: B₁, B₂, G₁ y G₂. Otros miembros de este grupo son derivados de estos 4 compuestos como productos metabólicos de sistemas animales o microbianos (por ejemplo: M₁, M₂, P₁, Q₁ y aflatoxícol) o producidos espontáneamente en respuesta a un medio ambiente químico tales como B_{2a}, G_{2a} y D₁. La aflatoxina B₁ es el contaminante más común siendo a su vez la más tóxica y carcinogénica del grupo.

Las aflatoxinas son compuestos altamente fluorescentes. Su estructura se caracteriza por ser heterocíclica con un anillo

dihidrofurano o tetrahidrodifurano unido a una cumarina sustituida. (21) (22) (23) (24) (25).

La toxicología de las aflatoxinas varía considerablemente con la especie, la edad, sexo y estado nutricional.

Las lesiones observadas después de una intoxicación aguda son primordialmente hepáticas, incluyendo degeneración grasa y necrosis del parénquima, fibrosis y proliferación de conductos biliares. La sintomatología se caracteriza en general por decaimiento, falta de apetito, ataxia, ictericia en algunas especies y en algunos casos, convulsiones y muerte.

Cuando las cantidades consumidas son menores, puede producirse toxicidad subaguda, caracterizada por retardo en el crecimiento, baja conversión alimenticia y depresión. Un efecto importante, que ha sido demostrado experimentalmente, es la interferencia con el sistema inmunológico, que origina disminución de las defensas orgánicas y mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas de diversos tipos.

Con niveles dietarios aún menores, no se observan alteraciones en el corto plazo, pero en varias especies se produce cáncer de hígado a tiempos variables después de comenzar a consumir la dieta contaminada. En determinadas condiciones puede observarse tumores en otros órganos tales como estómago, esófago, riñón o colon. (26) (27) (28).

GRUPO AFLATOXINAS	FORMULA MOLECULAR
Aflatoxina P ₁	C ₁₆ H ₁₀ O ₆
Aflatoxina D ₁	C ₁₆ H ₁₄ O ₅
Parasíticol (aflatoxina B ₃)	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
Aflatoxina B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆
Aflatoxina Q ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Aflatoxina G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Aflatoxina M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇
Aflatoxina B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
Aflatoxicol A	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
Aflatoxicol B	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
Aflatoxina G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Aflatoxina M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Aflatoxina B ₂ a	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Aflatoxina G ₂ a	C ₁₇ H ₁₄ O ₈
Aflatoxicol O-ethyl ether A	C ₁₉ H ₁₈ O ₆
Aflatoxicol O-ethyl ether B	C ₁₉ H ₁₈ O ₆

I.2.2. GRUPO 2: ESTERIGMATOCISTINAS

Son un grupo de metabolitos relacionados producidos por - Aspergillus spp. Bipolaris spp. y Emericella spp. (29) (30) (31) (32) (33) (34).

Químicamente son xantonas unidas a un dihidrodifurano o tetrahidrodifurano. Las diferencias químicas entre los distintos miembros del grupo son la presencia o ausencia de una in-

saturación en posición 2 y 3 del difurano, la sustitución en posición 6, 7 y 10 del sistema xantona y o la sustitución en posición 3 del sistema difurano. (35) (36) La esterigmatocistina es el compuesto más importante del grupo, es altamente tóxica y carcinogénica. Se la ha encontrado sólo en casos aislados en alimentos. Su presencia suele estar asociada con productos claramente enmohecidos. Con excepción de la aspertoxina, poco se sabe acerca de la toxicidad de los otros miembros del grupo (37). Bioquímicamente la esterigmatocistina y probablemente otros miembros del grupo sean precursores en la biosíntesis de las aflatoxinas (38).

GRUPO ESTERIGMATOCISTINAS	FORMULA MOLECULAR
Esterigmatocistina	$C_{18}H_{12}O_6$
Dihydrosterigmatocistina	$C_{18}H_{14}O_6$
O-Methylsterigmatocistina	$C_{19}H_{14}O_6$
Dihydro-O-methylsterigmatocistina	$C_{19}H_{16}O_6$
Aspertoxina	$C_{19}H_{14}O_7$
5-Methoxysterigmatocistina	$C_{19}H_{14}O_7$
Dihydrodemethylsterigmatocistina	$C_{17}H_{12}O_6$
Dimethoxysterigmatocistina	$C_{20}H_{16}O_8$

I.2.3. GRUPO 3: VERSICOLORINAS

Son un grupo de metabolitos producidos fundamentalmente -

por Aspergillus versicolor, Aspergillus parasiticus y Aspergillus ustus (39) (40).

Poseen una estructura similar a las aflatoxinas y esterigmatocistina (presencia de un dihidrodifurano o tetrahidrodifurano).

Estos grupos están unidos a antraquinonas que difieren una de otra por el núcleo y posición de los sustituyentes en el anillo antraquinónico. Son precursores de la biosíntesis de aflatoxinas. Versicolorina A es el miembro más importante del grupo y es aparentemente menos cancerígena que la esterigmatocistina, según estudios realizados con truchas arco iris. Son de baja toxicidad frente a animales vertebrados (41) (42).

GRUPO VERSICOLORINAS	FORMULA MOLECULAR
Versicolorina A	$C_{18}H_{10}O_7$
Versicolorina B	$C_{18}H_{12}O_7$
Versicolorina C	$C_{18}H_{12}O_7$
Averufin	$C_{20}H_{16}O_7$
Norsolorinic acid	$C_{20}H_{18}O_7$
Versiconal hemiacetal acetate	$C_{20}H_{16}O_9$
Versiconol acetate	$C_{20}H_{18}O_9$
Versiconol	$C_{18}H_{16}O_8$
Nidurufin	$C_{20}H_{16}O_8$
Dimethylnidurufin	$C_{22}H_{20}O_8$
Aversin	$C_{20}H_{16}O_7$
O-Methylaversin	$C_{21}H_{18}O_7$

I.2.4. GRUPO 4: OCRATOXINAS

Son producidas por varias especies de los géneros Aspergillus y Penicillium, especialmente Aspergillus ochraceus y Penicillium viridicatum (43) (44).

Químicamente son compuestos que poseen una 3,4 dihidro 3 metilisocumarina unida (vía grupo 7 carboxy) a la 1- β fenilalanina por una unión amida. La ocratoxina es el compuesto principal del grupo presentando la mayor toxicidad (45) (46) (47).

Los efectos de esta toxina han sido extensamente estudiados en una variedad de especies animales. Si bien en altas dosis puede observarse daño en diversos órganos y tejidos, a bajos niveles de exposición, los daños se concentran exclusivamente en riñón. Las lesiones observadas incluyen degeneraciones de los túbulos, fibrosis intersticial y posterior hialinización de los glomérulos con alteración de la función renal.

Las intoxicaciones naturales producidas por la ocratoxina A parecen ubicarse en una zona geográfica muy estrecha, ya que sólo se han informado casos de nefropatías porcina y aviar en el norte de Europa. Un estudio muy exhaustivo realizado en Dinamarca reveló que la nefropatía porcina, que es endémica en dicho país, es probablemente debida a la presencia de ocratoxina A en la dieta de los cerdos. En concordancia con esto se pudo demostrar la presencia de esta toxina en el 35 % de las muestras de riñones extraídos de animales afectados, en tanto no aparece en riñones de animales sanos (48) (49) (50).

En lo que respecta a patología humana, existe un área geográfica donde ocurre con frecuencia una nefropatía endémica

cuyas características clínicas e histopatológicas guardan estrechas similitudes con la ocratoxicosis porcina. Esto ocurre en determinadas regiones de Bulgaria, Rumania y Yugoslavia. Algunos estudios preliminares realizados en dichos países indican que los alimentos consumidos en las zonas endémicas tienen mayor frecuencia de contaminación con ocratoxina A que los provenientes de zonas no endémicas. Para la evaluación del riesgo humano respecto de esta toxina, se debe tener presente que ha demostrado ser cancerígena y teratogénica en ratas, ratones y hamsters a niveles de dosis relativamente bajas. (51) (52) (53) (54).

GRUPO OCRATOXINAS	FORMULA MOLECULAR
Mellein	$C_{10}H_{10}O_3$
4-Hydroxymellein	$C_{10}H_{10}O_4$
Ocratoxina A	$C_{20}H_{18}O_6NC1$
Ocratoxina B	$C_{20}H_{19}O_6N$
4-Hydroxyocratoxina A	$C_{20}H_{18}O_7NC1$
Ocratoxina C	$C_{22}H_{22}O_6NC1$

I.2.5. GRUPO 5: TRICOTECENOS

Los tricotecenos comprenden a un grupo de sesquiterpenos producidos por varias especies de hongos imperfectos (Fusarium, Myrothecium, Trichoderma, Calonectria, Cephalosporium,

Stachybotris, etc.) (55) (56) (57) (58) (59)

Se caracterizan por tener una estructura tetracíclica 12,13-epoxitricotec-9-eno. El grupo puede ser dividido en 4 subgrupos basado en diferencias químicas. Los 2 primeros grupos difieren principalmente por la presencia o ausencia de la función carbonilo en el C-8. Ejemplos de tricotecenos que no contienen la función carbonilo son la toxina T 2, la HT 2, monoacetoxiscirpenol, diacetoxiscirpenol, tricodermina y escirpentriol, aquellos que contienen el grupo carbonilo son nivalenol, fusarenona X, deoxinivalenol, deoxinivalenol monoacetato y tricotecina. Los 2 últimos grupos, las roridinas y verrucarinas son diesteres macrocíclicos del verrucarol, mientras las verrucarinas son triesteres (60) (61) (62) (63) (64) (66) (67) (68) (69).

Los tricotecenos como grupo muestran un amplio rango de actividad biológica. Son antibacterianos, antivirales, antifúngicos y poseen actividad citostática; algunos son fitotóxicos y todos muestran algún grado de toxicidad animal, incluyendo actividad insecticida (70) (71) (72).

Existe un amplio rango de toxicidad en los vertebrados y la toxicidad aguda varía considerablemente. Signos clínicos groseros reportados por tricotecenos son: vómitos, diarrea, anorexia, ataxia, hematuria, leucocitosis seguida de severa leucopenia, inflamación del tracto gastrointestinal, degeneración de células nerviosas en el sistema nervioso central, degeneración y hemorragia en el músculo cardíaco y lesiones en los nódulos linfáticos, testículos y tímulo. En contacto con la piel causan dermonecrosis. El daño en el tejido puede ser

intenso, incluyendo zonas subcutáneas.

Se ha constatado la muerte en animales por administración por vía oral, endovenosa, intraperitoneal y cutánea. Los tricotecenos son citotóxicos en cultivo de células de mamíferos. Bioquímicamente son potentes inhibidores de la síntesis de proteínas y ADN.

Algunos tricotecenos inhiben la iniciación de la síntesis de proteínas en los polirribosomas, otros inhiben la elongación y o finalización de la síntesis. Los tricotecenos han sido implicados numerosas veces en intoxicaciones animales y en el hombre. Constituyen uno de los grupos de micotoxinas más importantes en relación al hombre y los animales (73) (74) (75) (76).

GRUPO TRICOTECENOS	FORMULA MOLECULAR
<u>12,13-Epoxytrichothec-9-enes</u>	
Trichodermol	$C_{15}H_{22}O_3$
Verrucarol	$C_{15}H_{22}O_4$
Scirpentriol	$C_{15}H_{22}O_5$
T-2 tetraol	$C_{15}H_{22}O_6$
Trichodermin	$C_{17}H_{24}O_4$
Monoacetoxyscirpenol	$C_{17}H_{24}O_6$
Diacetoxyscirpenol	$C_{19}H_{26}O_7$
Neosolaniol	$C_{19}H_{26}O_8$
Neosolaniol monoacetato	$C_{21}H_{28}O_9$
HT-2 toxina	$C_{22}H_{32}O_8$

GRUPO TRICOTECENOS	FORMULA MOLECULAR
T-2 toxina	$C_{24}H_{34}O_9$
4,15-Diacetylverrucarol	$C_{19}H_{26}O_6$
7 α -Hydroxydiacetoxyscirpenol	$C_{19}H_{26}O_8$
7 α ,8 α -Dihydroxydiacetoxyscirpenol	$C_{19}H_{26}O_9$
Calonectrin	$C_{19}H_{26}O_6$
15-Deacetylcalonectrin	$C_{17}H_{24}O_5$
Acetyl T-2 toxina	$C_{26}H_{36}O_{10}$
Crotocin	$C_{19}H_{24}O_5$
Crotocol	$C_{15}H_{20}O_4$
Trichothecene	$C_{15}H_{22}O_2$
4 β ,8 α -Diacetoxy-12,13-epoxy- trichothec-9-ene-3 α ,15-diol	$C_{19}H_{26}O_8$
4-Acetoxy-3,7-diacetoxyscirpenediol	$C_{17}H_{24}O_6$
4 β ,8 α ,15-Triacetoxo-12,13-epoxy- trichothec-9-ene-3 α ,7,2-diol	$C_{21}H_{28}O_{10}$
Triacetoxyscirpenol	$C_{21}H_{28}O_8$
<u>8-Ketotrichothecenes</u>	
Deoxynivalenol	$C_{15}H_{20}O_6$
Nivalenol	$C_{15}H_{20}O_7$
Deoxynivalenol monoacetate	$C_{17}H_{22}O_7$
Fusarenon-X	$C_{17}H_{22}O_8$
Trichothecin	$C_{19}H_{24}O_5$
Nivalenol diacetate	$C_{19}H_{24}O_9$
Trichothecolone	$C_{15}H_{20}O_4$
Trichodermane	$C_{15}H_{20}O_3$

GRUPO TRICOTECENOS	FORMULA MOLECULAR
<u>Macrocyclic diesteres del verrucarol</u>	
Satratoxín G	$C_{28}H_{32}O_{11}$
Satratoxín H	$C_{29}H_{36}O_9$
Roridín A	$C_{29}H_{40}O_9$
Roridín D	$C_{29}H_{38}O_9$
Roridín E	$C_{29}H_{39}O_8$
Roridín H	$C_{29}H_{36}O_8$
Vertisporín	$C_{29}H_{36}O_{10}$
Isoridín E	$C_{29}H_{38}O_8$
7 β , 8 β -Epoxyisororidín E	$C_{29}H_{36}O_9$
7 β , 8 β -Epoxyroridín H	$C_{29}H_{34}O_9$
7 β , 8 β , 2', 3', Diepoxyroridín H	$C_{29}H_{34}O_{10}$
Baccharín	$C_{20}H_{38}O_{11}$
<u>Macrocyclic triesteres del verrucarol</u>	
Verrucarín A	$C_{27}H_{34}O_9$
Verrucarín B	$C_{27}H_{32}O_9$
2'-Dehydroverrucarín A	$C_{27}H_{32}O_9$
Verrucarín J	$C_{27}H_{32}O_8$
Verrucarín K	$C_{27}H_{34}O_8$

I.2.6. GRUPO 6: CITOCALASINAS

Son metabolitos producidos por varias especies fúngicas diferentes no relacionadas entre sí (Aspergillus clavatus,

Rosellinia necatrix, Helminthosporium dematioideum, Phomopsis paspalli, Zygosporium masonii, Chaetomium globosum, Penicillium aurantio-virens, etc.).

Fueron descubiertas en 1967 por su efecto no común sobre cultivo de células de mamíferos. Han recibido diferentes nombres por los laboratorios que las identificaron de acuerdo con la fuente fúngica de las que fueron aisladas. Esos nombres fueron zygosporinas, fominas, caetoglobosinas y paspalina. El nombre de citocalasinas ha sido adoptado por el esqueleto básico de estos compuestos. Las citocalasinas pueden dividirse en 2 grupos de acuerdo a que posean fenilalanina o triptofano en la posición 10 de un sistema de anillos perhidroisoindo. Natori ha clasificado a las citocalasinas en varios grupos diferentes teniendo en cuenta el sustituyente en la posición 10 (77) (78).

Las citocalasinas se caracterizan biológicamente por inhibir la división citoplasmática pero no la división nuclear dando origen a células polinucleadas. Por otra parte inhiben el movimiento celular. Algunos compuestos del grupo resultaron mutagénicos. El único reporte de contaminación natural con citocalasina fue una pasta de tomate contaminada con Hor-miscium. El hongo responsable de la gangrena de las papas Phoma exigua ha demostrado producir citocalasina B en cultivos de papas (79) (80) .

GRUPO CITOCALASINAS	FORMULA MOLECULAR
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>	
Grupo Citocalasina	
Citocalasina E	$C_{28}H_{33}O_7N$
Citocalasina G	$C_{29}H_{34}O_4N_2$
Citocalasina A	$C_{29}H_{35}O_5N$
Citocalasina B	$C_{29}H_{37}O_5N$
Citocalasina F	$C_{29}H_{37}O_5N$
Citocalasina H	$C_{30}H_{39}O_5N$
Citocalasina C	$C_{30}H_{37}O_6N$
Citocalasina D	$C_{30}H_{37}O_6N$
Grupo Caetoglobosina	
Caetoglobosina A	$C_{32}H_{36}O_5N_2$
Caetoglobosina B	$C_{32}H_{36}O_5N_2$
Caetoglobosina C	$C_{32}H_{36}O_5N_2$
Caetoglobosina D	$C_{32}H_{36}O_5N_2$
Caetoglobosina E	$C_{32}H_{38}O_5N_2$
Caetoglobosina F	$C_{32}H_{38}O_5N_2$
Caetoglobosina G	$C_{32}H_{36}O_5N_2$
Caetoglobosina J	$C_{32}H_{36}O_4N_2$
Caetoglobosina K	$C_{34}H_{40}O_5N_2$
Deoxaphomin	$C_{29}H_{37}O_4N$
Proxiphomin	$C_{29}H_{37}O_2N$
Protophomin	$C_{29}H_{35}O_3N$
Zygosporin D	$C_{28}H_{35}O_5N$
Zygosporin E	$C_{30}H_{37}O_5N$
Zygosporin F	$C_{32}H_{39}O_7N$
Zygosporin G	$C_{30}H_{37}O_5N$

I.2.7. GRUPO 7: RUBRATOXINAS

Evidencias de observaciones a campo junto a estudios de laboratorio han llevado a implicar a Penicillium rubrum en la etiología de ciertas enfermedades en cerdos y ganado vacuno que habían ingerido maíz enmohecido. Estas investigaciones llevaron rápidamente a los investigadores a aislar e identificar los agentes tóxicos producidos por Penicillium rubrum. Rubratoxina A y B son nonádridas complejas con anillos anhídrido y lactona. La rubratoxina B es más tóxica y se la encuentra con preferencia en los extractos crudos de Penicillium rubrum. En animales de experimentación resultó hepatotóxica y nefrotóxica.

Se han presentado evidencias de que las rubratoxinas pueden ser de capital importancia económica debido a sus efectos sinérgicos con otros metabolitos tóxicos como las aflatoxinas (81) (82) (83) (84).

GRUPO RUBRATOXINAS	FORMULA MOLECULAR
Rubratoxina B	$C_{26}H_{30}O_{11}$
Rubratoxina A	$C_{26}H_{32}O_{11}$

I.2.8. GRUPO 8: TOXINAS TREMORGENICAS

El gran avance en el estudio de las micotoxinas en la década pasada permitió el descubrimiento de metabolitos fúngicos

que son capaces de producir temblores permanentes o intermitentes en animales vertebrados. Antes del descubrimiento de las micotoxinas tremorgénicas pocas sustancias eran capaces de inducir estos efectos.

Estas micotoxinas pueden agruparse según similitud química en 4 grandes grupos: Grupo penitrem, grupo fumitremoginverruculogen, grupo paspalitrem y el grupo tryptoquivaline. Estos compuestos tienen todos en común un indol derivado de un triptofano (85) (86).

Los géneros capaces de producir metabolitos tremorgénicos son: Penicillium, Aspergillus, Claviceps y Neosartoria (87) (88) (89) (90) (91) .

Las estructuras químicas básicas con su estereoquímica han sido elucidadas en todos los grupos, salvo en el grupo penitrem.

Algunos miembros del grupo paspalitrem han sido implicados en la etiología del síndrome "Paspalum stagger". Se ha demostrado que la paspalina y dos metabolitos relacionados, la paspalitrem A y B están presentes en esclerotes de Claviceps paspali en pasturas tóxicas. Verruculogeno y penitrem A aparecen como causantes de temblores por inhibición natural de neuronas, las cuales inhiben las células α motoras (92) (93) (94) .

Se incluyen en este grupo metabolitos químicamente relacionados pero no tremorgénicos, tales como ácido cyclopiazónico, ácido tenuazoico, etc. (95) (96) (97) .

GRUPO: TOXINAS TREMORGENICAS	FORMULA MOLECULAR
<hr/>	
Grupo Fumitremorgin	
Fumitremorgin A	$C_{32}H_{41}O_7N_3$
Fumitremorgin B	$C_{27}H_{33}O_5N_3$
Fumitremorgin C (SM-Q)	$C_{22}H_{25}O_3N_3$
Verruculogen	$C_{27}H_{33}O_7N_3$
15-Acetoxyverruculogen	$C_{29}H_{35}O_9N_3$
TR-2	$C_{22}H_{27}O_6N_3$
Grupo Penitrem	
Penitrem A	$C_{37}H_{44}O_6NCl$
Penitrem B	$C_{37}H_{45}O_5N$
Grupo Paspalitrem	
Paxilline	$C_{27}H_{33}O_4N$
Paspaline	$C_{28}H_{39}O_2N$
Paspalicine	$C_{27}H_{31}O_3N$
Paspalinine	$C_{27}H_{31}O_4N$
Paspalitrem A	$C_{32}H_{39}O_4N$
Paspalitrem B	$C_{32}H_{39}O_5N$
Aflatrem	$C_{32}H_{39}O_4N$
Grupo Tryptoquivaline	
Tryptoquivaline	$C_{29}H_{30}O_7N_4$
Nortryptoquivalone (tryptoquivalone)	$C_{26}H_{24}O_6N_4$
Nortryptoquivaline	$C_{28}H_{28}O_7N_4$
Deoxytryptoquivaline	$C_{29}H_{30}O_6N_4$
Deoxynortryptoquivalone	$C_{26}H_{24}O_5N_4$
Deoxynortryptoquivaline	$C_{28}H_{28}O_6N_4$

GRUPO: TOXINAS TREMORGENICAS

FORMULA MOLECULAR

Tryptoquivaline E	$C_{22}H_{18}O_5N_4$
Tryptoquivaline F	$C_{22}H_{18}O_4N_4$
Tryptoquivaline G	$C_{23}H_{20}O_5N_4$
Tryptoquivaline H	$C_{22}H_{18}O_5N_4$
Tryptoquivaline I	$C_{27}H_{26}O_6N_4$
Tryptoquivaline J	$C_{22}H_{18}O_4N_4$
Tryptoquivaline L	$C_{23}H_{20}O_5N_4$
Tryptoquivaline M	$C_{28}H_{28}O_7N_4$
Tryptoquivaline N	$C_{26}H_{24}O_5N_4$

Metabolitos no tremorgénicos relacionados

Deoxybrevianamide E	$C_{21}H_{25}O_2N_3$
Preechinulín	$C_{19}H_{23}O_2N_3$
Neoechinulín	$C_{23}H_{25}O_3N_3$
Neoechinulín E	$C_{18}H_{17}O_3N_3$
Neoechinulín D	$C_{24}H_{29}O_2N_3$
Cryptoechinulín G	$C_{29}H_{35}O_2N_3$
Neoechinulín A	$C_{19}H_{21}O_2N_3$
Neoechinulín B	$C_{19}H_{19}O_2N_3$
Neoechinulín C	$C_{24}H_{27}O_2N_3$
Isoechinulín A	$C_{24}H_{29}O_2N_3$
Isoechinulín B	$C_{24}H_{27}O_2N_3$
Isoechinulín C	$C_{24}H_{27}O_3N_3$
Cryptoechinulín A	$C_{24}H_{27}O_2N_3$
Echinulín	$C_{29}H_{39}O_2N_3$
Austamide	$C_{21}H_{21}O_3N_3$

GRUPO: TOXINAS TREMORGENICAS FORMULA MOLECULAR

Grupo Acido Tetrámico

Acido Tenuazónico	$C_{10}H_{15}O_3N$
Acido Cyclopiazónico	$C_{20}H_{20}O_3N_2$
Acido Cyclopiazónico-imine	$C_{20}H_{21}O_2N_3$
Acido Bissecodehydrocyclopiazónico	$C_{20}H_{22}O_3N_2$

I.2.9. GRUPO 9: LACTONAS TOXICAS

La característica de las micotoxinas de este grupo es poseer un anillo lactona de cinco miembros (98) (99). Son producidas por varios hongos, principalmente por los géneros Aspergillus y Penicillium (100) (101) (102) (103). El hecho de ser carcinogénicas las convierte en riesgosas para el hombre y los animales, por lo que merecen estudios más profundos. Tanto la patulina como el ácido penicílico se encuentran como contaminantes naturales (104) (105) (106) (107) (108) (109) (110).

GRUPO: LACTONAS

FORMULA MOLECULAR

Patulina	$C_7H_6O_4$
Isopatulina	$C_7H_6O_4$
Ascladiol	$C_7H_8O_4$
Acido Penicílico	$C_8H_{10}O_4$

I.2.10. GRUPO 10: ROQUEFORTINAS

Son alcaloides que resultan de interés como potenciales micotoxinas dado que los hongos que las producen son comúnmente hallados en ensilados fermentados y son usados en la producción de queso roquefort y otros tipos de quesos azules (111) (112).

Roquefortine A y B (isofumigaclavine A y B) son estereoisómeros de fumigaclavine A y B, metabolitos producidos comúnmente por Aspergillus fumigatus. Roquefortine C y los alcaloides no relacionados, fueron hallados naturalmente en quesos azules en 7 países en una concentración de hasta 6,8 ppm.

Fumigaclavines A y C se producen por Aspergillus fumigatus involucrados en un síndrome tóxico por ingesta de ensilados enmohecidos (113) (114) (115) (116).

El grupo de alcaloides llamado rugulovasine son producidos por Penicillium islandicum y Penicillium concavo-rugulosum. Chlororugulovasines A y B son reportados como los primeros alcaloides de la ergolina halogenada que aparecen como contaminantes naturales (117) (118) (119) (120) (121).

GRUPO: ROQUEFORTINAS	FORMULA MOLECULAR
Chlororugulovasine A	$C_{16}H_{15}O_2N_2Cl$
Chlororugulovasine B	$C_{16}H_{15}O_2N_2Cl$
Rugulovasine A	$C_{16}H_{16}O_2N_2$
Rugulovasine B	$C_{16}H_{16}O_2N_2$
Fumigaclavine A (SM-2)	$C_{18}H_{22}O_2N_2$

GRUPO: ROQUEFORTINAS	FORMULA MOLECULAR
Roquefortine A (Isofumigaclavine A)	$C_{18}H_{22}O_2N_2$
Fumigaclavine B	$C_{16}H_{20}ON_2$
Roquefortine B (Isofumigaclavine B)	$C_{16}H_{20}ON_2$
Fumigaclavine C (SM-1)	$C_{23}H_{30}O_2N_2$
Roquefortine o Roquefortine C	$C_{22}H_{23}O_2N_5$

I.2.11. GRUPO 11: EPIPOLITIOPIPERAZINE 3-6-DIONAS

Este grupo de metabolitos de importancia económica son producidos por hongos no relacionados entre sí (Penicillium, Aspergillus, Gliocladium, Hyalodendron, Chaetomium, Arachniotus y Pithomyces). De todos ellos los más importantes son las esporodesminas producidas por Pithomyces chartarum (122) (123).

Las esporodesminas han sido implicadas en la etiología de la eczema facial, enfermedad importante en rumiantes. Estas toxinas han sido muy estudiadas en Nueva Zelanda por ser allí donde prevalece el mal. El hongo que las produce se desarrolla como saprófito en vegetales en descomposición, donde produce una serie de metabolitos relacionados. Esporodesmin B, C, D, F y G. Estos compuestos se caracterizan por poseer una 3,6 epiditía 2-5-dioxopiperazine unida a un endolopirrolopirazina (124) (125) (126).

La gliotoxina fue originalmente conocida por sus propieda--

des antibióticas. Se ha demostrado su toxicidad en animales vertebrados. Chetomin es un compuesto complejo del grupo, que es activo biológicamente contra bacterias gram positivas y virus. Hyalodendrin y los metabolitos relacionados se caracterizan por poseer un núcleo benzyldiketopiperazine. Poseen un amplio espectro antifúngico, pero no se les conoce toxicidad en vertebrados (127) (128).

GRUPO: EPIPOLITIOPIPERAZINE 3-6-DIONAS	FORMULA MOLECULAR
Gliotoxin	$C_{13}H_{14}O_4N_2S_2$
Gliotoxin acetate	$C_{15}H_{16}O_5N_2S_2$
Dehydrogliotoxin	$C_{13}H_{12}O_4N_2S_2$
Hyalodendrin	$C_{14}H_{16}O_3N_2S_2$
Hyalodendrin tetrasulfide	$C_{14}H_{16}O_3N_2S_4$
Bisdethiodi(methylthio)hyalodendrin	$C_{16}H_{22}O_3N_2S_2$
Sporidesmin	$C_{18}H_{20}O_6N_3S_2Cl$
Sporidesmin B	$C_{18}H_{20}O_5N_3S_2Cl$
Sporidesmin C acetate	$C_{22}H_{24}O_8N_3S_3Cl$
Sporidesmin D	$C_{20}H_{26}O_6N_3S_2Cl$
Sporidesmin E	$C_{18}H_{20}O_6N_3S_3Cl$
Sporidesmin F	$C_{19}H_{22}O_6N_3S Cl$
Sporidesmin G	$C_{18}H_{20}O_6N_3S_4Cl$
Sporidesmin H	$C_{18}H_{17}O_4N_3$
Sporidesmin J	$C_{17}H_{18}O_6N_3S_2Cl$
Chaetocin	$C_{30}H_{28}O_6N_6S_4$

GRUPO: EPIPOLITIOPIPERAZINE 3-6-DIONAS	FORMULA MOLECULAR
Chetomin	$C_{31}H_{30}O_6N_6S_4$
Verticillín A	$C_{20}H_{18}O_7N_2S_2$
Aranotín	$C_{22}H_{20}O_8N_2S_2$
Acetylaranotía (LL-S88 α)	$C_{22}H_{20}O_8N_2S_2$
Bisdethiodi(methylthio)acetylaranotín (LL-S88 β)	$C_{24}H_{26}O_8N_2S_2$
Apoaranotín	$C_{20}H_{18}O_6N_2S_2$
Bisdethiodi(methylthio)acetylpoaranotín	$C_{24}H_{26}O_7N_2S_2$

I.2.12. GRUPO 12: TOXINAS DE ALTERNARIA

Las micotoxinas producidas por el género Alternaria no han sido estudiadas exhaustivamente a pesar de ser producidos por un hongo que puede encontrarse contaminando varios productos de la agricultura como ser: trigo, maíz, tabaco, alfalfa, maní, sorgo, avena, centeno y pastos. Además, como crece a bajas temperaturas se ve a menudo implicado en la descomposición de productos refrigerados.

Los estudios realizados hasta la fecha muestran la producción de varios metabolitos tóxicos pertenecientes al menos a 3 clases de grupos químicos. Alternaria es capaz de producir ácido tetrámico y ácido tenuazónico (incluidos en otro grupo en esta clasificación). El segundo grupo de compuestos se caracteriza por poseer un anillo dibenzo [a] pyrone. Entre los metabolitos más estudiados se encuentran el alternariol, al-

ternariol monoetiléter, altenuene, altenuisol e isoaltenuene. El tercer grupo estructural está representado por altertoxín I y II de composición no bien definida (129) (130) (131) (132) (133) (134) (135).

Los metabolitos de Alternaria son altamente tóxicos: presentan actividad citotóxica, mutagénica y teratogénica (136) (137) (138) (139) (140).

GRUPO: TOXINAS DE ALTERNARIA	FORMULA MOLECULAR

Alternariol	$C_{14}H_{10}O_5$
Altenuisol	$C_{14}H_{10}O_6$
Alternariol monomethyl ether	$C_{15}H_{12}O_5$
Altenuene	$C_{15}H_{16}O_6$
Altenusín	$C_{15}H_{14}O_6$
Dehydroaltenusín	$C_{15}H_{12}O_6$
Altertoxín I	$C_{20}H_{16}O_6$
Altertoxín II	$C_{20}H_{14}O_6$

I.2.13. GRUPO 13: ACIDOS SECALONICOS

Son un grupo de metabolitos íntimamente relacionados, que fueron aislados originalmente de esclerotes de Claviceps purpurea y más recientemente de Aspergillus ochraceus (A) y Aspergillus aculeatus (D y F), Pyrenochaeta terrestris (A, B y G) y Penicillium oxalicum (D). Químicamente son dímeros de xautona que poseen idénticos pesos moleculares. El ácido seca

lónico D ha demostrado ser tóxico para el ratón y el ácido secalónico A mostró actividad antibacteriana (141) (142) (143) (144) (145).

GRUPO. ACIDOS SECALONICOS	FORMULA MOLECULAR
Acido Secalónico A	$C_{32}H_{30}O_{14}$
Acido Secalónico B (E)	$C_{32}H_{30}O_{14}$
Acido Secalónico C	$C_{32}H_{30}O_{14}$
Acido Secalónico D	$C_{32}H_{30}O_{14}$
Acido Secalónico F	$C_{32}H_{30}O_{14}$
Acido Secalónico G	$C_{32}H_{30}O_{14}$

I.2.14. GRUPO 14: MALFORMINAS

Son un grupo de metabolitos caracterizados por poseer un ciclo pentapéptidos unido a un puente disulfuro a través de dos residuos de cisteína (146) (147).

Son producidos por hongos pertenecientes al grupo de Aspergillus niger (149) (149). Manifiestan actividad antibiótica, citotoxicidad y producen inhibición en la formación de raíces con la particularidad de ocasionar malformaciones (de allí su nombre) de los tallos y pecíolos en Phaseolus vulgaris y curvaturas en raíces de maíz. Es reciente su consideración como grupo potencial de micotoxinas (150) (151) (152).

GRUPO: MALFORMINAS	FORMULA MOLECULAR
Malformina A ₁	C ₂₃ H ₃₉ O ₅ N ₅ S ₂
Malformina A ₂	C ₂₂ H ₃₇ O ₅ N ₅ S ₂
Malformina B ₁	C ₂₃ H ₃₉ O ₅ N ₅ S ₂
Malformina B ₂	C ₂₂ H ₃₇ O ₅ N ₅ S ₂
Malformina C	C ₂₃ H ₃₉ O ₅ N ₅ S ₂

I.2.15. GRUPO 15: TOXINAS DEL PENICILLIUM ISLANDICUM

El arroz enmohecido con Penicillium islandicum causa hepatotoxicidad aguda y crónica en animales de experimentación. A partir de dicha especie se han aislado e identificado varios metabolitos altamente tóxicos. Estos incluyen pigmentos antraquinóideos, uno no antraquinóideo (pigmento rojo nitrogenado llamado erytroskyrín) y dos ciclos clorados conteniendo pentapéptidos (cycloclorotína e islandítóxín). Los pigmentos antraquinóideos pueden ser agrupados dentro de las antraquinonas monoméricas tales como la emodín, o biantraquinonas tales como luteoskyrína y la rugulosína. Los 2 ciclos clorados conteniendo pentapéptidos exhiben una toxicidad y propiedades químicas muy similares. Sin embargo, se han propuesto para ellos estructuras químicas diferentes. La erytroskyrín puede ser descrita como un anillo β tricetolactámico unido a un anillo bicíclico oxyrane vía un grupo polyene (153) (154) (155) (156) (157) (158).

GRUPO: TOXINA DEL PENICILLIUM ISLANDICUM	FORMULA MOLECULAR
Emodín	$C_{15}H_{10}O_5$
Erytroskyrín	$C_{26}H_{33}O_6N$
Skyrín	$C_{30}H_{18}O_{10}$
Rugulosína	$C_{30}H_{22}O_{10}$
Luteoskyrina	$C_{30}H_{22}O_{12}$
Cycloclorotína	$C_{24}H_{31}O_7N_5Cl_2$
Islanditoxin	$C_{24}H_{31}O_7N_5Cl_2$

I.2.16. GRUPO 16: TOXINAS PRODUCIDAS EN BATATAS

A pesar que los furanosesquiterpenoides tóxicos producidos bajo ciertas condiciones de stress no son micotoxinas en el sentido estricto, R. Cole en su "Handbook of Toxic Fungal Metabolites" (20), los incluye porque la infección de las batatas por Fusarium solani o Ceratocystis fimbriata es probablemente un modo importante de producción.

Químicamente estos compuestos están constituidos por un anillo furano sustituido en la posición 3 con un grupo pentano oxigenado. A pesar de ser relativamente sencillos en la composición química, son toxinas potentes con efectos específicos en hígado o pulmón, causando una atípica neumonía intersticial. Los efectos crónicos se manifiestan como necrosis renal. Estos metabolitos son considerados la causa de los envenenamientos endémicos de ganado ocasionados por la ingestión

de batatas enmohecidas (159) (160) (161).

GRUPO: TOXINAS PRODUCIDAS EN BATATAS	FORMULA MOLECULAR
Ipomeanine	$C_9H_{10}O_3$
l-Ipomeanol	$C_9H_{12}O_3$
4-Ipomeanol	$C_9H_{12}O_3$
1,4-Ipomeadiol	$C_9H_{14}O_3$
Ipomeamaronol	$C_{15}H_{22}O_4$
Ipomeamarone	$C_{15}H_{22}O_3$
Dehydroipomeamarone	$C_{15}H_{20}O_3$
4-Hydroxymyoporone	$C_{15}H_{22}O_4$

I.2.17. GRUPO 17: GRUPO VIRIDIOL

En 1966 se demostró la producción de viridín, con fuerte propiedad antifúngica, por parte de Gliocladium virens. Con posterioridad se aisló e identificó el viridiol, que es una forma reducida del viridín. No se conocen datos biológicos de los mismos. Más recientemente fueron aislados e identificados por cristalografía de rayos X la forma demetoxo de ambos metabolitos. El demethoxyviridiol y el demethoxyviridín son tóxicos para los animales vertebrados. Estos metabolitos son esteroides modificados (20).

GRUPO: VIRIDIOL	FORMULA MOLECULAR
Demethoxyviridín	$C_{19}H_{14}O_5$
Demethoxyviridiol	$C_{19}H_{16}O_5$
Viridín	$C_{20}H_{16}O_6$
Viridiol	$C_{20}H_{18}O_6$

I.2.18. GRUPO 18: TOXINAS DE ASPERGILLUS

Este grupo está constituido por una amplia variedad de metabolitos cuya única particularidad es la de ser producidos fundamentalmente por el género Aspergillus. Dadas las diferencias químicas se observan también efectos biológicos muy diversos (162) (163) (164) (165) (166) (167).

GRUPO: TOXINAS DE ASPERGILLUS	FORMULA MOLECULAR
Ácido β -nitropropiónico	$C_3H_5O_4N$
Ácido kójico	$C_6H_6O_4$
Ácido terreico	$C_7H_6O_4$
Terreín	$C_8H_{10}O_3$
Fumigatín	$C_8H_8O_4$
Spinulosín	$C_8H_8O_5$
Maltoryzine	$C_{11}H_{12}O_4$

GRUPO: TOXINAS DE ASPERGILLUS	FORMULA MOLECULAR
Austidiol	$C_{12}H_{12}O_5$
Ácido aspergíllico	$C_{12}H_{20}O_2N_2$
Nigragillín	$C_{13}H_{22}ON_2$
Austín	$C_{27}H_{32}O_9$
Ácido helvólico	$C_{33}H_{44}O_8$
Fumagillín	$C_{26}H_{34}O_7$
Xanthomegnín	$C_{30}H_{22}O_{12}$
Viomelleín	$C_{30}H_{24}O_{11}$
Rubrosulphín	$C_{29}H_{20}O_{10}$
Viopurpurín	$C_{29}H_{20}O_{11}$

I.2.19. GRUPO 19: TOXINAS DE PENICILLIUM

Un gran número de especies del género Penicillium son conocidas por producir metabolitos tóxicos. A pesar de que muchos de ellos pueden ser producidos por otros géneros, se encuentran agrupados como toxinas de Penicillium dado que, o bien fueron aisladas inicialmente a partir de Penicillium, o por ser su principal género productor. Entre los principales metabolitos del grupo se encuentra la citrínina producida fundamentalmente por Penicillium citrinum siendo los efectos más característicos de la toxina los síndromes renales observados en cerdos (168) (169) (170) (171) (172) (173) (174).

Otro de los metabolitos importantes es el ácido Mycofenólico producido fundamentalmente por Penicillium brevis-compac-

tum. Posee actividad antibiótica (antibacteriana y antiviral). Suministrado a monos resus produce cólicos abdominales, heces sanguinolentas y pérdida de peso (175) (176) (177) (178).

La PR toxina es producida por Penicillium roqueforti. Se ha demostrado en células hepáticas que este metabolito inhibe tanto la iniciación como la elongación de la cadena polinucleotida (179) (180) (181).

Los metabolitos eremofortins y citreoviridin han sido objeto de varias investigaciones (182) (183) (184) (185) (186) (187) (188).

GRUPO: TOXINAS DE PENICILLIUM	FORMULA MOLECULAR
Citrinina	$C_{13}H_{14}O_5$
Oosporein	$C_{14}H_{10}O_8$
Viridicatin	$C_{15}H_{11}O_2N$
Verruculotoxin	$C_{15}H_{20}ON_2$
Decumbin	$C_{16}H_{24}O_4$
Cycloopenin	$C_{17}H_{14}O_3N_2$
Cycloopenol	$C_{17}H_{14}O_4N_2$
Griseofulvin	$C_{17}H_{17}O_6Cl$
Dechlorogriseofulvin	$C_{17}H_{18}O_6$
Acido Mycofenólico	$C_{17}H_{20}O_6$
Toxina PR	$C_{17}H_{20}O_6$
Eremofortin A	$C_{17}H_{22}O_5$
Eremofortin B	$C_{15}H_{20}O_3$

GRUPO: TOXINAS DE PENICILLIUM	FORMULA MOLECULAR
Eremofortín C	$C_{17}H_{22}O_6$
Citreoviridín	$C_{23}H_{30}O_6$
Viridicatuntoxín	$C_{30}H_{31}O_{10}N$
Viriditoxín	$C_{34}H_{30}O_{14}$

I.2.20. GRUPO 20: TOXINAS DE FUSARIUM

Se agrupan aquí 3 metabolitos no relacionados químicamente que son producidos por especies de Fusarium que frecuentemente invaden y colonizan granos y alimentos de gran importancia económica. Representan además un peligro potencial contra la salud animal por ingesta de esos alimentos.

La toxina más importante del grupo es la zearalenona. Desde hace mucho tiempo se ha observado un síndrome estrogénico en cerdas, asociadas con el uso de raciones contaminadas con esta micotoxina. La enfermedad se caracteriza por una vulvovaginitis y prolapso de útero y recto. En cerdas prepúberes se presenta tumefacción de la vulva, aumento de tamaño de las glándulas mamarias y pezones e hipoplasia de ovarios. Se han informado casos de fertilidad reducida en vacas a juzgar por un aumento en el índice de inseminación artificial asociados con el consumo de heno contaminado con zearalenona. En ratas se han observado efectos carcinogénicos y teratogénicos. En la literatura se encuentran referencias de casos de hiperestro

genismo humano, que hipotéticamente han sido atribuidos a zearalenona. Entre 1978 y 1981 se produjo un notable aumento en la incidencia de desarrollo sexual precoz en niñas de Puerto Rico, que por sus características se pensó podrían haber sido causadas por esta micotoxina. Se observó también una inusual incidencia de desarrollo mamario en varones jóvenes, que fuera informada en Italia en 1978. (18) (190) (191) (192)

La moniliformina es una ciclobutenediona soluble en agua que manifiesta sólo toxicidad aguda en animales de experimentación (193) (194)

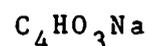
En cuanto a la butenolida, este metabolito ha sido implicado en la etiología de la enfermedad llamada "pie de festuca" (20) .

GRUPO: TOXINAS DE FUSARIUM

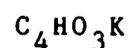
FORMULA MOLECULAR

Moniliformina

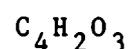
Sal sódica



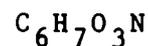
Sal potásica



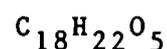
Acido libre



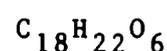
Butenolida



(S)-Zearalenona



8'-Hydroxyzearalenona



I.2.21. GRUPO 21: TOXINAS MISCELANEAS

En este último grupo se han reunido 3 metabolitos que no

poseen relación química ni biogénica.

Slaframine producida por Rhizoctonia leguminicola es causante de salivación excesiva en rumiantes y prolongada estimulación de la secreción pancreática.

Roseotoxin B es producida por Trichothecium roseum que ocasiona temblores, hipermotilidad, incoordinación y convulsiones en ratón. Es un pentapéptido relacionado con las toxinas de insectos llamadas destruxins.

Díplodiatoxin es producida por Diplodia maydis (20).

GRUPO: MISCELANEAS	FORMULA MOLECULAR
Slaframine	$C_{10}H_{18}O_2N_2$
Díplodiatoxin	$C_{18}H_{28}O_4$
Roseotoxin B	$C_{30}H_{49}O_7N_5$

Se incluyen en este grupo aquellos metabolitos no considerados en el "Handbook of Toxic Fungal Metabolites" y aquellos descubiertos con posterioridad.

Los Psoralenos: Son un grupo de furocumarinas que contienen un anillo furano unido por la posición 2,3 a una estructura cumarina en la posición C₆ y C₇. Se han aislado más de 30 derivados de los psoralenos a partir de plantas, flores, semillas y frutas.

Algunos de ellos son producidos por Sclerotia sclerotiorum cuando coloniza plantas de apio. No se han aislado psora-

lenos cuando el hongo crece en otros vegetales. Estos metabolitos producen dermatitis en operarios de granja que trabajan con plantas de apio infectado. Se han constatado efectos antibacterianos y citotóxicos. Son además mutagénicos y carcinogénicos (195).

Los Territrems: Son metabolitos producidos por Aspergillus terreus. Se conocen 2 compuestos: territrem A cuya fórmula es $C_{28}H_{30}O_9$ y territrem B, $C_{29}H_{34}O_9$. Ambos producen temblores y convulsiones en ratón por administración intraperitoneal. Tienen la particularidad de no poseer nitrógeno en su molécula. Esto los diferencia de los otros metabolitos tremorgénicos (196).

Mollicellinas: Grupo de metabolitos producidos por Chaetomium mollicellum. Son policétidos conocidos por ser sintetizados por líquenes. De 18 compuestos que componen el grupo, 2 son mutagénicos y su característica es poseer un grupo ácido 3-metilbutenoico (197).

Phomopsinas: Se conocen 2 metabolitos A y B aislados de lupines infectados con Phomopsis leptostromiformis. En Sudáfrica se los conoce por ocasionar enfermedades en ovinos que ingieren lupines (Lupinosis) y en ovejas ocasiona lesiones hepáticas (198).

Fumonisinas: Son producidos por Fusarium moniliforme. Son compuestos que producen cáncer hepático en ratas, y leucoencefalomalacia en caballos (199).

Rhizonin: Es una micotoxina producida por Rhizopus microsporus que ha sido recientemente identificada por P. Steyn (200).

Lumbucinol, sombucoín y apotricotecenos: Son metabolitos secundarios producidos en concentraciones bajas por Fusarium crookwell, Fusarium culmorum, Fusarium sporotrichioides. Son 3-hydroxiapotricotec 9-ene (201).

Toxina hemorrágica H₁: Llamada también wortmannin por ser producida por Penicillium wortmannii. Es producida también por ciertas especies de Fusarium y Myrothecium. La producción de esta toxina hemorrágica está asociada con climas fríos, como Noruega, Alaska y Nueva Zelandia (202).

Fumitoxins: Grupo de metabolitos producidos por Aspergillus fumigatus (A, B, C y D).

Fumitoxin A es el compuesto más importante y posee una fórmula molecular C₃₁H₄₂O₈. Estas micotoxinas resultaron letales en embrión de pollo (203).

Marasas y col. (204) en "Toxigenic Fusarium Species" incluyen nuevos metabolitos tóxicos producidos por especies del género Fusarium pero no describen con precisión sus características químicas y toxicológicas. Son citadas en esta recopilación bibliográfica las siguientes micotoxinas:

- 4 Acetoamido 2 - Ácido butenoico
- 2 Acetilquinazolin 4 (3H)-one
- Culmorin
- Peptido Cíclico o "Sweelling Factor"
- Monocerins
- Equisetin
- Fusarioterpenoides
- Fusarins
- Fusariocins

- Fusarentin
- Gibberellins
- Toxina T-1
- Toxina NT-1
- Toxina NT-2
- Poaefusarin
- Poaefusariogenin
- Poin
- Toxina Td
- Sporofusarin
- Sporofusariogenin

I.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE HONGOS TOXICOGENICOS Y LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS

La producción de micotoxinas está condicionada tanto por el genotipo del microorganismo productor, como por el sustrato y el medio ambiente en el cual está creciendo (205).

Analizaremos por separado la contribución de factores tales como el potencial toxicogénico de la cepa fúngica, la disponibilidad de nutrientes y ciertos parámetros ambientales como la temperatura y la actividad de agua. Es sumamente importante tener en cuenta la interacción entre estos parámetros, que en la naturaleza se combinan para determinar el tipo y cantidad de micotoxina que se va a sintetizar.

I.3.1. MICROORGANISMO:

La capacidad de producir una micotoxina no depende sólo de la especie fúngica, sino también de la cepa. Los aislamientos de una misma especie pueden diferir en el tipo y cantidad de micotoxinas producidas.

En el caso de las aflatoxinas producidas por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus existen en ambas especies cepas no toxicogénicas. Las cepas de Aspergillus parasiticus más frecuentemente aisladas de semillas de oleaginosas, como por ejemplo maní, son potentes productoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en tanto que Aspergillus flavus, más común en cereales, usualmente produce sólo aflatoxinas B₁ y B₂. La cantí

dad y proporción relativa de aflatoxinas producidas también varía notablemente para los diferentes aislamientos.

Variaciones similares se han observado para otros hongos toxicogénicos (Tabla 1) (205).

Tabla 1: Incidencia de cepas toxicogénicas de diferentes especies de hongos.

<u>Especies</u>	<u>Toxinas</u>	<u>N° de aislados</u>	<u>% de cepas toxicogénicas</u>
<u>Aspergillus flavus</u>	aflatoxinas	3460	74.4
<u>A. ochraceus</u>	ocratoxina	77	16.9
<u>A. ochraceus</u>	ácido penicílico	17	52.9
<u>Penicillium viridicatum</u>	ocratoxina	83	61.4
<u>P. viridicatum</u>	citrinina	98	45.9
<u>P. aurantiogriseum</u>	ácido penicílico	67	80.6
<u>P. aurantiogriseum</u>	tremorgenos (bioensayo)	27	14.3
<u>P. crustosum</u>	tremorgenos (bioensayo)	15	86.7
<u>F. culmorum</u>	zearalenona	434	62.9
<u>F. graminearum</u>	zearalenona	29	93.1
<u>F. sporotrichioides</u>	bioensayo	65	93.8
<u>F. poae</u>	bioensayo	63	96.8
<u>Alternaria alternata</u>	bioensayo	381	8.1
<u>Stachybotrys alternans</u>	bioensayo	72	66.7

La proporción de aislamientos capaces de producir una determinada micotoxina puede también variar según el sustrato

del cual fueron aisladas, según el área geográfica o la época del año.

I.3.2. FACTORES NUTRICIONALES

Aún cuando una cepa fúngica tenga genéticamente la capacidad para sintetizar una micotoxina, la cantidad dependerá de la disponibilidad de nutrientes en el sustrato (206). Durante la fase activa de crecimiento de un microorganismo en cultivos de laboratorio se produce muy poca cantidad de micotoxina. La biosíntesis del metabolito secundario ocurre principalmente cuando se ha alcanzado la fase estacionaria, en la que el crecimiento se ve limitado por el agotamiento de algún nutriente (Fig. 1).

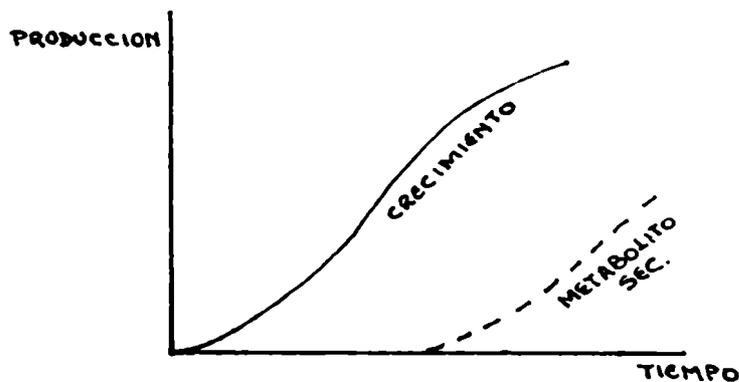


Figura 1: Relación entre crecimiento y metabolismo secundario.

Los sustratos naturales difieren en su capacidad para estimular la biosíntesis de Micotoxinas. Por ejemplo en un estudio con Aspergillus parasiticus, el maíz resultó ser el mejor sustrato, siguiéndole en orden de importancia el arroz y lue-

go el sorgo (207). Lo mismo ocurre con zearalenona, para la cual uno de los mejores sustratos es el arroz, en tanto que se producen muy pequeñas cantidades o no se produce en cebada, avena y soja.

En el caso de hongos capaces de producir más de una micotoxina, la composición del sustrato también influye sobre las cantidades relativas de las toxinas producidas.

I.3.3. FACTORES AMBIENTALES:

Aún cuando el microorganismo disponga de todos los requerimientos nutricionales, su crecimiento y la biosíntesis de micotoxinas se verán notoriamente afectados por parámetros ambientales, entre los cuales los más importantes son la temperatura y la actividad de agua (a_w). Este último parámetro reemplaza actualmente al contenido de humedad, como una expresión más útil de la disponibilidad de agua para el desarrollo de microorganismos.

Las condiciones para la producción de micotoxinas son siempre más restringidas que aquellas que permiten el crecimiento del hongo. La a_w mínima de crecimiento generalmente es menor que la a_w mínima para la producción de micotoxinas. En muchos casos la producción de la toxina ocurre solamente en un rango de actividad de agua considerablemente más alta que las requeridas para el crecimiento y en un rango de temperatura más estrecho, tal como se muestra en la Figura 2 para la producción de aflatoxinas por Aspergillus flavus.

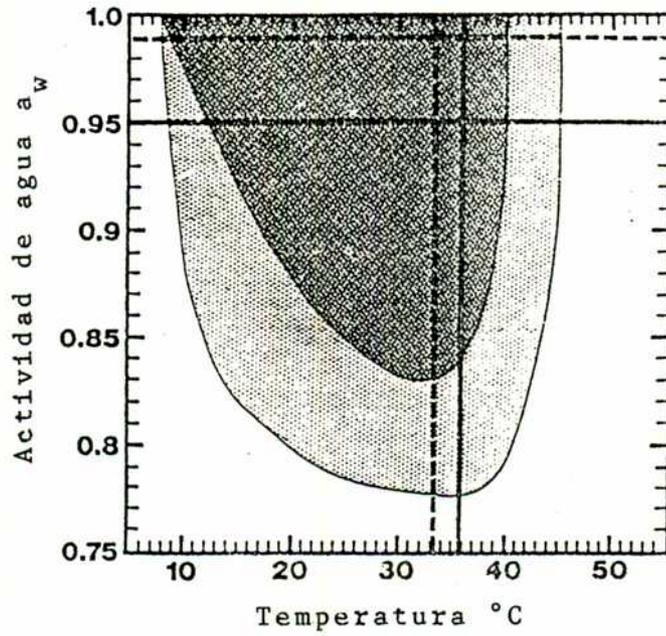


Figura 2.

Otra observación general es que existe una marcada interacción entre la actividad de agua y la temperatura, ejemplificada en los siguientes datos obtenidos para la biosíntesis de patulina por *Byssochlamys nivea* en jugo de manzana (Tabla 2) (208).

Tabla 2: Influencia de la temperatura y a_w sobre el crecimiento y producción de patulina por *Byssochlamys nivea*.

	Mínima a_w a		
	21°C	30°C	37°C
Crecimiento	0,915	0.886	0.871
Patulina	0.978	0.968	0.959

Los datos referidos a valores óptimos y limitantes de temperatura y actividad acuosa no han sido aún evaluados para todas las micotoxinas de importancia en los alimentos. Es difícil comparar resultados obtenidos en diferentes laboratorios, porque esos valores dependen de la cepa y el sustrato empleados, de las condiciones de cultivo (luz, O_2 , pH, etc.) y también de los procedimientos analíticos. Algunos de los valores que se encuentran en la bibliografía se han reunido en la Tabla 3 (204).

En el caso de los hongos del grupo Aspergillus flavus, la temperatura óptima de crecimiento es aproximadamente $37^\circ C$, pero la máxima acumulación de aflatoxinas tiene lugar en el rango entre $25^\circ C$ y $30^\circ C$. La presencia de estos metabolitos en los alimentos constituye un problema importante en países de clima tropical y subtropical, aunque también se los ha detectado en zonas de clima templado. Con temperaturas más bajas y alta humedad relativa de la atmósfera se favorecerán las toxinas de Fusarium, tal como la zearalenona.

Cuando los hongos son capaces de sintetizar más de una micotoxina, las condiciones ambientales también influyen sobre el tipo y cantidad de metabolito producidos. Por ejemplo, F. tricinctum produce diacetoxiscirpenol (DAS) y toxina T-2 a $8^\circ C$, mientras que a $25^\circ C$ sintetiza preponderantemente HT-2.

Tabla 3: Influencia de la temperatura (T) y la actividad de agua (a_w) en el crecimiento de hongos toxicogénicos y producción de algunas micotoxinas "in vitro".

	T ópt.	Rango de T	a_w ópt.	a_w límite	Referencia
Aspergillus flavus	37°C	7-44°C	0,98	0,78	Diener y Davis (209)
Aflatoxina	25-30°C	14-40°C	0,98	0,85	
Fusarium roseum	25°C				Eugenio y col. (210)
Zearalenona	25°C				
Zearalenona (F.graminearum)	25°C		0,97	0,90	Montani y col. (211)
Penicillium expansum	24°C	0-31°C	0,99	0,85	Northolt y col. (212)
Patulina	16°C	0-24°C	0,99	0,95	
Aspergillus ochraceus	30°C	8-37°C	0,99	0,76	Northolt y col. (213)
Ocratoxina	31°C	12-37°C	0,99	0,85	
Penicillium viridicatum	24°C	0-31°C	0,97	0,86	Northolt y col. (213)
Ocratoxina	24°C	4-31°C	0,97	0,90	
Penicillium cyclopium	24°C	4-31°C	0,97	0,87	Northolt y col. (214)
Acido penicilico	24°C	4-31°C	0,97	0,95	
Alternaria alternata	25°C		0,98	0,88	Magan y Lacey (215)
Altenuene-Alternariol	25°C	5-30 C	0,98	0,90	

Los valores de a_w limitantes para la producción de patulina son relativamente altos, lo cual explica que esta toxina se encuentra en frutas (principalmente manzanas) y jugos de frutas, pero no en quesos duros ni en pan, donde sólo se la ha detectado ocasionalmente aunque los hongos capaces de producirla puedan proliferar en estos productos.

La temperatura óptima para la producción de ocratoxina A es más alta para Aspergillus ochraceus (31°C) que para Penicillium viridicatum (24°C), aunque el rango de a_w es similar para ambos mohos. Penicillium viridicatum es generalmente el microorganismo responsable de la contaminación con ocratoxina A de los alimentos en los países de bajas temperaturas. Algunas cepas producen simultáneamente ocratoxina A y citrinina (216).

En condiciones naturales, otros factores, además de los ya considerados interactúan sobre el crecimiento y metabolismo de los mohos. Entre ellos deben citarse la interacción con otros microorganismos, la presencia de agentes antimicrobianos, la acción de otros entes biológicos tales como insectos y roedores, etc. También el genoma de la planta influye sobre la cantidad de micotoxinas que pueden ser producidas por un hongo que ha colonizado exitosamente el sustrato en la etapa pre- o post-cosecha. La búsqueda de híbridos o variedades resistentes ha sido considerada como un posible mecanismo de control de la formación de aflatoxinas en cultivos tales como maíz, maní y soja.

I.4. UTILIZACION DE BIOENSAYOS PARA LA DETECCION DE MICOTOXINAS Y HONGOS TOXICOGENICOS

En los últimos años tanto la agricultura como la industria de los alimentos se ha visto necesitada de monitorear la contaminación de micotoxinas en alimentos para consumo humano y animal.

El desarrollo de ensayos sensibles, rápidos y reproducibles para la detección de estos metabolitos fúngicos es un prerrequisito esencial para su uso en estudios de incidencia de micotoxinas en alimentos.

Los ensayos basados en una acción biológica (bioensayo) ofrecen la posibilidad de "screening" tanto para micotoxinas conocidas como no conocidas y pueden ser utilizados para confirmar la presencia de una toxina detectada por un método químico (217).

Selectividad y sensibilidad

Pocos bioensayos son capaces de detectar un amplio rango de micotoxinas (más de 10); es por eso que se aconseja el empleo de más de un bioensayo y en paralelo (218).

Por otra parte los límites de detección varían en un amplio rango, por ejemplo, para una misma micotoxina (la aflatoxina B₁) el límite de detección está en el orden de los nanogramos en el bioensayo con embrión de pollo y en el orden de los miligramos con fibroblastos humanos.

Además un mismo bioensayo por ejemplo: embrión de pollo,

es sensible a la toxina T2 y al DAS frente a $0,01 \mu\text{g}$ mientras que se necesitan $100 \mu\text{g}$ de griseofulvina para tener una respuesta biológica (219).

Algunos ensayos no son suficientemente sensibles para garantizar su uso como método de "screening" ni como prueba confirmatoria, mientras que otros son tan sensibles o más aún que los métodos químicos. Por ejemplo el bioensayo con embrión de pollo resulta ser uno de los ensayos más sensibles al DAS (220) (221).

Interferencias

Los ácidos, en particular el ácido linoléico, suele dar falsos positivos en el bioensayo con Artemia salina (222).

Existen también evidencias que los ácidos grasos inducen falsos positivos en los bioensayos con reticulocitos de conejo y en Tetrahymena Pyriformis (223).

Estos ácidos son encontrados en concentraciones inhibitorias en extractos fúngicos clorofórmicos (221).

Algunos solventes utilizados en la extracción de las micotoxinas afectan los resultados de los bioensayos (224).

Se sabe también que algunos animales y cultivos de tejidos (cuando son usados como bioensayos) pueden dar falsos positivos debido a las toxinas de origen bacteriano o de plantas superiores. Por otra parte mutagénicos de origen no fúngico pueden interferir en los bioensayos. No hay otros datos disponibles sobre la interferencia de componentes de extractos de alimentos en la determinación de micotoxinas cuando se usan bioensayos.

La mayoría de los trabajos de investigación consiste en estudios realizados con bioensayos con toxinas puras. Se conoce poco sobre si la sensibilidad es aumentada o disminuida por la acción conjunta de distintas micotoxinas y la interacción micotoxinas y otros metabolitos.

Importancia de los bioensayos

El mayor valor de estos ensayos consiste en la identificación inicial y el aislamiento de nuevas micotoxinas.

Por otra parte los ensayos biológicos son más adecuados para monitorear la desaparición o aparición de sustancias tóxicas (provenientes de materias contaminadas) debidas a transformaciones originadas por un proceso tecnológico.

Organismos utilizados para la detección de micotoxinas

Se han utilizado numerosos microorganismos, animales (tanto acuáticos como terrestres), plantas y cultivos de órganos y tejidos, en la detección de micotoxinas. Se citan a continuación algunos de los más importantes.

Microorganismos:

Bacillus thuringiensis (225)

B. subtilis (226) (227)

B. Stearothermophilus (228)

B. cereus mycoides (229)

B. megaterium (230)

B. brevis (231)

Escherichia coli (232)

Photobacterium phosphoreum (233)

Salmonella thyphimurium (234)

Candida albicans (235)

Histoplasma capsulatum (235)

Rhodotorula rubra (235)

Saccharomyces cerevisiae (236)

Aspergillus nidulans (237)

Neurospora crassa (237)

Tetrahynema pyriformis (238)

Euglena gracilis (239)

Chlorella spp (239)

Colpidium campylum (240)

Animales acuáticos:

Artemia salina (241)

Truchas (242)

Larvas y Pez Cebra (243)

Animales terrestres:

Embrión de pollo (244)

Larva de gusano de seda (245)

Patitos (246)

Pollos (247)

Piel de animales de laboratorio (248)

Rata, Ratón (249) (250)

Cultivo de órganos y tejidos:

Células Hela (251)

Carioblastos humanos (252)

Fibroblastos humanos (253)

Células de riñón, hígado y músculo de Rata (254)

Reticulocitos de Conejo (255)

Plantas:

Semillas (256)

Polen (257)

Plantas jóvenes (258)

I.4.1. BIOENSAYO UTILIZANDO BACILLUS THURINGIENSIS

Varias especies del género Bacillus han sido utilizadas como organismos de bioensayo para la detección de micotoxinas: B. megaterium (259), B. stearothermophilus (228) y B. thuringiensis (260) para la detección de aflatoxinas; B. subtilis (261) y B. thuringiensis (262) para la detección de patulina y ácido penicílico; B. cereus var. mycoides (229) para la detección de ocratoxinas; B. stearothermophilus (263) para la detección de roquefortina.

En un trabajo más reciente, Boutibonnes y col. (225) encontraron que 40 metabolitos fúngicos ejercían toxicidad frente a una cepa de B. thuringiensis y elaboraron un bioensayo que permite la detección de los mismos basándose en el método de difusión en agar utilizado para el dosaje de antibióticos.

La evaluación de la respuesta del microorganismo del bioensayo frente a las micotoxinas, se lleva a cabo teniendo en

cuenta dos criterios: 1) la inhibición celular del bacilo como consecuencia directa del efecto antibacteriano de las mismas y 2) la elongación celular de los bacilos ocasionada por concentraciones subletales de las micotoxinas. Estos compuestos ejercen una perturbación en la replicación del ADN, resultando una división celular defectuosa, dando lugar a la aparición de células bacterianas filamentosas. Distintos agentes genotóxicos ejercen este tipo de acción, entre ellos las aflatoxinas (225) y la zearalenona. (264)

En nuestro laboratorio hemos estudiado la respuesta de 2 cepas de Bacillus frente a extractos de hongos productores de micotoxinas.

En la Tabla 4 se observa la actividad antibacteriana y la elongación celular de los diferentes extractos fúngicos frente a B. megaterium y B. thuringiensis serotipo 1 (265).

Tabla 4: Actividad antibacteriana y elongación celular de diferentes extractos fúngicos frente a *B. megaterium* y *B. thuringiensis* serotipo I

Hongo	Toxina(s) que produce	Ensayo con <i>B. megaterium</i>		Ensayo con <i>B. thuringiensis</i>	
		D.Z.I (a)	L.C. (b)	D.Z.I (a)	L.C. (b)
		mm	µm	mm	µm
<i>A. flavus</i> Link 8991	aflatoxinas B ₁ , B ₂ y G ₁	21,0 ± 0,4	3,8 ± 1,0	23,9 ± 0,8	21,0 ± 8,5
<i>A. parasiticus</i> 3145	aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	12,0 ± 0,9	4,5 ± 0,9	14,9 ± 0,8	5,5 ± 6,3
<i>A. versicolor</i> MP 536,3	esterigmatocístina	12,5 ± 0,5	2,9 ± 0,7	21,3 ± 1,8	9,7 ± 4,4
<i>A. terreus</i>	citrinina y patulina	19,5 ± 0,5	3,2 ± 0,4	23,4 ± 0,5	11,9 ± 4,3
<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	ochratoxina A	29,2 ± 0,8	5,1 ± 0,7	29,9 ± 1,2	17,3 ± 8,9
<i>P. viridicatum</i>	ochratoxina A	11,1 ± 0,5	3,6 ± 0,6	13,4 ± 1,3	9,0 ± 2,7
<i>P. citrinum</i>	citrinina	7,6 ± 0,4	3,0 ± 0,9	13,4 ± 0,4	7,7 ± 2,2
<i>P. cyclopium</i>	patulina	15,6 ± 0,4	3,2 ± 0,5	19,6 ± 0,3	11,4 ± 3,0
<i>F. poae</i> T746	toxina T-2 DAS, neosolaniol y butenolida	10,8 ± 0,6	2,8 ± 0,8	12,5 ± 0	8,9 ± 5,0

Hongo	Toxina(s) que produce	Ensayo con B. megaterium		Ensayo con B. thuringiensis	
		D.Z.I (a)	L.C. (b)	D.Z.I (a)	L.C. (b)
		mm	um	mm	um
F. melanochlorum T 80.3	toxina acetil T-2	17,8 ± 0,8	3,5 ± 0,5	20,1 ± 1,3	10,0 ± 3,4
F. tricinctum ATCC 24631	toxina T-2, HT-2, DAS y neosolarinol	9,6 ± 0,7	3,0 ± 0,7	12,5 ± 0,4	5,2 ± 2,9
F. graminearum NRRL 6101	zearalenona y vomitoxina	11,0 ± 0,5	4,5 ± 0,7	20,0 ± 1,0	14,8 ± 5,9
F. graminearum NRRL 6207	zearalenona y vomitoxina	11,6 ± 0,4	4,9 ± 0,8	22,9 ± 2,6	15,9 ± 6,9
acetona-agua (80:20,v/v)		N.I. (c)	2,8 ± 0,8	N.I. (c)	3,1 ± 0,7

(a) D.Z.I. : Diámetro de la zona de inhibición en mm.

(b) L.C. : Longitud celular en um.

(c) N.I. : No inhibición.

B. Thuringiensis serotipo 1 presentó halos de inhibición frente a todos los extractos fúngicos ensayados. Dichos halos resultaron mayores para extractos conteniendo ocratoxina A, aflatoxinas, citrinina y patulina, zearalenona y vomitoxina. Debe tenerse en cuenta que estas observaciones corresponden a

análisis cualitativos, ya que no fueron cuantificadas las toxinas presentes en los extractos.

La mayoría de los extractos analizados frente a B. megaterium dieron halos menores que para B. thuringiensis serotipo 1. La diferencia de mayor importancia entre ambas cepas es la presencia de elongación celular en B. thuringiensis serotipo 1 en respuesta a la acción genotóxica de ciertas micotoxinas, no observadas o prácticamente nula en B. megaterium. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa la conveniencia del empleo de B. thuringiensis serotipo 1 para la detección de hongos productores de aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona y patulina conjuntamente con citrinina. Por otra parte este bioensayo constituye una prueba preliminar importante para la detección de metabolitos fúngicos genotóxicos.

1.4.2. BIOENSAYO UTILIZANDO LEPIDIUM SATIVUM

Payen (256) estudió la acción que ejercen los tricotecenos y otras sustancias con propiedades antimitóticas en semillas de Lepidium sativum. Demostró que tanto los tricotecenos como los otros antimitóticos ejercen poca o ninguna acción sobre el crecimiento del embrión pero inhiben fuertemente el desarrollo de la radícula. Por otra parte De Pauli (266) en su tesis doctoral demuestra que la toxina T2 en concentraciones ligeramente superiores a $1 \mu\text{g/ml}$ inhibe (en semillas de Pisum sativum) la hidrólisis del almidón, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, como así también la síntesis de ARN y ADN y que además lesiona el hipocótilo e inhibe el crecimiento de

la radícula, concordando esta observación con lo publicado por Payen (256).

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto un bioensayo utilizando Lepidium sativum. Para ello se emplearon 6 cepas de Fusarium toxicogénicas y 6 no toxicogénicas. Todas las cepas productoras de tricotecenos dieron respuestas toxicológicas positivas, siendo la semilla sensible a los nanogramos de toxina T2 (267). Los resultados se observan en la Tabla 5.

Tabla 5: Grados de toxicidad y producción de tricotecenos en diversas especies de Fusarium.

Cepa N°	Especie (a)	Grado de Toxicidad	Producción de Tricotecenos en Medio BL ₂ (b)
T 4-210	<i>Fusarium graminearum</i>	4	Toxina T-2 (2 μ g/ml)
T 8099-1	<i>Fusarium sambucinum</i> var <i>trichothecioides</i>	4	Diacetoxiscirpenol (300 μ g/ml), neosolaníol (8 μ g/ml)
T 10-8	<i>Fusarium</i> sp.	4	Toxina acetil T-2 (no cuantificada)
T 4-410	<i>Fusarium culmorum</i>	4	Toxina T-2 (1,6 μ g/ml), neosolaníol (0,5 μ g/ml)
T 80-3	<i>Fusarium melanochlorum</i>	3	Toxina acetil T-2 (no cuantificada)
T 3-41	<i>Fusarium culmorum</i>	3	Toxina T-2 (1,2 μ g/ml)
H 30-2	<i>Fusarium sambucinum</i> var <i>coeruleum</i>	1	No produce
H 11-2	<i>Fusarium tricinctum</i>	1	No produce

Cepa N°	Especie (a)	Grado de Toxicidad	Producción de Tricotecenos en Medio BL ₂ (b)
H 11-1	Fusarium lateritium	1	No produce
T 13-1	Fusarium sp.	1	No produce
T 14-2	Fusarium sp.	1	No produce
T 24-4	Fusarium sp.	1	No produce

Referencias: (a) Las cepas fueron clasificadas taxonómicamente según la clave propuesta por Joffe

(b) Las determinaciones de capacidad productora de tricotecenos fueron realizadas en la Unité de Recherche de Toxicologie Alimentaire, I.N.S.E.R.M , Francia.

I.4.3. ENSAYO REC: BIOENSAYO PARA LA DETECCION DE TOXINAS QUE LESIONAN EL ADN CELULAR

Ciertas micotoxinas provocan cáncer dañando el ADN, material hereditario de la célula. La lesión inicia un complejo proceso celular, que, en las células de los mamíferos, puede conducir con el tiempo a un estado canceroso. Los agentes que lesionan el ADN son por lo tanto cancerígenos en potencia. Tanto las lesiones del ADN como los procesos celulares de reparación son notablemente similares en las bacterias y las células humanas. Esta es la justificación teórica que permite sustituir las células de mamíferos por bacterias en el estudio de lesiones del ADN. La justificación teórica se apoya en resultados experimentales y prácticos: los ensayos bacterianos distinguen entre sustancias cancerígenas y no cancerígenas,

ya conocidos, con una fiabilidad de más del 90 % y han identificado como cancerígenos potenciales productos químicos nuevos, que posteriormente han demostrado su naturaleza cancerígena en pruebas con animales. Naturalmente, las manifestaciones de la lesión del ADN en las bacterias difieren mucho de la transformación en estado canceroso que se observa en las células de mamíferos. En compensación, los ensayos bacterianos al ser rápidos y económicos, hacen que la detección de cancerígenos a gran escala pueda considerarse ya un objetivo alcanzable.

Entre estos métodos encontramos el ensayo Rec que es uno de los aconsejados por Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos (218) para el estudio de sustancias mutagénicas. El mismo se basa en que los distintos daños producidos sobre el ADN están sujetos a la reparación por recombinación post-duplicación y que las bacterias mutantes que carecen de la posibilidad de efectuar dicha reparación (Rec⁻) son más sensibles a los agentes mutagénicos que las células normales que le dieron origen (Rec⁺). Kada y col. (268) proponen para este ensayo utilizar 2 cepas de Bacillus subtilis: la cepa H 17 (Rec⁺) y la cepa M 45 (Rec⁻) que fue aislada como una mutante supersensible luego de irradiar la cepa H 17. Una de las ventajas de este ensayo es que no está restringido a la detección de mutantes puntuales específicas, ya que puede detectar daños producidos por distintos mecanismos y en cualquier locus (o multi loci) del ADN. Como todo ensayo con bacterias, necesita activación metabólica para poder detectar las sustancias promutagénicas que son activadas a nivel hepá-

tico.

I.4.4. HEMOLISIS EN HEMATIES HUMANOS

La hemólisis por parte de toxinas bacterianas ha sido ampliamente estudiada (269) inclusive es un criterio tenido en cuenta para la clasificación de estreptococos. Son hemolíticas las toxinas δ y ϵ del Clostridium navyi, las toxinas β , γ , δ y ϵ del Clostridium oedematiens, la α toxina de Clostridium septicum, la tetanolisyna de Clostridium tetani, las β , γ , δ y ϵ toxinas de Staphilococcus aureus y las Streptolisinas S y O del Streptococcus pyogenes (270). Estas toxinas, a diferencia de las micotoxinas, son de origen proteico. Sin embargo ciertos antibióticos con estructuras semejantes a las micotoxinas también son hemolíticas, por ejemplo, la anfotericina B, ascosina, tricomicina candidina y etruscomicina (271).

Las micotoxinas no han sido suficientemente estudiadas en su aspecto hemolítico. En el laboratorio de Micología Aplicada de la Facultad de Farmacia, Universidad de Nancy, Francia (272) y en el Departamento de Bioingeniería, Universidad Nacional del Litoral (273) se han llevado a cabo estudios preliminares comprobando que la toxina T2, zearalenona y citrinina manifiestan acción hemolítica.

I.4.5. BIOENSAYOS CON EMBRION DE POLLO

Distintos investigadores han publicado sobre letalidad y

teratogénesis en embriones de pollos producidas por micotoxinas (274) (275) (276), como así también sobre metodología aplicable al estudio directo de micotoxinas en alimentos utilizando embriones de pollos (277).

Vesely (276) estudió el efecto de 19 micotoxinas utilizando embriones de pollo y demostró que toxina T2 y diacetoxiscirpenol producían letalidad a concentraciones tan bajas como $0,01 \mu\text{g}$ y acción teratogénica a concentraciones de $0,001 \mu\text{g}$. Por otra parte son necesarios $100 \mu\text{g}$ de griseofulvina para producir igual efecto letal y $10 \mu\text{g}$ para el efecto teratogénico. En la Tabla 6 se observan los resultados obtenidos por Vesely y col.

Tabla 6: Embriotoxicidad de las micotoxinas.

Micotoxina	Dosis (μg)	
	Letal	Teratogénica
Toxina T2	0,01	0,001
Diacetoxiscirpenol	0,01	0,001
Toxina PR	0,1	0,01
Aflatoxina B ₁	0,1	0,01
Aflatoxina G ₁	0,1	
Ocratoxina A	0,1	
Rubratoxina B	0,1	
Aflatoxina M ₁	1,0	0,1
Aflatoxina B ₂	1,0	0,1
Acido micofenólico	1,0	0,1

Micotoxina	Dosis (μg)	
	Letal	Teratogénica
Aflatoxina B ₂	1,0	
Esterigmatocistina	1,0	
Patulina	1,0	
Zearalenona	10	1,0
Citrinina	10	
Acido penicflico	10	
Acido tenuazónico	10	
Brevianamide A	10	
Griseofulvina	100	10,0

Los resultados obtenidos en relación a los encontrados en cultivo de células de mamífero, como así también en ratas y ratones, lo revelan de alto valor predictivo en la detección de micotoxinas (276).

I.4.6. BIOENSAYO CON CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFEROS

A fines del siglo pasado comenzaron los estudios tendientes a señalar la importancia del medio interno para regular las actividades del tejido vivo. Para poder entender las propiedades funcionales de las células y cómo estas células afectan o son afectadas por el medio ambiente, era necesario ais-

larlas en sistemas artificiales.

Los primeros trabajos tendientes al aislamiento de células del organismo original fueron realizadas en 1866, pero fue Wilhem Roux en 1885 (278) quien trabajó con cultivos de tejidos organizados. Este tipo de experimentos tenía por objeto el estudio de órganos, tejidos o células, pero no independientes del animal en experimentación. Harrison en 1907 (279) ideó una técnica simple y eficaz que permitía a las partes explantadas crecer y desarrollarse fuera del organismo en medios artificiales. Finalmente, Burrow y Carrel en 1910 (280) adaptaron los métodos de Harrison al cultivo de tejidos de animales de sangre caliente usando técnicas quirúrgicas y medios adecuados que permitían mantener los cultivos en condiciones controladas. De esta forma, con los progresos graduales en las técnicas y la elaboración de medios adecuados, pronto fue posible cultivar células y fragmentos de tejidos aislados casi de cualquier parte del organismo.

Cultivo de células

Son cultivos de células dispersas a partir de órganos o tejidos, incluyendo poblaciones derivadas de células únicas. Han sido utilizados con mucho éxito en virología debido principalmente a la gran sensibilidad de los mismos a la infección viral permitiendo medir reacciones virus-célula huésped que luego pueden extrapolarse a organismos.

Distintos cultivos celulares se han utilizado para el estudio de micotoxinas. Por ejemplo, células leucémicas de rata para detectar fusarenona, DAS y patulina (281); células Hela

para ocratoxina, tricotecenos, aflatoxinas, sporidesmina y epipolitiopiperazine 3-6 dionas.

Robb J. (282) llevó a cabo un estudio comparativo entre la cromatografía en capa delgada y la citotoxicidad en células HEp.-2 y Chang. para la investigación de tricotecenos demostrando que el bioensayo es más sensible a esas micotoxinas. Por otra parte aconseja el test para el "screening" de micotoxinas desconocidas en alimentos para animales.

I.5. OBJETIVOS

Las numerosas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años sobre el tema micotoxinas han permitido el descubrimiento de cerca de trescientos metabolitos tóxicos de origen fúngico. Sin embargo, Organismos Internacionales como FAO y OMS recomiendan continuar con la búsqueda de nuevas micotoxinas y nuevos hongos toxicogénicos, dado que al contaminar alimentos y forrajes podrían ser la causa de enfermedades en humanos y animales cuya etiología se desconoce.

Los trabajos previos realizados en nuestro país han estado orientados fundamentalmente al estudio de incidencia de algunas micotoxinas en cereales y oleaginosas y son escasas las investigaciones sobre flora fúngica toxicogénica (18).

Esto nos lleva a plantear la necesidad de conocer más exhaustivamente los hongos contaminantes de alimentos, para detectar mediante una batería de ensayos biológicos las cepas toxicogénicas, poniendo en evidencia aquellas cepas que pertenecen a especies conocidas como no toxicogénicas al presente. Se contribuiría así a disminuir los riesgos en salud humana y animal originados por las micotoxinas.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1- Evaluar la capacidad toxicogénica de los hongos contaminantes de alimentos para consumo humano y/o animal, procesados en la zona de influencia de la ciudad de Santa Fe.
- 2- Clasificar los hongos que resultan toxicogénicos en:
 - a) Cepas pertenecientes a especies conocidas como toxicogénicas;

- b) Cepas pertenecientes a especies conocidas como no toxicogénicas.
- 3- Investigar si las cepas del grupo 2 a son productoras de micotoxinas asociadas a la especie.
- 4- Determinar las características cromatográficas de los metabolitos tóxicos producidos por las cepas pertenecientes al grupo 2 b (Rf para un dado sistema de solvente).

II MATERIALES Y METODOS

II.1. MUESTREO DE ALIMENTOS

El muestreo se realizó en la ciudad de Santa Fe y zonas de influencia en el período 1984-1986.

Se tomaron muestras de:

- . maíz y trigo a la entrada de un molino harinero (4 muestras de cada tipo de grano por año; 2 en invierno y 2 en verano);
- . arroz, soja y sorgo de silos en una fábrica de alimentos balanceados para aves (4 muestras de cada tipo de grano por año; 2 en invierno y 2 en verano);
- . papas a partir de lotes contaminados en un mercado municipal;
- . pastas frescas a partir de lotes contaminados provenientes de distintos supermercados;
- . manteca y queso a partir de lotes contaminados suministrados por una industria de productos lácteos.

II.2. AISLAMIENTO DE HONGOS

Para el aislamiento a partir de granos se procedió de acuerdo a Lura y col. (283). Se incubaron entre 10 y 15 granos en cámara húmeda durante 72 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Las colonias fúngicas desarrolladas que presentaban diferencias macroscópicas, fueron repicadas a placas de agar malta hasta verificación de cultivos puros. Luego se repicaron a tubos con el mismo medio y una vez desarrollados los hongos se conservaron en heladera a 4°C .

En el caso de los otros alimentos, los hongos se aisla-

ron a partir de lotes visiblemente contaminados, por repique con ansa de aguja a placas de agar malta. Se incubó y se procedió como en el ítem anterior.

II.3. CONSERVACION DE LAS CEPAS

Las cepas fueron conservadas por repiques periódicos en agar malta y conservación en heladera a 4°C, con supresión de la evaporación.

II.4. CULTIVO DE LAS CEPAS EN SUS MEDIOS ECOLOGICOS

Con las cepas aisladas a partir de granos se procedió de la siguiente forma: se prepararon los correspondientes medios de cultivo, colocando 20 gramos de granos finamente molidos en 100 ml de agua destilada. Se llevó a ebullición hasta gelificación. Se diluyó 1 : 5 con agua destilada y se agarizó al 2 %. Se esterilizó a 1 atmósfera durante 30 minutos.

Los hongos provenientes de productos lácteos se cultivaron en leche entera agarizada al 2 % y esterilizada a 1 atmósfera durante 15 minutos. Los hongos aislados a partir de papas se cultivaron en medio agar papa sacarosa (206). Para el estudio de los hongos aislados a partir de pastas frescas se utilizó el medio ecológico a base de granos de trigo.

Los distintos medios de cultivo se distribuyeron en cajas de Petri de 85 mm de diámetro íntero, a razón de 30 ml por caja. Los hongos fueron sembrados haciendo 3 toques equidistan-

tes con ansa de aguja. Se incubó 14 días a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Por cada cepa en estudio se sembraron 3 placas, obteniéndose así 9 colonias con idénticas características.

II.5. EXTRACCION DE METABOLITOS TOXICOS

Luego del período de incubación, se extrajo el centro de cada colonia fúngica con la ayuda de un tubo de hemólisis de vidrio (9,6 mm de diámetro interno) utilizado como sacabocado. El disco extraído (hongo más medio de cultivo) se introdujo hasta el fondo del tubo de hemólisis y se agregó 1 ml de cloroformo (19). Se dejó actuar el solvente durante 24 horas. Luego se trasvasaron los 9 extractos correspondientes a cada cepa en estudio a un tubo de ensayo (sólo la parte líquida). Se mezcló y se distribuyó en 9 frascos de 10 ml de capacidad. Se evaporó a sequedad a 80°C y se mantuvo a esa temperatura 10 minutos para esterilizar el extracto seco. Se conservó a -20°C .

II.6. IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

Los mohos aislados fueron identificados observando sus caracteres culturales (aspecto del crecimiento, forma, tamaño y color de las colonias en distintos medios incubados a distintas temperaturas) y por sus caracteres morfológicos utilizando microscopio estereoscópico y mediante la técnica de microcultivo (284).

Para la realización de cada microcultivo, se esterilizó una caja de Petri dentro de la cual se había colocado un pequeño trozo de algodón, una varilla de vidrio en forma de Z y sobre ella un portaob-

jetos.

En otra caja de Petri se vertió agar Czapek hasta formar una capa de 3 mm de espesor. Una vez solidificado, se recortó el agar con un bisturí estéril en trozos de aproximadamente 1 cm^2 . Uno de estos trozos se colocó sobre el centro del portaobjetos. Luego se inocularon los 4 bordes del bloque de agar con el hongo en estudio y se cubrió con un cubreobjetos estéril, de mayor tamaño que el trozo de agar. A fin de obtener una cámara húmeda, se embebió el algodón con 2 - 3 ml de agua estéril. La incubación se realizó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. La clasificación en distintos géneros fúngicos se llevó a cabo según criterios de Barnett (285) y Pitt (286). La clasificación en distintas especies del género Aspergillus se realizó según las claves de Thom and Raper (287); la del género Penicillium según Raper and Thom y confirmado de acuerdo a las claves de Pitt (289). El género Fusarium se clasificó de acuerdo a las claves de Booth (290), Gerlach (291) y Joffe (292).

Los medios de cultivos utilizados para la clasificación fueron:

• Agar Malta (MEA)

Extracto de malta	20,0 g
glucosa	20,0 g
peptona	1,0 g
agar	25,0 g
agua destilada	1000 ml
pH aprox.	4,7

Preparado según Raper and Thom (288).

• Agar Czapek

NaNO_3	3,0 g
K_2HPO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g

KCl	0,5 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g
sacarosa	30,0 g
agar	15,0 g
agua destilada	1000 ml

Preparado según Raper and Thom (288).

. Agar papa sacarosa (para identificación de Fusarium)

Extracto de papa*	500 ml
sacarosa	20,0 g
agar	20,0 g
agua destilada	500 ml

El agua y el extracto de papas se mezclaron y se adicionó luego el azúcar y el agar. La mezcla se calentó lentamente hasta disolución del agar y se ajustó el pH a 6,5 con CaCO₃. Se esterilizó 20 minutos a 1 atmósfera.

* El extracto de papas se preparó con 1800 g de papas peladas y cortadas colocadas en una muselina en 4500 ml de agua y hervidas 10 minutos. El líquido se separó y se esterilizó 20 minutos a 1 atmósfera. Se conservó en heladera hasta su uso.

. Bilay's modificado por Joffe (Medio para esporulación de Fusarium)

KH ₂ PO ₄	1,0 g
KNO ₃	1,0 g
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
almidón en polvo	0,2 g

glucosa	0,2 g
sacarosa	0,2 g
agar	15,0 g
agua destilada	1000 ml

Se agregaron tiras de celulosa poco antes del agregado del agar.

Según Booth (290).

. Agar Czapek - Extracto de levadura (CYA)

K_2HPO_4	1,0 g
Czapek concentrado*	10 ml
extracto de levadura en polvo	5,0 g
sacarosa	30,0 g
agar	15,0 g
agua	1000 ml

Esterilizado a 1 atmósfera durante 15 minutos.

* Czapek concentrado:

$NaNO_3$	30,0 g
KCl	5,0 g
$Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$	5,0 g
$Fe SO_4 \cdot 7 H_2O$	0,1 g
agua	100 ml

No se esteriliza.

. Agar Nitrato 25 % glicerol (G 25 N)

K_2HPO_4	0,75 g
Czapek concentrado	7,5 ml
extracto de levadura	3,7 g

glicerol grado analítico 250,0 g

agar 12,0 g

agua destilada 750 ml

Esterilizado a 1 atmósfera durante 15 minutos.

II.7. EXTRACTOS BLANCO PARA BIOENSAYOS

Los extractos blancos fueron obtenidos de igual forma que los extractos fúngicos, trabajando sobre el medio de cultivo no inoculado.

II.8. BIOENSAYOS

II.8.1. BIOENSAYO UTILIZANDO BACILLUS THURINGIENSIS

Obtención de esporos:

Se trabajó con una cepa de B. thuringiensis serotipo 1 procedente de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Nancy, Nancy, Francia.

Sobre una estría fresca del bacilo, se hicieron rodar perlas de vidrio estériles. Se traspasaron luego a una superficie de agar tripticasa soya* contenida en botella de Roux. Se incubó a 30°C durante 24 horas y luego 7 días más a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se agregaron 30 ml de solución fisiológica a la botella a fin de extraer la mayor cantidad posible de células. Se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 20 minutos. Una vez desechado el sobrenadante, las cé

lulas se lavaron con otros 30 ml de solución fisiológica. Este procedimiento de lavado se repitió otras 2 veces más. Al término de la última centrifugación se resuspendió el sedimento en igual volumen de solución fisiológica (30 ml) y se repartió en tubos estériles. Dichos tubos se colocaron en Baño María a 80°C durante 30 minutos. De este modo se obtuvo una gran cantidad de esporos, lo que permitió disponer de un inóculo homogéneo y standarizado permanentemente.

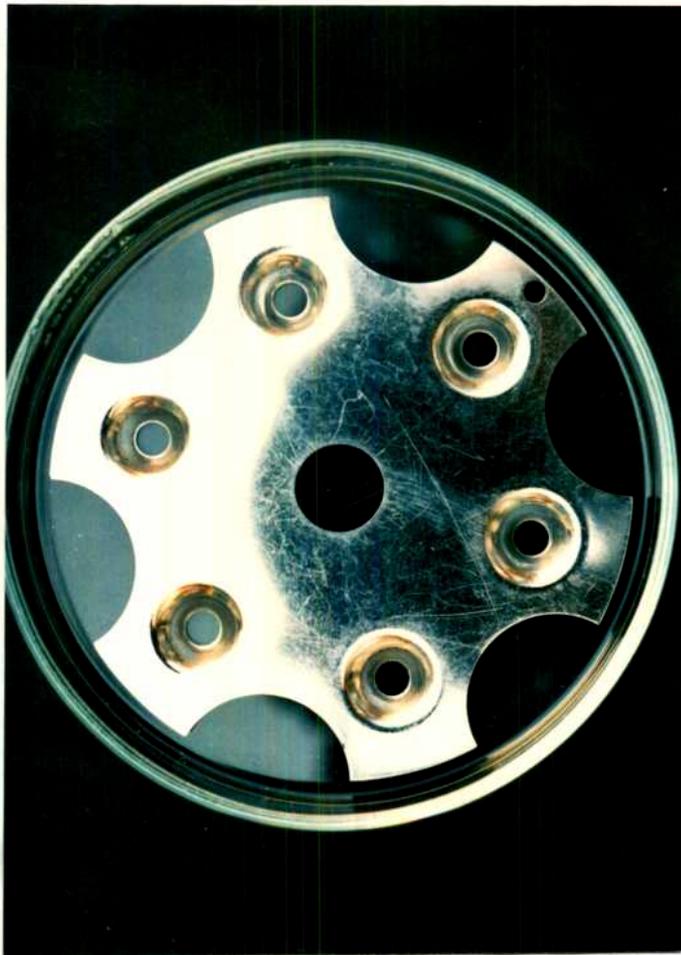
* Agar tripticasa soya:

peptona de caseína	15,0 g
peptona de soya	5,0 g
glucosa	2,5 g
ClNa	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
agar bacteriológico	15,0 g
agua destilada	1000 ml

Esterilizado a 120°C durante 20 minutos.

Preparación de las placas y siembra del bacilo:

Se prepararon cajas de Petri de 85 mm de diámetro interno conteniendo 10 ml de agar tripticasa soya. Una vez solidificado el medio de cultivo se vertió sobre las mismas 5 ml del mismo medio conteniendo una suspensión de esporos de $10^5 - 3 \cdot 10^5$ /ml. Una vez solidificadas las placas se colocaron discos portasoluciones (item D 3299 Scientific Glass Aparatus 735 Broad Street, Bromfield, New Jersey, USA).



DISCO PORTASOLUCIONES.

Item D 3299 Scientific Glass Aparatus 735.

Bioensayo: Los extractos fúngicos conservados a -20°C fueron llevados a temperatura ambiente y redissueltos en 1 ml de acetona - agua (80 : 20, V/V) (257).

Se colocaron 0,2 ml de cada extracto acetónico en los pocillos del disco portasoluciones trabajando por cuadruplicado. El blanco se agregó a razón de 0,2 ml por duplicado. Se realizó una predifusión de los metabolitos a 4°C durante 12 horas. Se incubaron luego las placas a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Evaluación de la toxigenidad de los extractos:

- a) Medida del halo de inhibición: Al cabo del período de incubación se retiraron los discos portasoluciones y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición expresando el resultado promedio de los cuadruplicados en mm.
- b) Medida de la elongación de los bacilos: Se tomó material celular del borde de la zona de inhibición, se realizó un frotis y una coloración bacteriana simple. El mismo procedimiento se efectuó para cada cuadruplicado, midiéndose en total 200 células. El resultado se expresó como el promedio de la longitud celular en μm .

En base a los resultados obtenidos con las cepas controles se definió el siguiente criterio de evaluación para la toxicidad de los extractos:

Elongación	Inhibición
$< 11 \mu\text{m}$ débilmente tóxico	$< 10 \text{ mm}$ débilmente tóxico
$12 - 20 \mu\text{m}$ tóxico	$10 - 20 \text{ mm}$ tóxico
$> 20 \mu\text{m}$ muy tóxico	$> 20 \text{ mm}$ muy tóxico

II.8.2. BIOENSAYO UTILIZANDO LEPIDIUM SATIVUM

Se trabajó con semillas de Lepidium Sativum "Frise" (L. Claude, F-91220 - Brettigny-sur-orge).

Los extractos fúngicos conservados a -20°C fueron llevados a temperatura ambiente y redissueltos en 1 ml de acetona-agua (80 : 20, V/V).

El ensayo biológico se llevó a cabo en cajas de Terrasaki de poliestireno atóxico, constituidas por 60 pocillos de $20\ \mu\text{l}$ de capacidad máxima cada uno, distribuidos en 6 filas y 10 hileras (267). En cada pocillo se agregaron $10\ \mu\text{l}$ de agua destilada como diluyente, con una micropipeta automática. En la primera fila se agregaron, sucesivamente, $10\ \mu\text{l}$ de 4 extractos diferentes, por duplicado y 2 extractos blancos. Cada extracto se diluyó con micropipeta al medio sucesivamente hasta la dilución 1/64. Se colocó una semilla en cada pocillo y 4 gotas de agua en los bordes de la caja para constituir una cámara húmeda. Se tapó e incubó a 25°C durante 24 horas.

Evaluación de la toxicidad:

- a) Se establecieron 4 estadios de germinación para evaluar el crecimiento de la semilla:
 - 1- Hinchamiento y ruptura de los tegumentos.
 - 2- Aparición del hipocótilo.
 - 3- Puesta en evidencia de la radícula.
 - 4- Encurvamiento de la misma y posteriores estadios.
- b) Grado de toxicidad: Se le asignó a cada semilla el valor del estadio de germinación correspondiente y se sacó un promedio para todas las diluciones de un mismo extracto.

Se hizo lo mismo con el duplicado y se promediaron ambos valores. Se obtuvo \bar{X} . Lo mismo se hizo con el blanco, obteniéndose \bar{B} y se calculó la relación $\frac{\bar{X}}{\bar{B}}$.

Considerando como testigo de cepa muy toxicogénica a la cepa de Fusarium poae utilizada por Payen en sus estudios preliminares (257) se definieron 4 grados de toxicidad:

$\frac{\bar{X}}{\bar{B}}$	Grado de toxicidad
0,25 - 0,59	4 - Muy tóxico.
0,60 - 0,79	3 - Tóxico.
0,80 - 0,89	2 - Débilmente tóxico.
Mayor o igual a 0,90	1 - No tóxico.

II.8.3. ENSAYO REC

Se llevó a cabo una adaptación de la técnica de Kada. (268). Se trabajó por separado y en paralelo con las cepas de Bacillus subtilis M 45 y H 17 cedidas gentilmente por el Dr. T. Kada del Department of Induced Mutation, National Institute of Genetics, Mishima, Japón. Los bioensayos se realizaron con y sin activación metabólica.

Obtención de esporos y preparación de las placas:

Se trabajó de igual forma que en el bioensayo con B. thuringiensis.

Cuando el ensayo se llevó a cabo con fracción microsomal, la misma fue agregada al inóculo de bacilos a razón de 0,5 ml.

Activación Metabólica:

- Inducción de las enzimas hepáticas de rata:

La técnica utilizada es la propuesta por Czygan y col. (293).

Se utilizaron ratas Wistar de 180 - 220 g de peso. Las mismas fueron inyectadas en forma intraperitoneal con Aroclor 1254 (diluído en aceite de maíz estéril a una concentración de 200 mg/ml) con dosis de 500 mg/kg de peso.

Cinco días después las ratas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina, previo ayuno de 12 horas. Durante la experiencia las ratas fueron mantenidas en bioterio climatizado, con ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

Obtención de la fracción microsomal "S-9":

Se utilizó la técnica recomendada por Garner y col. (294) Todas las etapas se llevaron a cabo en mesa fría usando material de vidrio y soluciones estériles. Los hígados de rata (peso promedio 10 - 13 g) se colocaron en vasos de precipitados y se enjuagaron con una solución de KCl 0,15 M. Después de pesados se transfirieron a un vaso de precipitado conteniendo (3 ml/g de tejido húmedo) de KCl 0,15 M. Se trozó con tijeras estériles y se homogeneizó en Potter con martinete de teflón. El homogenato se centrifugó a 4°C a 9000 g durante 10 minutos y el sobrenadante (S-9) se distribuyó a razón de 2 ml en pequeños tubos de plásticos con tapa a rosca. Se congeló rápidamente en hielo seco y se conservó en nitrógeno líquido.

Al momento del uso se descongeló a temperatura ambiente y se conservó en agua con hielo. Para eliminar posibles conta

minaciones bacterianas se filtró por filtro Millipore con filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

Preparación de la solución de cofactores y sales:

Antes de cada experiencia se disolvieron 20 mg de glucosa 6 fosfato y 40 mg de NADP por cada ml de solución buffer. La solución buffer contenía $762 \mu\text{g Mg Cl}_2$, 2,46 mg KCl y 14,2 mg Na_2HPO_3 /ml de solución.

La solución final se esterilizó por filtración a través de filtro Millipore de $0,45 \mu\text{m}$.

Bioensayo:

Los extractos fúngicos conservados a -20°C fueron llevados a temperatura ambiente y redisoluertos en 1 ml de acetona: agua 80 : 20 V/V.

Se colocaron en los pocillos del disco portasoluciones a razón de 0,1 ml por extracto en estudio. Se trabajó por duplicado y con un blanco por placa.

Las placas se colocaron 20 horas en heladera para facilitar una mejor difusión de los metabolitos. Se incubó a 37°C durante 20 horas.

Cuando se trabajó con activación metabólica en cada pocillo se adicionó 0,1 ml del extracto y 0,1 ml de la solución de cofactores y sales. Transcurrido el período de incubación se retiró el disco portasoluciones y se midieron los halos de inhibición.

Los resultados se interpretaron según el criterio propuesto por Leifer y col. (227) considerándose resultados positivos

vos (actividad mutagénica positiva) cuando la cepa de B. subtilis M 45 (ADN reparasa deficiente) fue inhibida en mayor grado que la cepa B. subtilis H 17.

Si ambas cepas fueron inhibidas en la misma extensión, los resultados fueron considerados como negativos (acción antibiótica).

En base a los resultados obtenidos con las cepas controles se definió el siguiente criterio de evaluación para el efecto mutagénico:

Diferencia entre halo cepa H 45 - H 17:

< 2 mm - Débilmente tóxico.

2 - 6 mm - Tóxico.

> 6 mm - Muy tóxico.

II.8.4. HEMOLISIS

Se utilizaron policubetas descartables con 96 pocillos de 300 μ l de capacidad (12 hileras y 8 filas).

En cada pocillo se colocaron 50 μ l de solución fisiológica y al primero de cada hilera se le adicionó 50 μ ml del extracto fúngico.

Luego se efectuaron diluciones sucesivas al medio con cada uno de los extractos hasta lograr la dilución 1/256.

Se agregó a cada pocillo 5 μ l de una suspensión al 10 % (en solución fisiológica) de glóbulos rojos humanos lavados.

En cada placa se procesaron por duplicado 5 extractos y un blanco.

Se incubó a 37°C y se estipuló como tiempo de lectura 5 horas ya que en estudios previos (273) se observó que a par-

tir de dicho tiempo no se observaron variaciones significativas con toxinas puras ni con extractos fúngicos toxicogénicos.

En base a los resultados con cepas controles se definió el siguiente criterio de evaluación (no se considera la dilución 1/2):

Hemólisis en la dilución:

- 1/4 - Débilmente tóxico.
- 1/8 y 1/16 - Tóxico.
- \geq 1/32 - Muy tóxico.

II.8.5. BIOENSAYO CON EMBRION DE POLLO

Se utilizó la técnica propuesta por García (295). Los extractos fúngicos para este bioensayo fueron redisueltos en etanol - agua 40 : 60, V/V. El solvente acetónico utilizado en otros bioensayos resultó letal en más del \geq 67 % de los casos.

Se colocaron huevos fértiles (White Leghorn) en incubadora horizontal a 38 - 39°C y 70 % de humedad aproximadamente. A los 6 días de incubación se observó la viabilidad a través de un ovoscopio (presencia del embrión, vasos sanguíneos y movilidad). Por cada extracto a estudiar se seleccionaron 6 huevos embrionados vitales. Se perforaron en la cámara de aire y se inocularon con aguja (10 x 0.5) inyectando 0,1 ml del extracto sobre la fãrfara interna. Las perforaciones se sellaron con esmalte para uñas. Con los extractos blanco se trabajó de igual forma.

Se llevaron a cabo observaciones diarias, registrándose las muertes, alteraciones teratogénicas. Se observó el creci-

miento de los pollos durante los 30 primeros días después del nacimiento.

En base a los resultados obtenidos con las cepas toxicogénicas controles se consideró:

Efecto débilmente tóxico - mortandad del 50 % y 66,6 %
 tóxico - mortandad del 83,3 %
 muy tóxico - mortalidad del 100 %

Correspondiendo una mortandad no superior al 33,3 % para el blanco.

II.8.6. BIOENSAYO CON CELULAS VERO

Las células VERO son una línea celular de riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops. Los extractos fúngicos para este bioensayo fueron redisueltos en etanol - agua 40 : 60 V/V. El solvente acetona - agua utilizado en los ensayos anteriores resultó tóxico para las células VERO produciendo grandes halos de inhibición (> 2 cm).

Obtención del inóculo:

Un cultivo de células VERO desarrollado en monocapa en botella de Roux de 1.000 ml, se tripsinó a 37°C hasta comenzar el desprendimiento de la monocapa. Se eliminó la tripsina dejando 2 ml aproximadamente de la misma. Se agitó luego la botella para desprender las células.

Bioensayo:

El inóculo fue sembrado en 30 botellas tipo Roux de 20 ml con medio MEM 5 % más 0,2 % de gentamicina a 37°C. Se cul-

tivó con tapón de goma a 37°C hasta viraje del medio del rosa al amarillo.

Se eliminó el medio de cultivo y se colocó en cada botella sobre la monocapa un disco de papel (de 0.5 cm de diámetro) impregnado en extracto, previo toque del disco en papel estéril para eliminar exceso de extracto.

Se agregó a cada botella medio Eagle 2 % con igual cantidad de agua agarizada al 3 % fundida. Se incubó a 37°C durante 24 horas. Se agregó 4 ml de formol para fijar la monocapa al vidrio y se dejó actuar 20 minutos. Se eliminó el formol y el medio agarizado. Se lavó con agua y se coloreó con cristal violeta. Se midieron los halos no coloreados tomándose el siguiente criterio de evaluación:

No tóxico	0,5 cm
Débilmente tóxico	0,5 - 1 cm
Tóxico	1 - 2,5 cm
Muy tóxico	> 2,5 cm*

* Corresponde al mayor halo obtenido (cepa de Aspergillus ochraceus, fuerte productora de ocratoxina).

Soluciones y medios utilizados en este bioensayo:

- Solución de Tripsina:

Tripsina	1,5 g
Na Cl	16,0 g
K Cl	0,8 g
glucosa	2,0 g
Na H CO ₃	1,16 g
EDTA	0,4 g

H₂O hasta 1000 ml

rojo fenol 0,5 % 2 ml

La solución estéril se diluye al medio para su uso.

- Medio de crecimiento: MEM 5 %

MEM 10 x 10 ml

Suero de ternera inactivado 5 ml

Na H CO₃ 5 % hasta pH 7,2 - 7,4

Antibiótico (GENTAMICINA) 2 g

H₂O hasta 1000 ml

- Medio de mantenimiento: Eagle 3 %

Eagle 10 x 10 ml

Suero de ternera inactivado 3 ml

Na H CO₃ 5 % hasta pH 7,2 - 7,4

Antibiótico (GENTAMICINA) 2 g

H₂O hasta 100 ml

II.8.7. CEPAS TOXICOGENICAS CONTROLES

Aspergillus ochraceus NRRL 3174

Fusarium graminearum NRRL 6101

Fusarium graminearum NRRL 6207

Fusarium tricinctum ATCC 24631

Aspergillus versicolor MP 536.3

Fusarium poae T. 746

Fusarium melanochlorum T 80.3

Laboratorio de Mico-
logfa Aplicada E.N.
S.A.I.A. de Nancy,
Francia.

Aspergillus flavus Link 8991 - Universidad del Estado de Gantes, Bélgica.

Aspergillus parasiticus - Facultad de Bioquímica y Farmacia, U. N. de Buenos Aires.

Penicillium viridicatum - Cátedra de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas, U. N. de Buenos Aires.

<u>Aspergillus terreus</u>		Depto. Bioingeniería, Facultad
<u>Penicillium cyclopium</u>		de Ingeniería Química, U. N.
<u>Penicillium citrinum</u>		del Litoral.

Las cepas controles se cultivaron en medio BL₂ inductor de la biosíntesis de micotoxinas (206) y la extracción de los metabolitos tóxicos se llevó a cabo como en el caso de las cepas aisladas de alimentos.

Expresión de resultados en base a la respuesta de la totalidad de los bioensayos:

- . No tóxico: No se observó efecto en ninguno de los bioensayos.
- . Débilmente tóxico: Al menos en uno de los bioensayos se obtuvo respuesta "débilmente tóxica", pudiendo ser el resto negativas.
- . Tóxico: Al menos en uno de los bioensayos se obtuvo respuesta "tóxica", pudiendo ser el resto, débilmente tóxicas o negativas.
- . Muy tóxico: Al menos en uno de los bioensayos se obtuvo

respuesta "muy tóxica" pudiendo ser el resto, tóxicas, débilmente tóxicas o negativas.

Los criterios utilizados para evaluar toxicidad son relativos, ya que los resultados pueden estar afectados por factores como: la estabilidad del o los metabolitos en el solvente de extracción, por la mayor o menor difusión de los metabolitos en los medios utilizados en los bioensayos, por la permeabilidad celular del organismo utilizado en el ensayo biológico.

II.9. ANALISIS DE MICOTOXINAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

Se investigó la presencia de:

Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂; Patulina;
Citrinina; Acido Penicílico; Esterigmatocistina;
Gliotoxín.

Se empleó el método propuesto por Scott (296). Se utilizó en todos los casos standard y standard interno de las micotoxinas en estudio.

Las toxinas de Fusarium:

Diacetoxyscirpenol; Toxina T-2; Moniliformina;
Zearalenona; Butenolida; Nivalenol; Neosolaniol;
Toxina HT-2.

Se analizaron por el método de Kamimura (297). Se utilizó en todos los casos standard y standard interno de las micotoxinas en estudio.

Para el caso de:

Acido secalónico D y Acido cyclopiazónico ;
 Rugulosina y Rubratoxina B ;
 Fumitremorginas (A y B) ; Verruculógeno ;
 Nigragilina ; Decumbin ; Alternariol y Altenuene ;
 Alternariol monoetil éter

Se utilizó la metodología propuesta por Cole (20).

No se contó con standares puros. Se consideró el Rf y el color de las manchas luego del rociado con distintos reveladores, al observar a la luz visible y a la luz ultravioleta.

II.10. FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS FUNGICOS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

Se procesaron extractos pertenecientes a especies no reconocidas como toxicogénicas (según la bibliografía consultada) y extractos de hongos que mostraron características toxicológicas distintas a las descritas en la literatura.

Para cada extracto distinto se procedió de la siguiente forma:

Se sembraron 2 extractos del mismo hongo (redisueños cada uno en 1 ml de cloroformo) en forma de banda sobre un cromatofolio AL silicagel 60 (20 x 20 - Art. 5553 de Merck) de 0,2 mm de espesor.

Se desarrolló el cromatograma en el sistema T.E.F. propuesto por Scott (296). Se dejó correr el frente de solvente 12 cm desde la línea de siembra.

Se observó la placa a la luz visible y a la luz ultravioleta (onda larga y corta). Se marcaron en el borde de la placa las zonas donde se encontraban manchas definidas.

Se cortó luego una banda de 1 cm de ancho, tomada desde un extremo y en el sentido de la corrida cromatográfica.

Se roció con p - anisaldehído según Scott (296). Se marcaron las zonas de las manchas que aparecieron luego del tratamiento con luz visible y luz ultravioleta (onda larga y corta).

El resto de la placa se cortó en 6 bandas paralelas a la siembra y aproximadamente iguales, tratando de no fraccionar ninguna de las manchas marcadas.

Cada banda se raspó con espátula y se colectó toda la silicagel en un tubo de centrífuga. Se agregaron 2 ml de cloroformo, se agitó en vórtice 1 minuto y se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Se recogió la fase líquida. Con la silicagel se repitió la operación de extracción otras 2 veces.

El volumen final se fraccionó en 2 volúmenes iguales, los que fueron llevados a sequedad en recipientes de 10 ml.

Se conservó a -20°C hasta la realización de los bioensayos.

Con cada una de las 6 fracciones se repitieron los bioensayos.

Las fracciones que resultaron tóxicas fueron recromatografiadas en 3 sistemas de solventes:

- 1: Tolueno - Acetato de Etilo - 90 % Acido fórmico (6 : 3 : 1)
- 2: Cloroformo - Acetona (9 : 1)
- 3: Benceno - Acido Acético (7 : 3).

Se determinó el Rf de las manchas observadas a la luz visible a la luz ultravioleta (onda larga y corta) y luego de rociado con SO_4H_2 etanólico 30 % y p - anisaldehído preparado según Scott (296).

II.11. ANALISIS ESTADISTICOS

Se analizó la hipótesis siguiente:

Los 8 bioensayos responden de igual forma.

Se utilizó el test de la suma de los órdenes (298).

Para los 8 bioensayos en su conjunto el estadístico de prueba es:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^8 \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

N = Suma de los tamaños de todas las muestras $N = 58 \times 8 = 464$

n_i = Tamaño de la muestra i

R_i = Suma de los órdenes de la i - ésima muestra.

Se analizaron también bioensayos de a pares:

Se estudió la hemólisis versus cada uno de los bioensayos restantes. (Dado que existe poco en la bibliografía sobre hemólisis en relación a micotoxinas). Se estudió la acción en

células Vero versus acción en embrión de pollo.

Se estudió Elongación en B. thuringiensis versus Ensayo Rec con y sin activación metabólica.

El estadístico utilizado en estos casos fue:

T' . Para n_1 y n_2 superiores a 10 (en nuestro caso $n_1 = 58$ y $n_2 = 58$). (Extractos toxicogénicos correspondientes a Penicillium, Fusarium y Aspergillus).

La distribución de T' de las muestras es aproximadamente normal con media

$$\mu_{T'} = n_1 (n_1 + n_2 + 1) / 2 = 3393$$

y variancia

$$\sigma_{T'}^2 = \frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12} = 32799$$

Para un riesgo α , el valor t calculado es:

$$t = \frac{T'_o - t + 1/2}{\sigma_{T'}} = \frac{T'_o - 3393 + 0,5}{\sqrt{32799}}$$

donde T'_o es el valor de T' observado.

En todos los casos planteamos como hipótesis:

Los bioensayos responden de igual forma.

Tomamos $\alpha = 0,05$ (riesgo de rechazar erróneamente una hipótesis que resulta ser correcta), para ese α , el valor crítico de la distribución normal es 1,96.

Si $|t| < 1,96$ no rechazamos la hipótesis.

III RESULTADOS Y DISCUSION

III.1. EVALUACION DE LA CAPACIDAD
TOXICOGENICA DE LOS HONGOS
CONTAMINANTES DE ALIMENTOS PARA
CONSUMO HUMANO Y O ANIMAL

La Tabla 7 presenta los resultados obtenidos con las cepas de hongos toxicogénicos controles frente a los distintos bioensayos utilizados en el trabajo.

La cepa de A. ochraceus NRRL 3174, productora de ocratoxina, fue la que mayor toxicidad manifestó en los bioensayos. Cabe acotar que esta cepa produce ocratoxina en cantidad significativa. Por otra parte se pone en evidencia la acción nefrotóxica de esta micotoxina ya que en células Vero (células de riñón de mono verde africano) se obtuvo la mayor acción tóxica en relación a los otros hongos controles estudiados.

A. ochraceus y P. viridicatum producen ambos ocratoxina, sin embargo la menor producción de toxina por parte de este último se manifestó en una respuesta más débil o nula en los bioensayos.

A. flavus Link 8891, productor de aflatoxinas B₁, B₂ y G₁ presentó acción mutagénica en el ensayo REC aún sin activación metabólica. Este fenómeno puede explicarse porque bajo ciertas condiciones de reacción (alta concentración de aflatoxinas y largo período de tiempo) estas toxinas pueden unirse covalentemente al ADN (299). Asimismo esta cepa de A. flavus Link mostró una alta genotoxicidad frente a B. thuringiensis.

A. terreus, productor de citrinina y patulina, no respondió al ensayo REC pero sí manifestó elongación celular en el bioensayo con B. thuringiensis.

TABLA 7: Respuesta toxicológica de hongos toxicogénicos utilizados como controles.

HONGO	TOXINA(S) QUE PRODUCE	L. sativum $\left(\frac{\bar{X}}{B}\right) \times x$	CEL. VERO (mm)*	B. thuringiensis			REC		HEMOLISIS M.D.H.***	E. POLLO (Letalidad %)
				Elong. (μ m)	Inhib. (mm)	Con F.M. (mm)**	Sin F.M. (mm)**			
A. flavus Link 8991	aflatoxinas B ₁ , B ₂ y G ₁	T 0,75	D 0,9	MT 21,0 ± 8,5	MT 23,9 ± 0,8	D 1,5	D 1,5	N 0	T 83,3%	
A. parasiticus 3145	aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	D 0,80	D 0,8	N 5,5 ± 6,3	T 14,9 ± 0,8	T 5,2	N 0	N 1/2	T 66,6%	
A. versicolor MP 536,3	esterigmatocístina	T 0,65	N 0,5	N 9,7 ± 4,4	MT 21,3 ± 1,8	D 0,8	D 1,1	N 1/2	D 50%	
A. terreus	citrinina y patulina	T 0,75	N 0,5	T 11,9 ± 4,3	MT 23,4 ± 0,5	N 0	N 0	T 1/16	N 16,6%	
A. ochraceus NRRL 3174	ocratoxina A	T 0,61	MT 2,5	T 17,3 ± 8,9	MT 29,9 ± 1,2	MT 7,0	MT 8,2	T 1/8	MT 100%	
P. viridicatum	ocratoxina A	D 0,83	T 1,8	N 9,0 ± 2,7	T 13,4 ± 1,3	N 0	D 1,8	N 0	D 50%	
P. citrinum	citrinina	N 0,95	N 0,5	N 7,7 ± 2,2	T 13,4 ± 0,4	N 0	N 0	T 1/16	N 33,3%	
P. cyclopium	patulina	D 0,91	T 2,0	T 11,4 ± 3,0	T 19,6 ± 0,3	N 0	N ^x 0	D 1/4	T 66,6%	

* diámetro del halo no coloreado

** diferencia entre diámetro cepa M 45 y H 17

*** máxima dilución hemolítica

x Acción antibiótica.

xx Ver "Materiales y Métodos".

N = No tóxico.

D = Débilmente tóxico.

T = Tóxico.

MT = Muy tóxico.

(continúa)

TABLA 7 (Continuación)

HONGO	TOXINA(S) QUE PRODUCE	L. sativum $\left(\frac{\bar{X}}{B}\right) \times x$	CEL. VERO (mm) *	B. thuringiensis			REC		HEMOLISIS M.D.H.***	E. POLLO (Letalidad %)
				Elong. (μ m)	Inhib. (mm)	Con F.M. (mm) **	Sin F.M. (mm) **			
F. poae T746	toxina T-2 DAS, neosolanol y butenolida	MT 0,30	T 1,9	N 8,9 \pm 5,0	T 12,5 \pm 0	N 0	D 1,0	D 1/4	MT 100 %	
F. melanochlorum T 80.3	toxina acetil T-2	T 0,68	T 1,5	N 10,0 \pm 3,4	MT 20,1 \pm 1,3	D 1,2	D 1,0	T 1/16	MT 100 %	
F. tricinctum ATCC 24631	toxina T-2, HT-2, DAS y neosolanol	MT 0,32	T 2,2	N 5,2 \pm 2,9	T 12,5 \pm 0,4	D 1,3	D 1,7	MT 1/32	MT 100 %	
F. graminearum NRRL 6101	zearalenona y vomitoxina	T 0,70	N 0,5	T 14,8 \pm 5,9	MT 20,0 \pm 1,0	N 0	N 0	D 1/4	T 83 %	
F. graminearum NRRL 6207	zearalenona y vomitoxina	D 0,80	N 0,5	T 15,9 \pm 6,9	MT 22,9 \pm 2,6	D 1,9	MT 12,0	D 1/4	T 83 %	

* diámetro del halo no coloreado

** diferencia entre diámetro cepa M 45 y H 17

*** máxima dilución hemolítica

xx Ver "Materiales y Métodos".

N = No tóxico.

D = Débilmente tóxico.

T = Tóxico.

MT = Muy tóxico.

P. citrinum no presentó acción genotóxica, no respondió al ensayo REC ni al bioensayo con B. thuringiensis. Posiblemente sea productor de algún metabolito que neutralice la acción de la citrinina, o la concentración de ésta en el extracto, se encontraba por debajo de la mínima para obtener respuesta en los bioensayos.

F. graminearum NRRL 6101 y F. graminearum NRRL 6207, productores ambos de zearalenona y vomitoxina, manifestaron un comportamiento semejante en la mayoría de los bioensayos; sin embargo la cepa 6207 mostró un alto poder mutagénico. Probablemente sea productora de otro metabolito, que por sí mismo o por acción sinérgica sobre zearalenona o vomitoxina, sea el responsable de la acción mutagénica observada. Este efecto se vio disminuido por la activación metabólica en el ensayo REC:

La inhibición en la germinación de L. sativum fue especialmente sensible a los tricotecenos, si bien resultó afectada, pero en menor grado, por otras micotoxinas, como aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina y patulina. Esto está de acuerdo con lo observado por Tabbache (300).

Los tricotecenos presentaron una acción significativa en el ensayo de hemólisis, no siendo hemolíticas las aflatoxinas ni la esterigmatocistina.

En cuanto al ensayo de letalidad en embrión de pollo, los resultados encontrados concuerdan con los hallados por Veselý (276), observándose alta letalidad frente a toxina T-2. No se constató efecto letal frente a citrinina; es sabido que se necesita una dosis de $10 \mu\text{g}$ de esta toxina para obtener letalidad, mientras que con sólo $0,01 \mu\text{g}$ de toxina T-2 se obtie

ne el mismo efecto (276).

La Tabla 8 presenta los géneros fúngicos que se aislaron de las distintas fuentes alimenticias.

Si bien no se realizó un estudio cuantitativo de la contaminación (por no ser objeto de este trabajo) se observa que de sorgo y maíz se aislaron la mayoría de los hongos (35 % y 29 % respectivamente).

Por otra parte se constata la prevalencia de Penicillium (41 % de las cepas aisladas) siendo contaminante de todos los tipos de alimentos analizados.

Entre los géneros más frecuentes siguen en orden de importancia Fusarium con 26 % y Aspergillus con 23 % de las cepas aisladas.

El resto de los hongos contaminantes pertenecieron a los géneros: Curvularia, Alternaria, Bipolaris, Rhizopus, Geotrichum y Cladosporium.

Comparando estos resultados con los obtenidos por otros investigadores en el país y en el extranjero se observa que: Varsavsky y col. (301) reportaron los hongos aislados de alimentos balanceados para aves y materias primas (maíz, maní, sorgo, lino, gluten, sangre desecada, harina de carne y pescado) en criaderos y molinos de la provincia de Entre Ríos entre 1975-1976, encontrando prevalencia de Aspergillus frente a Penicillium. No se aislaron otros géneros fúngicos dado que se utilizó para el aislamiento un medio con alta concentración osmótica que resulta selectivo para los géneros antes mencionados.

Lurá en su tesis doctoral (302) estudió la contaminación

TABLA 8: Aislamiento de hongos a partir de distintos alimentos.

GENERO	F U E N T E											TOTAL
	MAIZ	TRIGO	ARROZ	SOJA	SORGO	PAPAS	PASTAS	MANTECA	QUESO	TOTAL		
PENICILLIUM	12	2	3	1	13	1	2	4	3	41		
FUSARIUM	7	2	1	-	11	5	-	-	-	26		
ASPERGILLUS	10	3	1	1	6	-	2	-	-	23		
CURVULARIA	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2		
ALTERNARIA	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2		
BIPOLARIS	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1		
RHIZOPUS	1	-	-	-	1	-	-	-	-	2		
GEOTRICHUM	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2		
CLADOSPORIUM	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1		
T O T A L	29	7	5	4	35	6	4	4	6	100		

fúngica en alimentos para aves que se comercializaban en Santa Fe entre 1979-1980. Analizó alimentos peleteados y sin peletear, expeller y afrecho de distintos granos (maíz, sorgo, avena, arroz, trigo, maní y girasol), observando que Aspergillus se encontraba en un 49,5 %, Penicillium en un 36 % y Fusarium en un 4,4 % de las muestras analizadas. El resto de los hongos contaminantes (10,1 %) resultaron Alternaria, Phoma, Phyllosticta, Mucor y Rhizopus. El aislamiento se llevó a cabo moliendo los alimentos, diluyendo y sembrando en extracto de malta agarizado, con el agregado de cloranfenicol para inhibir el desarrollo bacteriano.

Umansky y Bracalenti llevaron a cabo un estudio realizado entre 1981 y 1982 (303) en muestras de alimentos para cerdos, provenientes de criaderos del sur de la provincia de Santa Fe (maíz, trigo, sorgo y concentrado de expeller). La metodología aplicada para el aislamiento de los hongos fue similar a la utilizada por Lurá (302), habiéndose empleado diferentes medios de cultivo. Observaron que Aspergillus y Penicillium eran los hongos más frecuentemente encontrados, hallándose en casi la totalidad de las muestras. Fusarium aparecía con menor frecuencia. Los hongos contaminantes restantes pertenecían a los géneros Scopulariopsis, Trichosporium, Cephalosporium y Absidia.

Comparando los resultados anteriormente expuestos, obtenidos por otros investigadores en la zona cercana a Santa Fe, con los presentados en el presente trabajo, se observa en éste que la contaminación con Fusarium fue más significativa en contrándose Aspergillus en tercer orden de importancia.

La mayor contaminación con Fusarium podría ser consecuencia de las condiciones climáticas y de las inundaciones sufridas en la zona previas al muestreo. (El muestreo del presente trabajo fue realizado entre 1984-1986).

En cuanto a la contaminación fúngica en papas Hassan (304) en su tesis doctoral constató que Fusarium era contaminante en un 50 % de la cosecha de papas francesas del año 1980. Los otros contaminantes en orden de importancia eran: Penicillium, Alternaria, Cladosporium, Mucor, Verticillium, Gliocladium y Paecylomyces. No aisló Aspergillus en ninguna de las muestras. Estos datos son concordantes con los presentados en la Tabla 8.

En relación a productos lácteos, Carini (305) en un estudio de flora fúngica en quesos italianos, observó en concordancia con este trabajo, prevalencia de Geotrichum y Penicillium, encontrando además, Aspergillus, Oospora, Mucor, Cladosporium y Fusarium.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa también contaminación con Cladosporium en quesos, que por otra parte no fue aislado de ninguno de los otros alimentos estudiados.

Cabe destacar finalmente la existencia de concordancia en los 3 géneros predominantes encontrados, Penicillium, Fusarium y Aspergillus entre este trabajo y la Revisión sobre flora fúngica y micotoxinas en alimentos en general realizado por Zhen-Zhen en China en el período 1976-1986 (306).

La Tabla 9 presenta la toxicidad de los extractos fúngicos en relación a la fuente alimenticia de la cual los hongos

TABLA 9: Toxicidad de los extractos fúngicos en relación a la fuente alimenticia.

GENERO	F U E N T E											TOTAL
	MAIZ	TRIGO	ARROZ	SOJA	SORGO	PAPAS	PASTAS	MANTECA	QUESO			
PENICILLIUM	10/12	2/2	3/3	1/1	9/13	1/1	1/2	3/4	2/3			32/41
FUSARIUM	5/7	0/2	1/1	-	7/11	2/5	-	-	-			15/26
ASPERGILLUS	7/10	0/3	0/1	1/1	2/6	-	1/2	-	-			11/23
CURVULARIA	-	-	-	-	1/2	-	-	-	-			1/2
ALTERNARIA	-	-	-	0/1	1/1	-	-	-	-			1/2
BIPOLARIS	-	-	-	-	1/1	-	-	-	-			1/1
RHIZOPUS	0/1	-	-	-	0/1	-	-	-	-			0/2
GEOTRICHUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/2			0/2
CLADOSPORIUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1			0/1
T O T A L	22/30	2/7	4/5	2/3	21/35	3/6	2/4	3/4	2/6			61/100

^a / ^b expresa el número de cepas toxicogénicas con respecto al número total de extractos analizados.

fueron aislados.

Los estudios toxicológicos fueron realizados a partir de extractos de hongos cultivados en medios definidos como "Ecológicos". (Ver "Materiales y Métodos")

El solvente utilizado para la extracción de las toxinas fue cloroformo, siendo el aconsejado para el estudio de capacidad toxicogénica por Siriwardana (19), Scott (296), Bracalenti (307) y Veselý (308) entre otros.

Por otra parte, los extractos evaporados fueron tratados 10 minutos a 80°C destruyéndose así los metabolitos poco resistentes al calor.

Se observa que el 61 % de los hongos aislados manifestaron toxicidad.

Penicillium presentó el mayor porcentaje de cepas toxicogénicas 78,04 (32 cepas respecto de un total de 41 cepas aisladas).

Fusarium resultó toxicogénico en un 57,69 % (15 cepas sobre 26 aisladas).

Aspergillus demostró capacidad toxicogénica en un 47,82 % (11 cepas sobre 23 aisladas).

El número de cepas aisladas de Rhizopus, Geotrichum y Cladosporium fue bajo, resultando éstos no toxicogénicos.

Tabbache en su tesis doctoral (300) encontró sobre 360 cepas aisladas de diversos alimentos franceses entre 1979-1980 que el 56,7 % resultaron toxicogénicos utilizando como bioensayo L. sativum.

Veselý (308) estudió 720 cepas aisladas de diversos alimentos para humanos y animales y materias primas, en Checoslo

vaquía, entre 1979 y 1982. Investigó la capacidad toxicogénica de las mismas en embrión de pollo y constató que el 67,5 % de las cepas eran toxicogénicas. El 43,9 % producía micotoxinas identificadas, el 23,6 % producía metabolitos tóxicos no identificados y el 32,5 % eran no toxicogénicos.

Si se comparan los resultados obtenidos por Tabbache y Veselý con los obtenidos en este trabajo, se constata que en los 3 casos, más del 50 % de cepas resultaron toxicogénicas y que las diferencias no son significativas.

Las Tablas 10, 11 y 12 presentan las respuestas toxicológicas de los extractos fúngicos en relación a la fuente alimenticia, diferenciando entre respuestas "Débilmente tóxica", "Tóxica" y "Muy tóxica".

En la Figura 3 se pueden visualizar estos resultados en porcentaje para los géneros Penicillium, Fusarium y Aspergillus.

En la Tabla 10 se observa que el 8 % de los hongos aislados resultaron "Débilmente tóxicos". Penicillium en un 14,63 % (6 cepas sobre 41 aisladas), Fusarium en un 3,85 % (1 cepa sobre 26 aisladas), Aspergillus en un 4,35 % (1 cepa sobre 23 aisladas).

En la Tabla 11 se constata que el 42 % de los extractos manifestaron respuesta "Tóxica". Penicillium en un 48,78 % (20 cepas sobre 41 aisladas), Fusarium en un 34,62 % (9 cepas sobre 26 aisladas) y Aspergillus en un 39,13 % (9 sobre 23 cepas aisladas).

En la Tabla 12 se observa que el 11 % de los extractos resultaron "Muy tóxicos". Penicillium en un 14,63 % (6 cepas

TABLA 10: Respuesta "Débilmente tóxica" de los diferentes extractos fúngicos en relación a la fuente alimenticia.

GENERO	F U E N T E											TOTAL
	MAIZ	TRIGO	ARROZ	SOJA	SORGO	PAPAS	PASTAS	MANTECA	QUESO			
PENICILLIUM	0/12	0/2	0/3	0/1	4/13	1/1	0/2	1/4	0/3			6/41
FUSARIUM	0/7	0/2	0/1	-	1/11	0/5	-	-	-			1/26
ASPERGILLUS	0/10	0/3	0/1	1/1	0/6	-	0/2	-	-			1/23
CURVULARIA	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-			0/2
ALTERNARIA	-	-	-	0/1	0/1	-	-	-	-			0/2
BIPOLARIS	-	-	-	-	0/1	-	-	-	-			0/1
RHIZOPUS	-	-	-	0/1	0/1	-	-	-	-			0/2
GEOTRICHUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/2			0/2
CLADOSPORIUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1			0/1
T O T A L	0/29	0/7	0/5	1/4	5/35	1/6	0/4	1/4	0/6			8/100

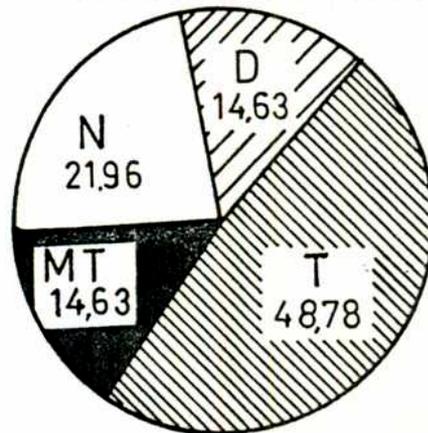
TABLA 11: Respuesta "Tóxica" de los diferentes extractos fúngicos en relación a la fuente alimenticia.

GENERO	F U E N T E											TOTAL
	MAIZ	TRIGO	ARROZ	SOJA	SORGO	PAPAS	PASTAS	MANTECA	QUESO			
PENICILLIUM	8/12	1/2	2/3	0/1	5/13	0/1	1/2	1/4	2/3			20/41
FUSARIUM	2/7	0/2	1/1	-	5/11	1/5	-	-	-			9/26
ASPERGILLUS	5/10	0/3	1/1	0/1	2/6	-	1/2	-	-			9/23
CURVULARIA	-	-	-	-	1/2	-	-	-	-			1/2
ALTERNARIA	-	-	-	0/1	1/1	-	-	-	-			1/2
BIPOLARIS	-	-	-	-	1/1	-	-	-	-			1/1
RHIZOPUS	-	-	-	0/1	0/1	-	-	-	-			0/2
GEOTRICHUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/2			0/2
CLADOSPORIUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1			0/1
T O T A L	15/29	1/7	4/5	0/4	16/35	1/6	2/4	1/4	2/6			42/100

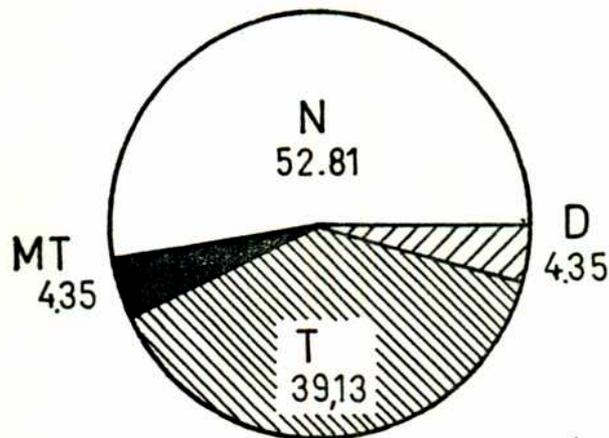
TABLA 12: Respuesta "Muy tóxica" de los diferentes extractos fúngicos en relación a la fuente alimenticia.

GENERO	F U E N T E											TOTAL
	MAIZ	TRIGO	ARROZ	SOJA	SORGO	PAPAS	PASTAS	MANTECA	QUESO			
PENICILLIUM	2/12	1/2	1/3	1/1	0/13	0/1	0/2	1/4	0/3			6/41
FUSARIUM	3/7	0/2	0/1	-	1/11	1/5	-	-	-			5/26
ASPERGILLUS	1/10	0/3	0/1	0/1	0/6	-	0/2	-	-			1/23
CURVULARIA	-	-	-	-	0/2	-	-	-	-			0/2
ALTERNARIA	-	-	-	0/1	0/1	-	-	-	-			0/2
BIPOLARIS	-	-	-	-	0/1	-	-	-	-			0/1
RHIZOPUS	-	-	-	0/1	0/1	-	-	-	-			0/2
GEOTRICHUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/2			0/2
CLADOSPORIUM	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1			0/1
T O T A L	6/29	1/7	0/5	1/4	1/35	1/6	0/2	1/4	0/6			11/100

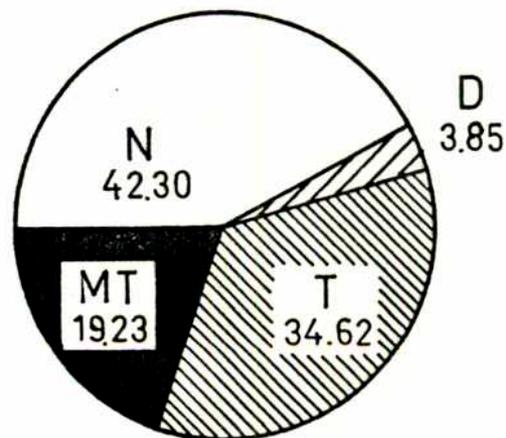
Figura 3: Evaluación de la capacidad toxicogénica de los hongos aislados de alimentos.



PENICILLIUM



ASPERGILLUS



FUSARIUM

sobre 41 aisladas), Fusarium en un 19,23 % (5 cepas sobre 26) y Aspergillus en un 4,35 % (sólo 1 cepa sobre 23 aisladas).

Finalmente es de destacar que Penicillium presentó el mayor número de cepas productoras de micotoxinas siendo Fusarium el que manifestó el porcentaje más alto de cepas "Muy tóxicogénicas".

La Tabla 13 presenta la respuesta de los bioensayos frente a los extractos toxicogénicos del género Penicillium.

Se observa que una gran variedad de especies resultaron toxicogénicas:

P. citrinum (6 cepas), de maíz, soja, arroz y manteca; P. cyclopium (6 cepas), de maíz, sorgo, papas, queso y manteca; P. notatum (6 cepas), de maíz, arroz, trigo y queso; P. variable (3 cepas) de sorgo; P. duclauxii (3 cepas) de maíz; P. lividum (2 cepas) de pastas y arroz; P. steckii (1 cepa) de sorgo; P. chrysogenum (1 cepa) de trigo; P. rubrum (1 cepa) de manteca; P. funiculosum (1 cepa) de sorgo; P. oxalicum (1 cepa) de maíz y P. implicatum (1 cepa) de sorgo.

La tabla muestra que se obtuvieron respuestas toxicológicas distintas entre las diferentes cepas de una misma especie (aisladas ya sea de un mismo alimento o de alimentos distintos).

La producción de metabolitos genotóxicos por parte de cepas de P. implicatum, P. citrinum, P. cyclopium, P. notatum, P. variable, P. lividum y P. steckii, está en concordancia con los datos presentados por Cole (20) y por Stark (299). La acción genotóxica hallada en P. oxalicum, no ha sido descrita en la bibliografía consultada, si bien esta especie es re-

TABLA 13: Respuesta de los Ensayos Biológicos frente a los extractos de las cepas toxicogénicas del género Penicillium aisladas.

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S								HEMOLISIS	E. POLLO
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		S/F.M.	Hemolisis		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.				
FUNICULOSUM	sorgo	D	D	D	D	N	N	T	D	D	
OXALICUM	maíz	D	D	D	T	T	T	MT	D	D	
NOTATUM	arroz	D	D	T	T	MT	MT	MT	N	D	
NOTATUM	maíz	T	D	D	MT	N	N	N	T	D	
CITRINUM	maíz	D	N	N	N	T	T	T	T	N	
CHRYSOGENUM	trigo	D	N	N	N	N	N	N	MT	N	
NOTATUM	trigo	T	D	N	N	N	N	N	T	D	
NOTATUM	trigo	T	D	D	D	N	N	N	N	D	
CYCLOPIUM	sorgo	D	D	D	D	N	N	N	N	N	
CITRINUM	soja	N	N	N	D	MT	MT	MT	MT	N	
VARIABLE	sorgo	D	D	N	N	N	N	N	D	D	

N: No Tóxico D: Débilmente Tóxico T: Tóxico MT: Muy Tóxico (continúa)

TABLA 13 (Continuación)

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S									
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		HEMOLISIS	E. POLLO		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.				
LIVIDUM	pastas	T	D	D	T	N	N	D	D		
CITRINUM	arroz	T	D	N	D	N	N	N	D		
STECKII	sorgo	N	D	D	T	T	D	T	D		
LIVIDUM	sorgo	N	D	D	D	N	N	N	D		
CYCLOPIUM	papas	D	D	N	N	N	N	N	N		
IMPLICATUM	sorgo	N	T	D	D	T	N	N	D		
CITRINUM	arroz	T	T	N	T	N	N	N	T		
CYCLOPIUM	maíz	D	N	D	D	N	N	T	N		
DUCLAUXII	maíz	T	D	D	T	N	T	D	D		
DUCLAUXII	maíz	T	D	N	N	N	N	N	D		
DUCLAUXII	maíz	T	D	D	T	N	T	D	D		

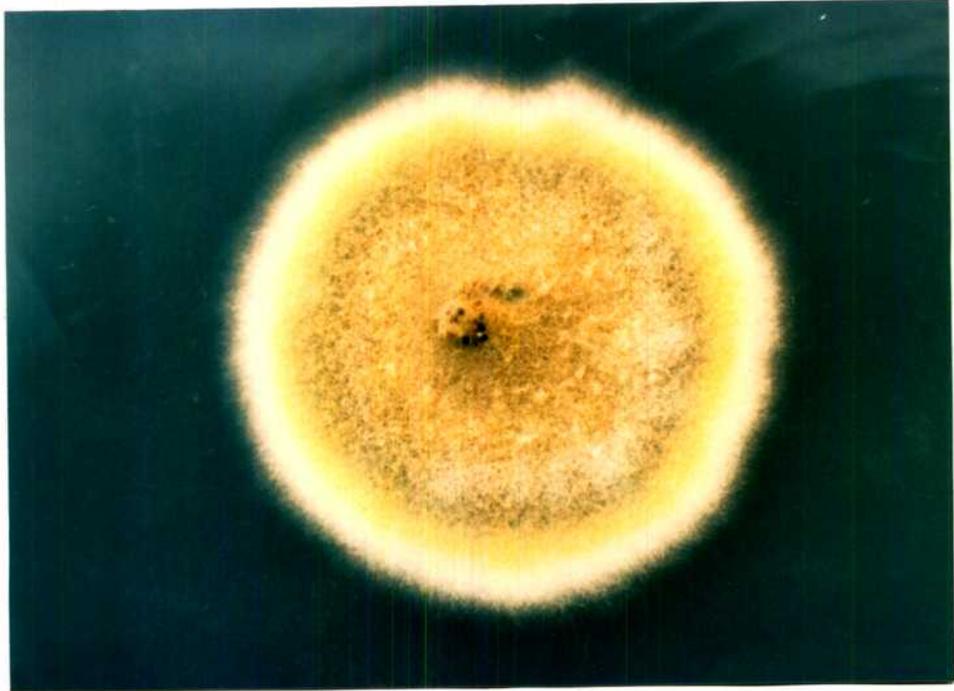
(continúa)

TABLA 13 (Continuación)

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S									
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		HEMOLISIS	E. POLLO		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.				
VARIABLE	sorgo	D	D	N	D	N	N	T	N	N	
VARIABLE	sorgo	N	D	D	D	N	N	N	N	N	
NOTATUM	maíz	T	D	D	D	N	N	N	N	D	
NOTATUM	queso	T	D	N	D	N	N	N	N	N	
CYCLOPIUM	queso	N	D	D	D	N	N	T	N	D	
RUBRUM	manteca	T	D	N	N	N	N	D	N	N	
CYCLOPIUM	manteca	N	T	D	D	N	N	MT	N	T	
CITRINUM	manteca	N	D	D	D	N	N	N	N	D	
CYCLOPIUM	maíz	D	D	D	T	N*	N	D	N	D	
CITRINUM	maíz	N	D	D	T	T	T	D	T	N	

* Acción antibiótica.

Penicillium duclauxii



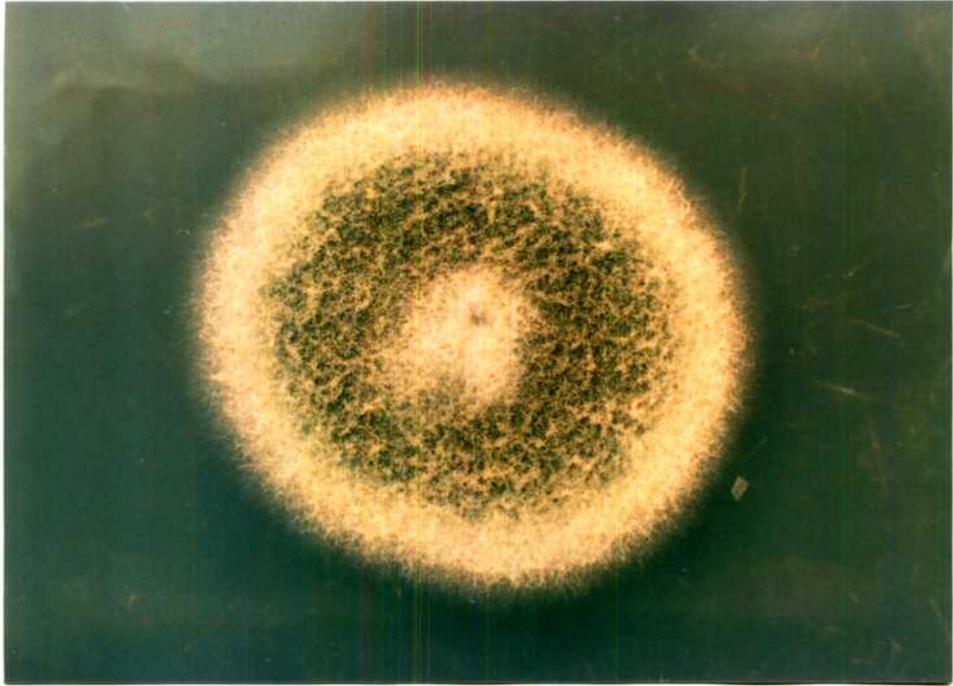
Colonia de 10 días de desarrollo en medio Czapek agarizado.



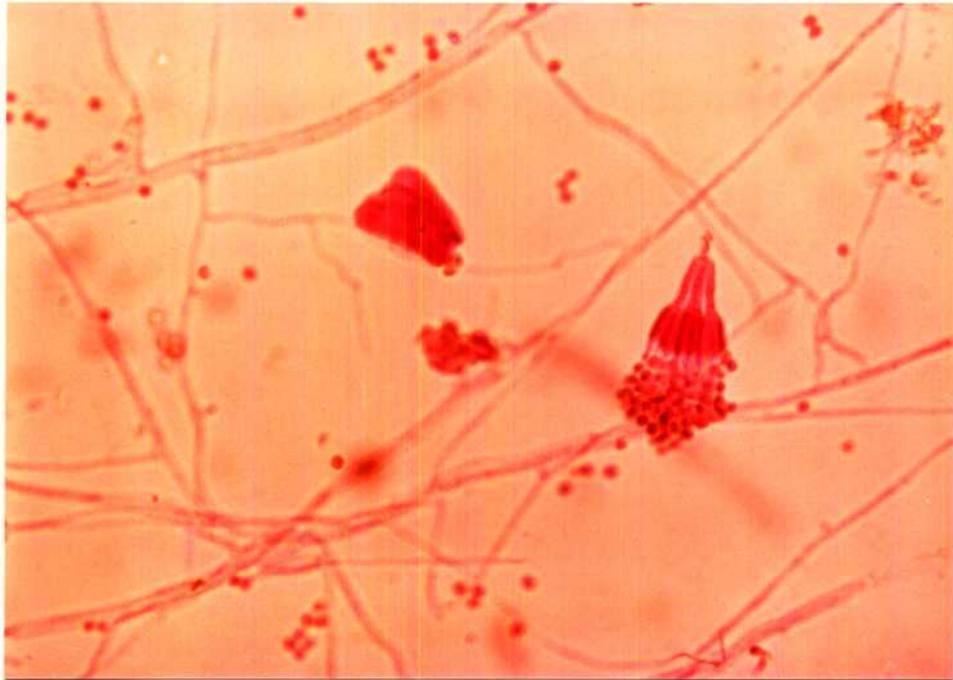
Vista microscópica.

Detalle de un pincel biverticilado simétrico.

Penicillium funiculosum



Colonia de 10 días de desarrollo en medio Czapek agarizado.



Vista microscópica.

Detalle de un pincel biverticilado simétrico.

conocida como capaz de producir metabolitos tóxicos

P. funiculosum, es sólo descripto por Veselý (308) como especie toxicogénica, no habiendo logrado identificar el metabolito responsable de la toxicidad.

Finalmente, P. duclauxii no es considerada especie toxicogénica según la literatura consultada. En el presente trabajo se observa que cepas de esta especie mostraron toxicidad en la mayoría de los bioensayos y que la acción mutagénica observada en el ensayo REC desapareció cuando se trabajó con fracción microsomal.

La Tabla 14 presenta la respuesta de los ensayos biológicos frente a los extractos de las cepas toxicogénicas del género Fusarium.

A diferencia de lo observado con el género Penicillium se aislaron sólo cepas toxicogénicas de 3 especies diferentes (F. moniliforme, F. semitectum y F. solani).

Se observa al igual que en la tabla anterior, que las diferentes cepas de una misma especie (aisladas ya sea de un alimento o distintos alimentos), manifestaron respuestas toxicológicas distintas.

F. moniliforme resultó el contaminante toxicogénico más frecuente (11 cepas sobre 26 cepas de Fusarium estudiadas), habiendo sido aislado de maíz, sorgo, papas y arroz.

F. semitectum resultó contaminante toxicogénico sólo en sorgo (2 cepas sobre 26 cepas de Fusarium estudiadas), manifestando una toxicidad menor que F. moniliforme.

F. solani resultó contaminante toxicogénico en papas, ha

TABLA 14: Respuesta de los Ensayos Biológicos frente a los extractos de las cepas toxicogénicas del género Fusarium.

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S							
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		HEMOLISIS E. POLLO	
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.		
MONILIFORME	maíz	N	D	MT	T	N	N	T	D
MONILIFORME	maíz	D	D	D	T	N	N	T	D
MONILIFORME	sorgo	T	D	N	N	N	T	T	N
MONILIFORME	maíz	D	D	D	D	MT	MT	D	D
MONILIFORME	sorgo	T	D	D	D	N	N	D	D
SEMITECTUM	sorgo	D	N	N	T	N*	N	D	N
MONILIFORME	maíz	MT	D	D	T	T	N	D	D
MONILIFORME	maíz	T	N	N	N	T	N	N	N
SOLANI	papas	N	N	N	N	T	T	T	N
SEMITECTUM	sorgo	D	N	D	T	N*	N	N	N
MONILIFORME	sorgo	T	D	D	T	MT	MT	T	N

N: No Tóxico. D: Débilmente Tóxico. T: Tóxico. MT: Muy Tóxico. (Continúa)

* Acción antibiótica.

TABLA 14 (Continuación)

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S								HEMOLISIS	E. POLLO
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		S/F.M.	HEMOLISIS		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.				
MONILIFORME	sorgo	N	D	D	D	T	T	T	D	D	
MONILIFORME	sorgo	N	N	T	T	N	N*	N*	T	D	
MONILIFORME	arroz	T	D	T	T	T	MT	MT	T	D	
SOLANI	papas	T	T	D	T	T	MT	MT	N	T	

* Acción antibiótica.

biendo demostrado al igual que F. moniliforme capacidad mutagénica.

La Tabla 15 presenta la respuesta de los bioensayos frente a los extractos toxicogénicos del género Aspergillus.

Se observa que fueron aisladas cepas toxicogénicas de 7 especies diferentes (A. fumigatus, A. niger, A. flavus, A. parasiticus, A. chevalieri, A. candidus y A. terreus). Sólo A. chevalieri y A. candidus no fueron aislados de maíz.

Se constata al igual que en las Tablas 13 y 14 que las diferentes cepas de una misma especie (aisladas ya sea de un mismo alimento o alimentos diferentes) manifestaron respuestas toxicológicas distintas.

A. flavus y A. parasiticus se comportan en forma distinta a las cepas controles. Es probable que estas cepas en las condiciones estudiadas sean productoras a su vez de otros metabolitos como ácido cyclopiazónico, paxilline, fumigaclavine, ácido 3 nitropropiónico (20).

La producción de metabolitos mutagénicos por parte de cepas de A. fumigatus no ha sido descrita en la bibliografía consultada si bien se sabe que es capaz de producir metabolitos tóxicos no mutagénicos tales como: verruculógeno, gliotoxín, tryptoquivalinas, TR-2, hyalodendrin, fumigacín, fumigalín y fumitremorginas (20).

La Tabla 16 muestra la respuesta de los ensayos biológicos frente a los extractos de las cepas toxicogénicas restantes (pertenecientes a los géneros Curvularia, Alternaria y Bipolaris).

Estas cepas que fueron aisladas únicamente de sorgo se

TABLA 15: Respuesta de los ensayos biológicos frente a los extractos de las cepas toxicogénicas del género Aspergillus

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S								E. POLLO
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		HEMOLISIS		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.			
FUMIGATUS	sorgo	N	D	T	D	N	N	N	N	D
NIGER	maíz	D	T	T	D	N	N	N	N	T
FLAVUS	maíz	N	D	D	D	T	T	T	T	D
PARASITICUS	maíz	N	N	D	MT	N	N	N	N	N
PARASITICUS	maíz	D	D	N	N	N	N	N	T	D
CHEVALIERI	soja	N	D	N	N	N	N	N	D	N
FLAVUS	pastas	D	D	N	D	N	N	N	T	D
CANDIDUS	sorgo	D	D	D	T	N	N	N	T	D
TERREUS	maíz	T	N	D	MT	N	N	N	T	D
NIGER	maíz	N	N	D	T	N	N	N	D	N
FUMIGATUS	maíz	D	N	N	N	N	T	T	D	N

N: No Tóxico. D: Débilmente Tóxico. T: Tóxico. MT: Muy Tóxico.

TABLA 16: Respuesta de los ensayos biológicos frente a los extractos de las cepas toxicogénicas de los géneros Curvularia, Alternaria y Bipolaris.

ESPECIE	FUENTE	E N S A Y O S B I O L O G I C O S									
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		HEMOLISIS	E. POLLO		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.				
CURVULARIA LUNATA	sorgo	D	D	D	D	N	N	N	T	D	
ALTERNARIA TENUIS	sorgo	N	D	T	T	N	N	N	T	D	
BIPOLARIS sp.	sorgo	T	N	D	T	N	N	N	T	N	

N: No Tóxico. D: Débilmente Tóxico. T: Tóxico. MT: Muy Tóxico.

caracterizaron por tener respuestas semejantes en los ensayos para determinar capacidad genotóxica (elongación en B. thuringiensis y ensayo REC) como así también en los estudios de hemólisis.

La Tabla 17 muestra las respuestas toxicológicas positivas de los bioensayos frente a los extractos fúngicos.

Se observa que el 48 % de los extractos respondió inhibiendo el crecimiento de B. thuringiensis, manifestando éste un alto grado de sensibilidad hacia los metabolitos tóxicos concordando con lo observado por Boutibonnes (225).

Las células VERO fueron inhibidas frente al 46 % de los extractos.

L. sativum y Hemólisis dieron respuesta positiva en el 42 % de los extractos.

Se observó letalidad en E. pollo en el 39 % de los casos.

La elongación de células de B. thuringiensis resulta ser más sensible a los agentes genotóxicos que el ensayo REC (ya sea con o sin activación metabólica). Se observa también que la fracción microsomal, en general, desactiva los metabolitos mutagénicos siendo menor la transformación de promutágenos en mutágenos.

La Tabla 18 muestra el grado de coincidencia en las respuestas de los bioensayos frente a los extractos estudiados.

Se constata que sólo cepas de Penicillium y Fusarium respondieron a la totalidad de los bioensayos utilizados. Penicillium en un 9 % (4 cepas sobre 41 cepas del género), Fusarium en un 11 % (3 cepas sobre 26 cepas del género). Y que del total de los extractos sólo el 7 % respondió a todos los

TABLA 17: Respuesta toxicológica positiva de los Ensayos Biológicos frente a los extractos de los hongos aislados.

GENERO	N° CEPAS AISLADAS	E N S A Y O S B I O L O G I C O S									
		L. sativum	CEL. VERO	B. thuringiensis		REC		HEMOLISIS	E. POLLO		
				Elong.	Inh.	C/F.M.	S/F.M.				
PENICILLIUM	41	23	27	20	25	7	9	19	21		
FUSARIUM	26	11	10	11	12	8	7	12	9		
ASPERGILLUS	23	6	7	7	8	1	2	8	7		
ALTERNARIA	2	-	1	1	1	-	-	1	1		
CURVULARIA	2	1	1	1	1	-	-	1	1		
BIPOLARIS	1	1	-	1	1	-	-	1	-		
RHIZOPUS	2	-	-	-	-	-	-	-	-		
GEOTRICHUM	2	-	-	-	-	-	-	-	-		
CLADOSPORIUM	1	-	-	-	-	-	-	-	-		
Totales	100	42	46	41	48	16	18	42	39		

TABLA 18: Grado de coincidencia en las respuestas de los bioensayos frente a los extractos fúngicos estudiados.

GENERO	N° CEPAS AISLADAS	RESP. POSITIVA A 6 ENSAYOS	RESP. POSITIVA A 5 ENSAYOS	RESP. POSITIVA A 4 ENSAYOS	RESP. POSITIVA A 1, 2 y 3 ENSAYOS	RESPUESTAS NEGATIVAS
PENICILLIUM	41	4	5	10	13	9
FUSARIUM	26	3	5	2	5	11
ASPERGILLUS	23	-	3	3	5	12
ALTERNARIA	2	-	-	1	-	1
CURVULARIA	2	-	1	-	-	1
BIPOLARIS	1	-	-	-	1	-
RHIZOPUS	2	-	-	-	-	2
GEOTRICHUM	2	-	-	-	-	2
CLADOSPORIUM	1	-	-	-	-	1
Totales	100	7	14	16	24	39

bioensayos.

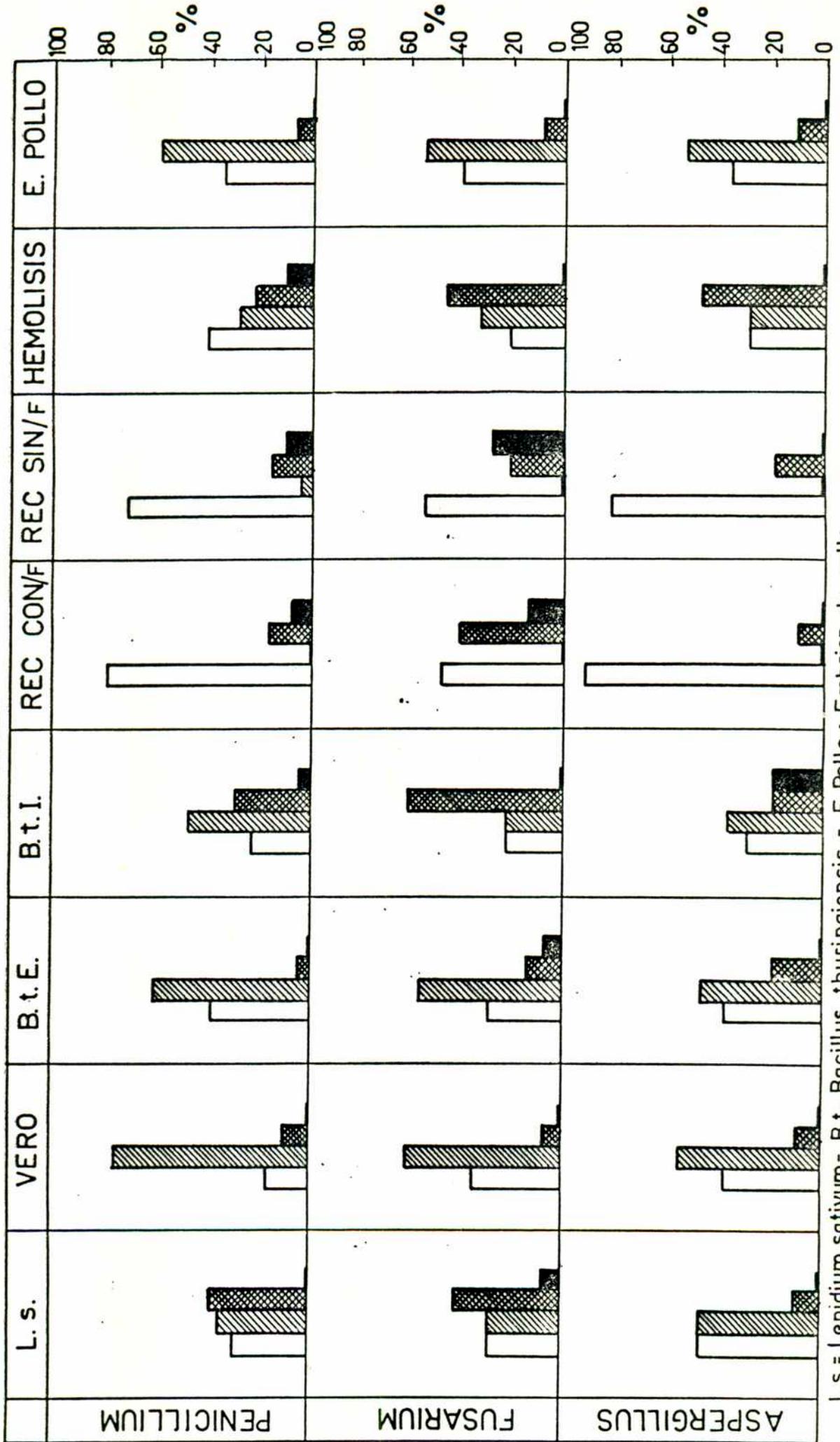
Se observa que el 14 % del total de los extractos respondió a 5 ensayos (Penicillium, Fusarium y Curvularia).

El 16 % del total de los extractos respondió a 4 bioensayos (Penicillium, Fusarium, Aspergillus y Alternaria).

El 24 % del total de los extractos respondieron sólo a 1, 2 ó 3 bioensayos y el 39 % no respondió a ninguno de ellos.

En la Figura 4 se visualizan las respuestas toxicológicas de los géneros contaminantes más frecuentes (Penicillium, Fusarium y Aspergillus) frente a los bioensayos.

Figura 4 :



L.s.= Lepidium sativum- B.t. Bacillus thuringiensis = E.Pollo : Embrión de pollo

□ No toxico - ▨ Debilmente toxico - ▩ Toxico - ■ Muy toxico

III.2. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

Para la hipótesis que los 8 bioensayos responden de igual forma:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^8 \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

La distribución muestral de H es aproximadamente una ley de χ^2 con k-1 (7) grados de libertad

$$R_1 = 14355,5$$

$$R_5 = 7778$$

$$R_2 = 17501$$

$$R_6 = 8056,5$$

$$R_3 = 15584,5$$

$$R_7 = 13696$$

$$R_4 = 15298$$

$$R_8 = 15610,5$$

$$H = \frac{12 \times 1545943427}{464 \times 465 \times 58} - 3 \times 465 = 87,435874$$

Si los grados de libertad son 7

$$\chi_{0,995}^2 \text{ tabulada} = 20,3$$

Luego se rechaza la hipótesis que los 8 bioensayos se comportan de igual forma.

Para la hipótesis que 2 bioensayos responden de igual forma, se calcularon los |t| y si éstos eran mayor de 1,96 se rechazó la hipótesis planteada.

Inhibición en células Vero versus Inhibición en Embrión de pollo

$$t = 1,099. \text{ (Se comportan de igual forma)}$$

Elongación en *B. thuringiensis* versus Ensayo REC con activación metabólica

$t = 4,96$. (Se comportan de distinta forma)

Elongación en *B. thuringiensis* versus Ensayo REC sin activación metabólica

$t = 4,76$. (Se comportan de distinta forma)

Hemólisis versus los otros Ensayos Biológicos realizados: los resultados se observan en la Tabla

Hemólisis Versus Otros Ensayos Biológicos.

ENSAYO BIOLÓGICO	t	COMPORTAMIENTO
L. sativum	0,54	Igual
REC Con F/M	4,55	Diferente
REC Sin F/M	4,39	Diferente
E. Pollo	-1,53	Igual
C. VERO	2,97	Diferente
<i>B. thuringiensis</i> (Elong)	1,49	Igual
<i>B. thuringiensis</i> (Inh.)	1,22	Igual

Con el propósito de disminuir en futuros trabajos el número de bioensayos a realizar, se debe tener presente:

- . Que los bioensayos con células VERO y Embrión de pollo se comportan en forma semejante, siendo el último de mayor cos

to y complejidad y no es un ensayo rápido.

- . Que la elongación en B. thuringiensis y el ensayo REC ponen en evidencia lesiones genéticas distintas y que son de fundamental importancia los estudios de genotoxicidad por tratarse de daños irreversibles.
- . Que la hemólisis se comporta como L. sativum, Embrión de pollo y B. Thuringiensis (tanto en la elongación como en la inhibición).
- . Que la elongación de B. thuringiensis se estudia en la zona límite del ensayo de inhibición del bacilo desarrollado en placa, es decir que no se puede llevar a cabo en forma independiente.

III.3. ANALISIS QUIMICOS DE MICOTOXINAS
EN LOS EXTRACTOS FUNGICOS
CORRESPONDIENTES A ESPECIES
RECONOCIDAS COMO TOXICOGENICAS

Las Tablas 19, 20, 21 y 22 presentan los resultados obtenidos en los análisis químicos por cromatografía en capa delgada en los extractos fúngicos pertenecientes a especies reconocidas toxicogénicas.

Cabe acotar que se investigaron sólo algunas de las posibles micotoxinas asociadas a las especies en estudio, dada la dificultad de disponer de estándares o metodologías que resultaran confiables en la determinación de todas las micotoxinas descritas en la bibliografía.

En la Tabla 19 se observa que existe entre los Penicillium un predominio de cepas productoras de citrinina, la que fue identificada en cepas de P. notatum, P. citrinum, P. implicatum y P. steckii. Se constata que ácido penicílico fue detectado en extractos de P. chrysogenum, P. cyclopium y P. lividum.

Se identificaron manchas con características cromatográficas similares a ácido secalónico F. en P. oxalicum, rubratoxina en P. rubrum y rugulosina en P. variable.

En la Tabla 20 se observa que F. moniliforme resultó productor de moniliformina o zearalenona o ambas al mismo tiempo según la cepa. Se constata que F. semitectum produjo sólo DAS de las micotoxinas analizadas y que en extractos de F. solani se detectó únicamente toxina T-2.

En la Tabla 21 se presentan los resultados obtenidos con

TABLA 19: Micotoxinas detectadas en los extractos de las cepas toxicogénicas de Penicillium aisladas.

ESPECIE (fuente)	MICOTOXINAS DETECTADAS	MICOTOXINAS INVESTIGADAS
P. OXALICUM (maíz)	Acido Secalónico F*	Acidos Secalónicos (20)
2 CEPAS P. NOTATUM (maíz)	Citrinina	Citrinina (296)
P. NOTATUM (queso)	Citrinina	Citrinina (296)
2 CEPAS P. NOTATUM (trigo)	Citrinina	Citrinina (296)
P. NOTATUM (arroz)	Citrinina	Citrinina (296)
P. CITRINUM (soja)	Citrinina	Citrinina (296)
2 CEPAS P. CITRINUM (maíz)	Citrinina	Citrinina (296)
2 CEPAS P. CITRINUM (arroz)	Citrinina	Citrinina (296)
P. CITRINUM (manteca)	Citrinina	Citrinina (296)
P. CHRYSOGENUM (trigo)	Acido Penicílico	Acido Penicílico (296)

* Caracterizado por Rf y aparición de color luego de rociado con distintos reactivos. No se contó con standard de toxina pura.

TABLA 19 (Continuación)

ESPECIE (fuente)	MICOTOXINAS DETECTADAS	MICOTOXINAS INVESTIGADAS
P. CYCLOPIUM (sorgo)	Acido Penicflico	Acido Cyclopiazónico (20) Patulina (296) Acido Penicflico (296)
P. CYCLOPIUM (manteca)	Acido Penicflico	
P. CYCLOPIUM (queso)	Acido Penicflico	
2 CEPAS P. CYCLOPIUM (maíz)	Acido Penicflico	
P. CYCLOPIUM (papas)	Acido Penicflico	
P. IMPLICATUM (sorgo)	Citrinina	Citrinina (296)
3 CEPAS P. VARIABLE (sorgo)	Rugulosina*	Rugulosina (20)
P. LIVIDUM (pastas)	Acido Penicflico	Acido Penicflico (296)
P. LIVIDUM (sorgo)	Acido Penicflico	Acido Penicflico (296)
P. STECKII (sorgo)	Citrinina	Citrinina (296)
P. RUBRUM (manteca)	Rubratoxina B*	Rubratoxina (20)

* Caracterizado por Rf y aparición de color luego de rociado con distintos reactivos. No se contó con standard de toxina pura.

TABLA 20: Micotoxinas detectadas en los extractos de las cepas toxicogénicas de Fusarium aisladas.

ESPECIE (fuente)	MICOTOXINAS DETECTADAS	MICOTOXINAS INVESTIGADAS
F. MONILIFORME (maíz)	Moniliformina y Zearalenona	DAS Toxina T-2 Zearalenona Moniliformina (297)
3 CEPAS F. MONILIFORME (maíz)	Moniliformina	
F. MONILIFORME (maíz)	Zearalenona	
4 CEPAS F. MONILIFORME (sorgo)	Moniliformina	
F. MONILIFORME (sorgo)	Moniliformina y Zearalenona	
F. MONILIFORME (arroz)	Zearalenona	
2 CEPAS F. SEMITECTUM (sorgo)	DAS	DAS Butenolida Fusarenon-X Neosolaniol Nivalenol Toxina T-2 Zearalenona (297)
2 CEPAS F. SOLANI (papas)	Toxina T-2	DAS Toxina HT-2 Toxina T-2 Neosolaniol Zearalenona (297)

TABLA 21: Micotoxinas detectadas en los extractos de las cepas toxicogénicas de Aspergillus aisladas.

ESPECIE (fuente)	MICOTOXINAS DETECTADAS	MICOTOXINAS INVESTIGADAS
A. FLAVUS (maíz)	Aflatoxinas (B ₁ y B ₂)	Aflatoxinas (B ₁ B ₂ G ₁ G ₂) (296)
A. FLAVUS (pastas)	Aflatoxinas (B ₁ y B ₂)	
2 CEPAS A. PARASITICUS	Aflatoxinas (B ₁ B ₂ G ₁ y G ₂)	
A. FUMIGATUS (sorgo)	Fumitremorgina B*	Verruculogeno Gliotoxin Fumitremorginas (A y B) (20)
A. FUMIGATUS (maíz)	Fumitremorgina B*	
A. NIGER (maíz)	Nigragilina*	Nigragilina (20)
A. NIGER (sorgo)	Nigragilina*	
A. TERREUS (maíz)	Patulina	Gliotoxin Patulina Citrinina (296)
A. CHEVALIERI (soja)	Gliotoxin	Gliotoxin (296)
A. CANDIDUS (sorgo)	Citrinina	Citrinina (296)

* Caracterizado por Rf y aparición de color luego de rociado con distintos reactivos. No se contó con standard de toxina pura.

extractos de Aspergillus, observándose la producción de aflatoxinas por parte de A. flavus y A. parasiticus; patulina por parte de A. terreus; citrinina por A. candidus y gliotoxina por A. chevalieri.

Sé detectaron metabolitos con características cromatográficas semejantes a Fumitremorginas en extractos de A. fumigatus y nigragilina en A. niger. Lurá (309) constató que la muerte en pollos ocasionada por alimentos contaminados artificialmente con A. niger era debida a la producción de nigragilina.

La Tabla 22 presenta las micotoxinas analizadas en C. lunata, A. tenuis y Bipolaris sp. y los resultados obtenidos. Se detectó un metabolito con características cromatográficas similares al decumbin en C. lunata y al alternariol en A. tenuis.

La cepa de Bipolaris resultó productora de esterigmatocistina.

TABLA 22: Micotoxinas detectadas en los extractos de las cepas toxicogénicas de Curvularia, Alternaria y Bipolaris.

ESPECIE (fuente)	MICOTOXINAS DETECTADAS	MICOTOXINAS INVESTIGADAS
CURVULARIA LUNATA (sorgo)	Decumbin*	Decumbin (20)
ALTERNARIA TENUIS (sorgo)	Alternariol*	Alternariol Alternariol - Monoetil éter Altenuene (20)
BIPOLARIS sp. (sorgo)	Esterigmatocistina	Esterigmatocistina (296)

* Caracterizado por Rf y aparición de color luego de rociado con distintos reactivos. No se contó con standard de la micotoxina pura.

III.4. CARACTERIZACION CROMATOGRAFICA
DE METABOLITOS TOXICOS NO
IDENTIFICADOS

La Tabla 23 presenta las características cromatográficas (Rf en 3 sistemas de solventes) de las fracciones tóxicas obtenidas según el punto II.10.

En P. funiculosum se estudiaron 2 de las 6 fracciones del extracto. La primera (que incluye el punto de siembra) por haber resultado toxicogénica en todos los bioensayos y la tercera por ser hemolítica.

En P. duclauxii se estudió sólo la cuarta fracción por haber sido la única tóxica.

En A. fumigatus y P. oxalicum se analizaron las fracciones segunda y tercera respectivamente. Estas resultaron ser genotóxicas. Por estudios en cromatografía en capa delgada se constató que la fracción mutagénica de A. fumigatus no contenía fumitremorgina B detectada en el extracto sin fraccionar. De igual forma se verificó que la fracción mutagénica de P. oxalicum no correspondía a ácido secálónico F detectado en el extracto total.

Se puede constatar en todas las fracciones tóxicas estudiadas que no se observan en los cromatogramas manchas a la luz visible ni a la luz ultravioleta y que sólo se aprecian manchas luego de un rociado con SO_4H_2 en etanol al 30 % o con p - anisaldehído (1 mancha por fracción).

Se presentan fotografías de los cromatogramas en 3 sistemas de solventes con las 5 fracciones tóxicas (2 de P. funi- culosum, 1 de P. duclauxii, 1 de A. fumigatus y 1 de P. oxali-

cum) revelados con SO_4H_2 en etanol al 30 % y observados a la luz ultravioleta de onda larga.

Por una limitación de técnica fotográfica sólo se apreciaban 4 de las 5 manchas observadas a la luz ultravioleta.

TABLA 23: Características cromatográficas de los Extractos de Hongos no reconocidos tóxicos
génicos y productores de metabolitos mutagénicos no identificados.

HONGO	FRACCIÓN TOXICA	Rf			COLOR			COLOR DESPUES DEL ROCIADO			
		Sist. Solvente			Luz Visible	Luz U. Violeta		SO ₄ H ₂ /Etanol 30%	P. Anisaldehído***	Visible	L.UV/O.L.
		1	2	3		O.L.	O.C.				
P. FUNICULOSUM	1	0,15	0,47	0,08		-		Celeste			Amarillo
	3*	0,38	0,44	0,02		-		Gris	Rosa		
P. DUCLAUXII	4	0,56	0,02	0,3		-		-	Celeste	-	Celeste
A. FUMIGATUS	2**	0,27	0,58	0,11		-		-	Amarillo	-	Rosa
P. OXALICUM	3**	0,45	0,51	0,2		-		-	Gris	-	Amarillo

Sist. Solvente 1: Tolueno - Acetato de Etilo - 90 % Acido Fórmico (6 : 3 : 1)

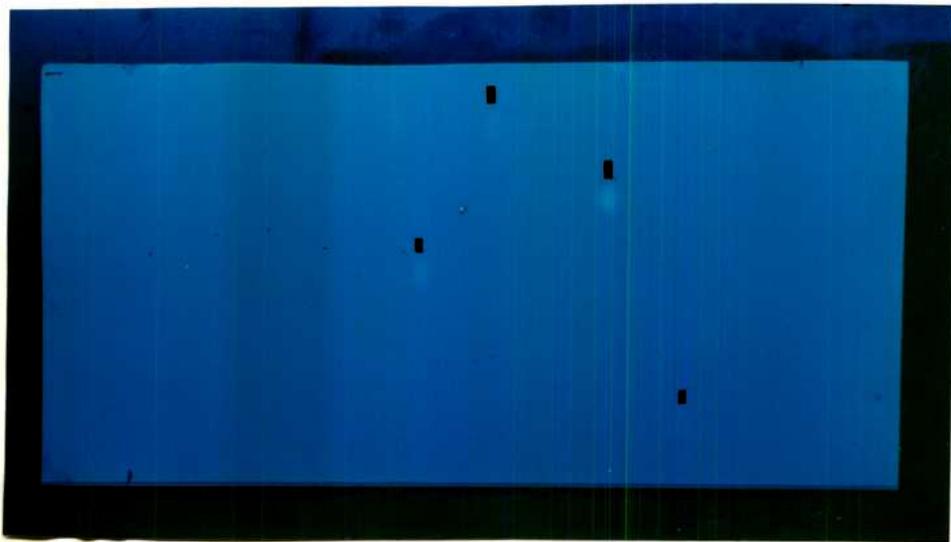
Sist. Solvente 2: Cloroformo - Acetona (9 : 1)

Sist. Solvente 3: Benceno - Ac. Acético (7 : 3)

* Fracción sólo Hemolítica.

** Fracción mutagénica.

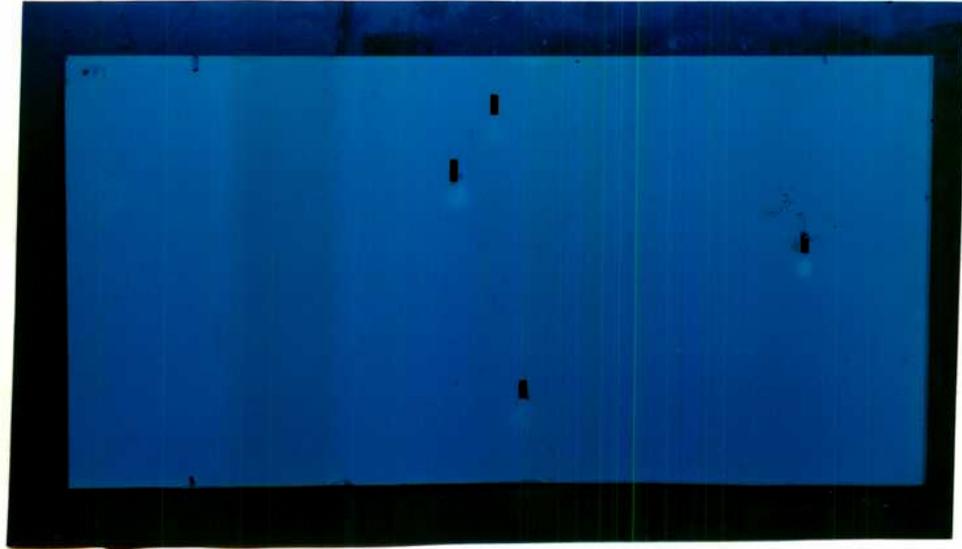
*** Preparado según Scott (296), descrito en Materiales y Métodos.



1 2 3 4 5

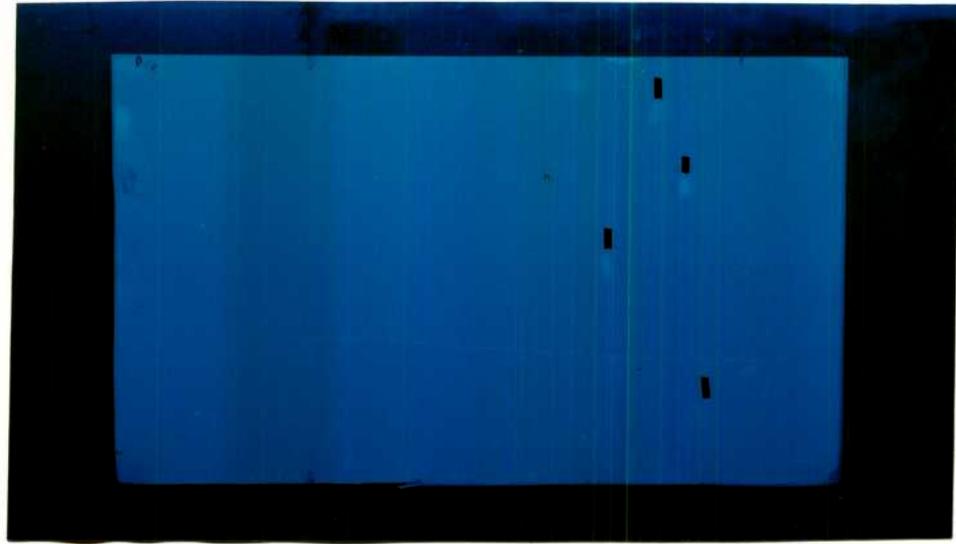
SIST. SOLV. 1

- 1 } P. funiculosum
- 2 }
- 3 P. duclauxii
- 4 A. fumigatus
- 5 P. oxalicum



1 2 3 4 5

SIST. SOLV. 2



1 2 3 4 5

SIST. SOLV. 3

IV CONCLUSIONES

C O N C L U S I O N E S

El presente trabajo constituye una contribución al conocimiento de la capacidad toxicogénica de los hongos que contaminan alimentos para consumo humano y o animal, que se procesan en la zona de influencia de la ciudad de Santa Fe.

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- . Penicillium, Fusarium y Aspergillus fueron los géneros más frecuentemente aislados a partir de las fuentes alimenticias estudiadas. Penicillium se aisló de todos los tipos de alimentos analizados.
 - Curvularia, Alternaria, Bipolaris, Rhizopus, Geotrichum y Cladosporium resultaron contaminantes poco frecuentes. La mayoría de los hongos fueron aislados a partir de sorgo y maíz.
 - . El 61 % de los hongos manifestó capacidad toxicogénica, no existiendo diferencias significativas con lo observado por Tabbache (300) y Veselý (308). El 11 % de los hongos manifestó respuesta "Muy tóxica", el 42 % "Tóxica", el 8 % "Débilmente tóxica" y el 39 % "No tóxica".
 - . Las cepas de Penicillium fueron toxicogénicas en un 78,04 %. Con respuesta "Muy tóxica" el 14,63 %, "Tóxica" el 48,78 %, "Débilmente tóxica" el 14,63 % y "No tóxica" el 21,96 %.
- Una gran variedad de especies de Penicillium manifestó capacidad toxicogénica: P. notatum, P. chrysogenum, P. cyclopium, P. citrinum, P. variable, P. rubrum, P. lividum, P. steckii, P. implicatum, P. oxalicum, P. funiculosum y

P. duclauxii.

Las cepas aisladas del género Penicillium reconocidas como toxicogénicas, produjeron micotoxinas que se encuentran con cierta frecuencia en los alimentos. Se detectó: citrinina en extractos de P. notatum, P. citrinum, P. implicatum, P. steckii y P. lividum y ácido penicílico en extractos de P. chrysogenum y P. cyclopium.

Se detectaron además metabolitos con características cromatográficas semejantes a ácido secalónico F en un extracto de P. oxalicum, rubratoxina en un extracto de P. rubrum y rugulosina en extractos de P. variable. Estas micotoxinas son consideradas contaminantes poco frecuentes en alimentos. Si bien P. oxalicum es reconocido como productor de metabolitos tóxicos, no existe en la bibliografía consultada datos sobre la producción de micotoxinas con propiedades mutagénicas. Sin embargo durante el "screening" realizado se detectó una cepa de esta especie con dichas propiedades. Se logró identificar las características cromatográficas (Rf en 3 sistemas de solventes) de la fracción del extracto que resultó genotóxica en los bioensayos.

Veselý (308) reporta cepas de P. funiculosum con capacidad toxicogénica, no identificando los metabolitos tóxicos producidos. Coincidiendo con dicho autor, en el desarrollo del presente trabajo, se detectó una cepa toxicogénica de esta especie y se logró caracterizar cromatográficamente las fracciones del extracto que resultaron con respuesta positiva en los bioensayos.

Por otra parte, de igual forma se identificó la fracción tó

xica de una cepa de P. duclauxii, que mostró capacidad toxicogénica frente a la mayoría de los ensayos biológicos realizados. Esta especie no es considerada como productora de metabolitos tóxicos en la literatura consultada.

- . Las cepas de Fusarium resultaron toxicogénicas en un 57,5 %. Con respuesta "Muy tóxica" el 19,23 %, "Tóxica" el 34,62 %, "Débilmente tóxica" el 3,85 % y "No tóxica" el 42,30 %.

De las especies de Fusarium aisladas, resultaron toxicogénicas cepas de F. moniliforme, F. semitectum y F. solani.

Se detectó moniliformina y zearalenona en extractos de F. moniliforme, diacetoxyscirpenol en extractos de F. semitectum y toxina T-2 en extractos de F. solani, en concordancia con lo expuesto en la bibliografía (204).

- . Las cepas de Aspergillus resultaron toxicogénicas en un 47,19 %. Con respuesta "Muy tóxica" el 4,35 %, "Tóxica" el 39,13 %, "Débilmente tóxica" el 4,35 % y "No tóxica" el 52,81 %.

Manifestaron toxicidad cepas de A. flavus, A. parasiticus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, A. chevalieri y A. candidus.

Se detectó aflatoxinas en extractos de A. flavus y A. parasiticus, citrinina en un extracto de A. candidus, patulina en un extracto de A. terreus y gliotoxina en un extracto de A. chevalieri.

Se detectaron además metabolitos con características cromatográficas similares a fumitremorgina B en extractos de A. fumigatus y nigragilina en extractos de A. niger. Estas

micotoxinas son consideradas contaminantes poco frecuentes en alimentos.

En este "screening" se constató que A. fumigatus, además de los metabolitos tóxicos descritos en la bibliografía (20), es capaz de producir metabolitos mutagénicos. Se han determinado las características cromatográficas de la fracción - genotóxica.

- . Del resto de los hongos aislados resultaron toxicogénicos Curvularia lunata, Alternaria tenuis y Bipolaris sp.

Una cepa de C. lunata produjo un metabolito con propiedades cromatográficas similares al decumbín y A. tenuis al alternariol.

La cepa de Bipolaris sp. resultó productora de esterigmatocistina.

Estas micotoxinas son consideradas contaminantes poco frecuentes.

- . Los hallazgos encontrados en relación a cepas de P. funiculosum, P. duclauxii, P. oxalicum y A. fumigatus deberán ser confirmados en pruebas con animales de experimentación a mediano y largo plazo para conocer el real riesgo toxicológico, tal como lo aconseja el Environmental Protection Agency.
- . Dada la importancia de conocer la potencialidad toxicogénica de la flora fúngica que contamina nuestros alimentos y teniendo en cuenta que sólo los ensayos biológicos pueden poner en evidencia nuevas micotoxinas (219) y que ningún bioensayo es capaz de detectar todos los metabolitos tóxicos.

cos y considerando además los resultados estadísticos obtenidos y previamente discutidos en este trabajo, se sugiere:

Para realizar estudios preliminares de capacidad toxicogénica de cepas fúngicas, emplear el siguiente conjunto mínimo de bioensayos:

- * Elongación en B. thuringiensis y ensayo REC sin activación metabólica (por detectar ambos efectos genotóxicos).
- * Inhibición en B. thuringiensis (por haber sido el ensayo más sensible a los metabolitos tóxicos).
- * Citotoxicidad en células VERO (por tratarse de un bioensayo con células de mamífero).

Estos bioensayos son rápidos, sencillos y de relativo bajo costo.



V BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- (1) Jelinek, C. (1987). Distribución de las micotoxinas: Análisis de los datos mundiales sobre productos básicos, incluidos los datos del Programa conjunto internacional FAO / OMS / PNUMA sobre vigilancia de la contaminación de los alimentos.
Segunda Conferencia Internacional Mixta FAO / OMS / PNUMA sobre micotoxinas. Bangkok. Tailandia.
- (2) Informe de la Conferencia Mixta FAO / OMS / PNUMA sobre micotoxinas celebrada en Nairobi (1977).
Estudio FAO: Alimentación y Nutrición N° 2.
- (3) Criterios de salud ambiental 11. Micotoxinas (1979).
Publicación Científica N° 453. Organización Mundial de la Salud.
- (4) Koneman, E. W. and G. D. Roberts (1985). Micología. 3ra. edición.
Editorial Médica Panamericana.
- (5) Anderson, A. W. (1977). The significance of yeast and molds in food.
Food Technology. February 47-50.
- (6) Directrices para la vigilancia de las micotoxinas (1979).
ONU - FAO: Serie Inspección de los Alimentos N° 4.
- (7) Prácticas recomendadas para la prevención de las micotoxinas en los alimentos, piensos y sus productos. (1979).

ONU - FAO: Alimentación y Nutrición N° 10.

- (8) Shottwell, O. L. (1977). Mycotoxins - corn - related.
Cereal Food World 22 : 524 - 527.
- (9) Leonor, A. N. (1977). Current view of the chemical nature
of factors responsible for alimentary toxic aleukia.
In: Rodricks, J. V.; C. W. Hesseltine and M. A. Mehlman
eds. Mycotoxins in human and animal health.
Park Forest South. U.S.A. Pathotox. Publishers. 323 - 328.
- (10) Heathcote, J. G.; J. R. Hibbert (1978). Aflatoxins:
Chemical and Biological Aspects.
Developments in Food Science 1. Elsevier Scientific
Publisher Company.
- (11) Austwick, P. K. and G. Ayerst (1963). Groundnut microflora
and toxicology.
Chem. and Ind. 55 - 59.
- (12) Sargent, K.; R. B. Carnaghan and R. Allcroft (1963).
Toxic products in groundnuts: chemistry and origin.
Chem. and Ind. 53 - 54.
- (13) Sargent, K.; J. Sheridan and R. B. Carnaghan (1961).
Toxicity associated with certain samples of groundnuts.
Nature 193 : 1096.
- (14) Asao, T.; G. Büchi and M. M. Abdelkader (1965). The
structures of aflatoxins B₁ and G₁.
J. Am. Chem. Soc. 87 : 882 - 883.

- (15) Borker, E.; N. Insalata; C. P. Levi and J. S. Witzeman (1966). Mycotoxins in food and feeds. Adv. Appl. Microbiol. 8 : 315.
- (16) Campos, Marit de (1987). Relación entre micotoxinas y alimentación en Países en Desarrollo. Segunda Conferencia Mixta FAO / OMS / PNUMA sobre Micotoxinas. Tailandia.
- (17) Mycotoxins in human and animal health. Proceedings. Maryland. 1976. Ed. Rodricks, J. V.; C. W. Hesseltine and M. A. Mehlman. Pathotox. Publishers.
- (18) Micotoxinas. IV Congreso Argentino de Microbiología (1985). Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires.
- (19) Siriwardana, M. G. (1980) Les effets des mycotoxines sur Saccharomyces cerevisiae. Tesis Doctoral.
- (20) Cole, R. J. and R. H. Cox (1981). Handbook of toxic fungal Metabolites. Academic Press. New York.
- (21) Buther, W. H. (1971). In Mycotoxins in Human Health. Purchase ed. Macmillan. New York. pág. 141.
- (22) Detroy, R. W.; E. B. Lillehoj and A. Ciegler (1971). In "Microbial Toxins" (S. Kadis, A. Ciegler and S. J. Ajls. ed.) 6 : 3 - 178.

- (23) Donald, T. and P. Cletus (1988). Nucleic acid relatedness of Mycotoxin. Producing fungi.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (24) Frisvad, J. C.; K. Kiljegren and A. Svendsen (1988).
Mycotoxin and exoenzyme production by members of
Aspergillus Section Flavi: An integrated taxonomic approach
to their classification.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (25) Saito, M. (1988). Aflatoxin productivity of different
strains of Aspergillus flavus isolated in Thailand.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (26) Goldblatt, L. A. (1969). Aflatoxin.
Academic Press. New York and London.
- (27) Wogan, G. N. (1988). Molecular and Cellular events
associated with aflatoxin - induced hepatocarcinogenesis.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (28) Tandon, H. D. and B. N. Tandon (1988). Pathology of the
liver in an outbreak of aflatoxicosis in man with a
report on the follow up.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.

- (29) Purchase, I. F. H. and J. J. Van der Watt (1971). In: "Mycotoxins in Human Health " I. F. H. Purchase ed.; pág. 209.
- (30) Stoloff, I. (1982). In: Carcinogens and Mutants in the Environment. Vol. 1: Food Products. Ed. H. F. Stich. CRC Press.
- (31) Rabie, C. J. and M. Steyn (1976). Production of sterigmatocystin by Aspergillus versicolor and Bipolaris sorokiniana on semisynthetic liquid and solid media. Appl. Environ. Microbiol. 32: 206 - 208.
- (32) Steyn M. and J. Rabie (1975). Production of sterigmatocystin. J. Ass. Off. Anal. Chem. 58: 622 - 623.
- (33) Rabie, C. J. and M. Steyn (1977). New species of Aspergillus producing sterigmatocystin. Appl. Environ. Microbiol. 33: 1023 - 1025.
- (34) Halls, N. A. and J. C. Ayres (1975). Factors affecting production of sterigmatocystin in semisynthetic media. Appl. Environ. Microbiol. 30: 702 - 703.
- (35) Birkinshaw, J. H. and I. M. M. Hanmody (1957). Metabolic products of Aspergillus versicolor. Biochem. J. 65: 162 - 166.
- (36) Bullock, E. and J. C. Roberts (1962). Studies on mycological chemistry. Part XI. The structure of isosterigmatocystin.

- J. Chem. Soc. 4179 - 4183.
- (37) Noda, K.; M. Umeda and Y. Ueno (1981). Cytotoxic and mutagenic effects of sterigmatocystin on cultured chinese hamster cells.
Carcinogenesis 2 : 945 - 949.
- (38) Hsieh, D. P. H.; M. T. Lin and R. C. Yao (1973). Convection of sterigmatocystin to aflatoxin B₁ by Aspergillus parasiticus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52 : 992 - 997.
- (39) Donkersloot, J. A.; R. I. Mateles and S. S. Yang (1972). Isolation of averufin from a mutant of Aspergillus parasiticus impaired in aflatoxin biosynthesis.
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 47 : 1051-1055.
- (40) Lee, L. S.; J. W. Bennett; A. F. Cucullu and J. B. Stanley (1975). Synthesis of versicolorin A by a mutant strain of Aspergillus parasiticus deficient in aflatoxin production.
J. Agric. Food. Chem. 23 : 1132.
- (41) Proceedings of the International Symposium on Mycotoxins (1981).
National Research Centre. Cairo. Arab Republic of Egypt.
- (42) Anderson, M. S. and M. F. Dutton (1980). Biosynthesis of versicolorin A.
Appl. Environ. Microbiol. 40 : 706-709.

- (43) Van Walbeek, W. and P. M. Scott (1969). Penicillium viridicatum Westling: a new source of ochratoxin A. Can. J. Microbiol. 15: 1281-1285.
- (44) Yamazaki, M. (1970). Production of ochratoxin A by Aspergillus ochraceus isolated in Japan from mold rice. Appl. Microbiol. 20: 452-454.
- (45) Nesheim, S. (1969). Isolation and purification of ochratoxin A and B and preparation of their methyl and ethyl esters. J. Ass. Offic. Anal. Chem. 52: 975-979.
- (46) Searcy, J. W.; N. D. Davis and U. L. Diener (1969). Biosynthesis of ochratoxin A. Appl. Microbiol. 18: 622-627.
- (47) Steyn, P. S. and C. W. Holzappel (1970). The biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of Aspergillus ochraceus. Phytochemistry 9: 1977-1983.
- (48) Ciegler, A. and I. B. Lillehoj (1968). Mycotoxins. Adv. in Appl. Microbiol. 10: 155-219.
- (49) Pitout, M. J. (1971). In: Mycotoxins in Human Health. I. F. H. Purchase ed.; pág. 53.
- (50) Van der Merwe, K. J.; P. S. Steyn; L. Fourie; D. B. Scott and J. J. Theron (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus wilh. Nature (London) 205: 1112.

- (51) Hald, B. (1988). Human exposure to ochratoxins A.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (52) Applegate, K. L. and J. R. Chipley (1973). Ochratoxins.
Adv. Appl. Microbiol. 16: 97-109.
- (53) Gareis, M. (1988). Determination of ochratoxin A in
human milk.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (54) Fink-Gremmels, J. (1988). Risk evaluation of ochratoxins
A.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (55) Bamburg, J. R. and F. Strong (1971). "12-13 epoxytricho-
thecenes". In: Microbial Toxins. Kadis, S.; Ciegler, A.
and S. J. Ajl.
Ed. Academic Press Inc. (New York). VII, pág. 207.
- (56) Doyle, T. W. and W. Bradner (1980). Anticancer agents
based on natural products models. (Chapter 2).
Ed. Academic Press Inc. (New York; USA), pág. 43-79.
- (57) Ishii, K.; K. Sakai; Y. Ueno; H. Tsunoda and M. Enomoto
(1971). Solaniol a toxic metabolite of Fusarium solani.
Appl. Microbiol. 22: 718-720.
- (58) Saito, M. and K. Ohtsubo (1974). Trichothecene toxins of
fusarium species in: Mycotoxins I.

Purchase Elsevier. New York. pág. 263-281.

- (59) Abdel-Hafez, S. I.; I. A. El Kady; M. B. Mazen and O. M. El-Maghrady (1987). Mycotoxins and trichothecene toxins of paddy grains from Egypt. *Mycopathologia*. 100: 103-112.
- (60) Baldwin, N. C. P.; B. W. Bycroft; P. M. Dewick and J. Gilbert (1986). Metabolic conversions of the trichothecene mycotoxins: Biotransformation of 3-acetyldeoxynivalenol into fusarenone X. *Z. Naturforsch* 41C: 845-850.
- (61) Burmeister, H. R. (1971). T-2 toxins production by Fusarium tricinctum on solid substrate. *Appl. Microbiol.* 21: 739-742.
- (62) Greenholgh, R. (1986). Production and characterization of DON and other secondary metabolites of Fusarium culmorum. *J. Agric. Food. Chem.* 34: 98-102.
- (63) Hagler, W. M.; J. C. Mirocha and S. V. Pathre (1981). Biosynthesis of Radiolabeled T-2 toxin by Fusarium tricinctum. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1049-1051.
- (64) Ichince, M.; H. Kurata and Y. Ueno (1983). Chemotaxonomy of Gibberella zeae with special reference to production of trichothecenes and zearalenona. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1364-1369.

- (65) Ishii, K.; H. Soto and Y. Ueno (1985). Production of 3-acetydeoxynivalenol in shake culture.
Mycotoxin Research 1: 19-24.
- (66) Miller, J. D. and B. A. Blackwell (1986). Biosynthesis of 3-acetyl DON and other metabolite by Fusarium culmorum HLX in a stirred jar fermentor.
Can. J. Bact. 64: 1-5.
- (67) Snyder, A. P. (1986). Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins.
J. Food. Protection. 49: 544-569.
- (68) Ueno, Y. (1984). Contamination of foodstuffs by trichothecene mycotoxins.
Eisei Kagabu 30: 251-256.
- (69) Yoshizawa, T. and H. Hosokawa (1983). Natural concurrence of DON and nivalenol, trichothecene mycotoxins in commercial foods.
J. Food. Hyg. Soc. Japan 24: 413-415.
- (70) Karppanen, E.; A. Rizzo; S. Berg and E. Lindfors (1986). Fusarium mycotoxins as a problem in finish feeds and cereals.
J. Agric. Sci in Finland 57: 195-206.
- (71) Chi, M. S.; T. S. Robinson; C. J. Mirocha and K. R. Reddy (1978). Acute toxicity of 12-13 epoxytrichothecenes in one day - old broiler chicks.
Appl. Environ. Microbiol. 35: 636-640.

- (72) Ellison, R. A. and F. N. Kotsonis (1973). T-2 toxin as a emitec factor in moldy corn.
Appl. Microbiol. 26 : 540.
- (73) Forsyth, D. M.; T. Yoshizawa; N. Moroka (1977). Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine.
Appl. Environ. Microbiol. 34 : 577.
- (74) Friend, S. C. E.; D. Hancock and H. B. Schiefer (1983).
Experimental T-2 toxicosis in sheep.
Can. J. Comp. Med. 47 : 291-297.
- (75) Swanson, S. P.; W. Buck; R. J. Lambert and U. R. Beasley (1988). Toxicological evaluation of trichothecenes in farm animals.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (76) Tanaka, T. (1988). Worldwide natural occurrence of Fusarium mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenona.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (77) Natory, S. (1977). Mycotoxins in Human and Animal Health.
(J. V. Rodricks; C. W. Hesselstine and M. A. Mehlman eds.).
Pathotox Publ. Park Forest. South Illinois, pág. 559-581.
- (78) Steyn, P. S. (1977). Mycotoxins in Human and Animal Health.
(J. V. Rodricks; C. W. Hesselstine and M. A. Mehlman eds.).
Pathotox Publ. Park Forest. South Illinois, pág. 419-467.

- (79) Carter, S. B. (1967). Effects of Cytochalasins on mamalian cells.
Nature (London) 213 : 261.
- (80) Willians, J. A. and A. Wolff (1971). Cytochalasin B inhibits thyroid secretion.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44 : 422.
- (81) Hayes, A. W. (1976). Mycotoxins in Human and Animal Health (J. V. Rodricks; C. W. Hesseltine and M. A. Mehlman eds.).
Pathotox. Publ. Park Forest. South Illinois, pág. 507-509.
- (82) Moss, M. O. (1971). Microbial toxins (A. Ciegler; S. Kadis and S. J. Ajl eds.).
Academic Press. Vol. 6, pág. 381.
- (83) Newberne, P. M. (1974). Mycotoxins. (I. F. H. Purchase ed.).
Elsevier Am. New York, pág. 163.
- (84) Wilson, B. J. and C. H. Wilson (1962). Extraction and preliminary characterization of a hepatotoxic substance from cultures of Penicillium rubrum.
J. Bacteriol. 84 : 283.
- (85) Patterson, D. S. P.; B. A. Roberts; B. J. Shreeve and S. W. Mac-Donald (1979). Tremorgenic Toxins produced by soil fungus.
Appl. Environ. Microbiol. 37 : 172.
- (86) Wilson, B. J.; C. H. Wilson and A. W. Hayes (1968).
Tremorgenic toxin from Penicillium cyclopium grown on

food materials.

Nature (London) 220 : 177.

- (87) Davis, N. D.; U. L. Diener and G. Morgan (1977). Tenuazonic acid production by Alternaria alternata and Alternaria tenuissima isolated from cotton.
Appl. Environ. Microbiol. 34 : 155-156.
- (88) Gallagher, R. T. and G. C. M. Latch (1977). Production of the tremorgenic mycotoxins verruculogen and fumitremorgenic B by Penicillium piscarium Westling.
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 730.
- (89) Beuchat, L.R. (1988). Environmental factors influencing fumitremorgin production by Neosartorya fischeri.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (90) Leistner, R. (1988). Mould-fermented foods of Europe: Hazards and developments.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (91) Ali, M.; M. Nazar; R. A. Hassan and H. S. M. Ahmad (1988). Toxicity of Echinulin from Aspergillus chevalieri in rabbits.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (92) Fink-Gremmels, J.: M. Weiser and L. Leistner (1988).
Biological activity of tremorgenic mycotoxins.

7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.

- (93) Denis, P. H. (1988). Potential health hazards of myco-
toxins.

7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.

- (94) Bars, J. L. (1979). Cyclopiazonic acid production by
Penicillium camemberti Thom and natural occurrence of
this mycotoxin in cheese.

Appl. Environ. Microbiol. 38 : 1052.

- (95) Luk, K. C. and B. Kobb (1977). Production of cyclopiazo-
nic acid by Aspergillus flavus Link.

Appl. Environ. Microbiol. 31 : 138-140.

- (96) Holzapfel, C. W. (1968). The isolation and structure of
cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of Penicillium
cyclopium.

Tetrahedron 24 : 2101-2119.

- (97) Demain, A. L.; N. A. Hunt; U. Malik and H. Kobbe (1976).
Improved procedure for production of cytochalasin E and
tremorgenic mycotoxins by Aspergillus clavatus.

Appl. Environ. Microbiol. 31 : 138-140.

- (98) Golinsky, P. and Grabarkiewicz (1984). Chemical
confirmatory tests for ochratoxin A, citrinin, penicillic
acid, sterigmatocystin and zearalenone performed directly
on TLC plates.

- J. Ass. Off. Anal. Chem. 67 : 1108-1110.
- (99) Lindenfelser, L. A. and A. Ciegler (1977). Penicillic acid production in submerged culture.
Appl. Environ. Microbiol. 34 : 553-557.
- (100) Bacon, C. W.; J. G. Sweeney; J. D. Robbins and D. Burdick (1973). Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by Aspergillus ochraceus: temperature and moisture requirements.
Appl. Microbiol. 26 : 155-160.
- (101) Olivigni, F. J. and L. B. Bullerman (1978). Production of penicillic acid, patulin by an atypical Penicillium roqueforti isolate.
Appl. Environ. Microbiol. 35 : 435.
- (102) Nip. W. K. and F. S. Chu (1977). Production of (14C) patulin by Penicillium patulum.
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 814-815.
- (103) Ciegler, A; R. F. Vesonder and L. K. Jackson (1977). Production and biological activity of patulin and citrinin from Penicillium expansum.
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 1004.
- (104) Mc Kinley, E. R.; W. W. Carlton; G. D. Boon (1982). Patulin mycotoxicosis in the rats: toxicology, pathology and clinical pathology.
Fd. Chem. Toxic. 20 : 289 - 300.

- (105) Mayer, V. and M. S. Legator (1969). Production of "petite mutants" of Saccharomyces cerevisiae by patulin. J. Agric. Food Chem. 17 : 454-457.
- (106) Olivigni, F. J. and L. B. Bullerman (1978). A microbial assay for penicillic acid. J. Food Protection. 41 : 432-437.
- (107) Valletrisco, M. and I. Niola (1982). La patulina: stabilita, attivita biologica e tossicita di una micotossina. Industrie Alimentari. 293-295.
- (108) Birkinshaw, J. H. and A. Gawland (1962). Studies in the biochemistry of orsellinic acid by Penicillium madriti. Biochem. J. 84: 342-347.
- (109) Ciegler, A. (1972). Bioproduction of ochratoxin A and Penicillic acid by members of the Aspergillus ochraceus group. Can. J. Microbiol. 18 : 631-636.
- (110) Ciegler, A. (1970). Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agricultural commodities. Appl. Microbiol. 20 : 112-113.
- (111) Scott, P. M. and P. C. Kennedy (1976). Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from Penicillium roqueforti. J. Agric. Food. Chem. 24 : 865-868.
- (112) Wei, R. D.; P. E. Still; E. B. Smalley; H. K. Schnols

- and F. M. Strong (1973). Isolation and partial characterization of a mycotoxin from Penicillium roqueforti.
Appl. Microbiol. 25 : 111.
- (113) Scott, P. M.; P. C. Kennedy; J. Harvig and B. J. Blanchfield (1977). Study of conditions of production of roquefortine and other metabolites of Penicillium roqueforti.
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 249-253.
- (114) Ohmomo, S. T.; T. Sato and M. Abe (1975). Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids roquefortine A, B and C from the cultures of Penicillium roqueforti XII. Production of alkaloids and related substances by fungi.
J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 49 : 615-623.
- (115) Scott, P. M.; M. A. Merrien and J. Polonsky (1976). Roquefortine and isofumigaclavine A. metabolites from Penicillium roqueforti.
Experientia 32 : 140-142.
- (116) Scott, P. M.; M. A. Merrien and J. Polonsky (1979). Configuration of the 3,12 double bond of roquefortine.
J. Agric. Food. Chem. 27 : 201-202.
- (117) Dorner, J. W.; R. J. Cole; D. Wicklow and R. H. Cox (1980). Penicillium rubrum and Penicillium biforme, new sources of rugulovasines A and B.
Appl. Environ. Microbiol. 40 : 685-687.

- (118) Cole, R. J. and J. W. Kirksey (1976). Structures of rugulovasine A and B and 8-chlororugulovasine A and B. *Tetrahedron Lett.* 43 : 3849-3852.
- (119) Wilson, B. J. and C. H. Wilson (1962). Extraction and preliminary characterization of a hepatotoxic substance from cultures of Penicillium rubrum. *J. Bacteriol.* 84 : 283-290.
- (120) Abe, M.; S. Ohmomo; T. Ohashi and T. Tabuchi (1969). Isolation of chanoclavine and two new interconvertible alkaloids, rugulovasine A and B from cultures of Penicillium concavorugulosum. *Agric. Biol. Chem.* 33 : 469-671.
- (121) Curtin, T. P. and J. Reilly (1940). Production of phoenicine on synthetic media. *Biochem. J.* 34 : 1605-1610.
- (122) Atherton, L. G.; D. Brewer and J. Taylor (1974). In: *Mycotoxins*. I. F. H. Purchase ed.; Elsevier Amsterdam. pág. 29.
- (123) Miller, P. A.; P. W. Trowm and G. O. Fulmor (1968). An epidithia piperazinedione antiviral agent from Aspergillus terreus. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 33 : 219.
- (124) Mortimer, P. H. and A. Taylor (1962). Early hepatic disfunction preceding biliary obstruction in sheep intoxicated with sporidesmin.

Nature 194 : 550.

- (125) Peters, J. A. (1963). Mechanism of early sporidesmin intoxication in sheep. 200 : 286.
- (126) Thornton, R. H. and J. C. Percival (1959). A hepatotoxin from sporidesmin bakeri capable of producing facial eczema diseases in sheep.
Nature 183 : 63.
- (127) Trown, P. W. (1968). Antiviral activity of N, N' dimetil epidithia piperazinedione.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 33 : 402.
- (128) Kawai, K. (1988). Novel biologically active compounds from Emericella species.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (129) Hyde, M. B. and H. B. Galleymore (1951). The subepidermal fungi of cereal grains II. The nature, identity and origin of the mycelium in wheat.
Ann. Appl. Biol. 38 : 348-357.
- (130) Harvan, D. J. and R. J. Pero (1976). The structure and toxicity of the Alternaria metabolites.
Adv. Chem. Ser. 149 : 344-355.
- (131) Harwing, J.; P. M. Scott; D. R. Stoltz and B. J. Blanchfield (1979). Toxins of molds from decaying tomato fruit.
Appl. Environ. Microbiol. 38 : 267-274.

- (132) Stinson, E. F.; S. F. Osman; E. G. Heisler; J. Sicilia-
no and D. B. Bills (1981). Mycotoxins production in
whole apples, oranges and lemons.
J. Agric. Food Chem. 29 : 790-792.
- (133) Soderhall, K.; E. Svenson and T. Unestam (1978). Light
inhibits the production of alternariol and alternariol
monomethyl ether in Alternaria alternata.
Appl. Environ. Microbiol. 36 : 655-657.
- (134) Stinson, E. F.; D. D. Bills; S. F. Osman and J. Sicilia-
no (1980). Mycotoxin production by Alternaria species
grown on apples, tomatoes and blueberries.
J. Agric. Food Chem. 28 : 960-963.
- (135) Visconti, A. and A. Bottalico (1988). Isoaltenuene: A
new metabolite of Alternaria alternata.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (136) Griffin, G. F. and F. S. Chu (1983). Toxicity of the
alternaria metabolites alternariol, alternariol methyl-
eter, altenuene and tenuazonic acid in the chicken
embryo assay.
Appl. Environ. Microbiol. 46 : 1420-1422.
- (137) Gui-Ting-Liu (1988). A systematic study on mutagenicity,
carcinogenicity and effective constituents of Alternaria
alternata.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.

- (138) Templeton, G. E. (1972). Alternaria toxins related to pathogenesis in plants. In: Kadis - Ciegler. Microbial toxins. Vol. II. Academic Press. New York, pág. 169-192.
- (139) Forgacs, J. and W. T. Carll (1955). Preliminary mycotoxins studies on hemorrhagic disease in poultry. Vet. Med. (Kansas), 50 : 172.
- (140) Douplik, B. J. and E. Sobers (1968). Mycotoxicosis: toxicity to chicks of Alternaria longipes isolated from tobacco. Appl. Microbiol. 16 : 1596-1597.
- (141) Ciegler, A.; A. Wallace Hayes and R. Vesonder (1980). Production and biological activity of secalonic acid D. Appl. Environ. Microbiol. 39 : 285-287.
- (142) Anderson, R.; G. Buchi; B. Kobbe and A. Demain (1977). Secalonic acids D and F are toxic metabolites of Aspergillus aculeatus. J. Org. Chem. 42 : 352-353.
- (143) Howard, C. and R. Johnstone (1973). Fungal metabolites. Stereochemical features and mass spectrometry of secalonic acids. Chem. Soc. Perkins Trans. 1 : 2033-2036.
- (144) Steyn, P. S. (1970). The isolation, structure and absolute configuration of secalonic acid D, the toxic

metabolites of Penicillium oxalicum.

Tetrahedron 26 : 51-57.

- (145) Yamazaki, M. (1971). The isolation of secalonic acid A from Aspergillus ochraceus cultured on rice. Chem. Pharm. Bull. 19 : 199-201.
- (146) Takahashi, N. and R. W. Curtis (1961). Isolation and characterization of malformin. Plant Physiol. 36 : 30-36.
- (147) Takenchi, S.; M. Senn and R. W. Curtis (1967). Chemical studies on malformin V, malformin B, and B₂. Phytochemistry 6 : 287-292.
- (148) Anderegg, R. J.; K. Biemann, G. Buchi and M. Cushman (1976). Malformin C, a new metabolite of Aspergillus niger. J. Am. Chem. Soc. 98 : 3365-3370.
- (149) Kobbe, B. and M. Cushman (1977). Production and antibacterial activity of malformin C a toxic metabolite of Aspergillus niger. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 996-997.
- (150) Curtis, R. W. (1961). Studies on the response of bean seedlings on corn roots to malformins. Plant Physiol. 36 : 37-43.
- (151) Suda, S. and R. W. Curtis (1966). Antibiotic properties of malformin. Appl. Microbiol. 14 : 475-476.

- (152) Curtis, R. W.; W. R. Stevenson and J. Tuite (1974).
Malformin in Aspergillus niger infected onions bulbs.
Appl. Environ. Microbiol. 28 : 362.
- (153) Ishii, K. and Y. Ueno (1973). Production of the hepato-
toxic chlorine-containing peptide by Penicillium islandic-
dicum Sopp.
Appl. Microbiol. 26 : 359-363.
- (154) Ueno, Y. and T. Ishikawa (1969). Production of luteosky-
rin, a hepatotoxic pigment by Penicillium islandicum
Sopp.
Appl. Microbiol. 18 : 406-409.
- (155) Uraguchi, K. and M. Saito (1972). Chronic toxicity and
carcinogenicity in mice of the purified mycotoxins
luteoskyrin and cyclochlorotine.
Food Cosmet. Toxicol. 10 : 193-207.
- (156) Wells, J.; R. Cole and K. Kirskey (1975). Emodin, a
toxic metabolite of Aspergillus wentii isolated from
weevil-damaged chestnuts.
Appl. Microbiol. 30 : 26-28.
- (157) Ueno, Y.; A. Platel et P. Fromageot (1967). Interaction
entre pigments et acides nucleiques. Interaction in vi-
tro entre la luteoskyrine et le DNA de thymus de veau.
Biochim. Biophys. Acta 134 : 27-36.
- (158) Grosh, A. C.; A. Manmade; B. Kobbe, J. M. Townsend and
A. L. Demain (1978). Production of luteoskyrin and

- isolation of a new metabolite pibasterol from Penicillium islandicum Sopp.
Appl. Environ. Microbiol. 35 : 563-566.
- (159) Boyd, M. and L. Burka (1973). Lung-toxic furanoterpenoids produced by sweet potatoes (IPOMEA BATATAS) following microbial infection.
Biochim. et Biophys. Acta 337 : 184-195.
- (160) Wilson, B.; D. Yang and M. Boyd (1970). Toxicity of mould-damaged sweet potatoes.
Nature 27 : 521-522.
- (161) Gilbert, C. and J. Gillman (1963). Yams and liver necrosis.
Nature 198 : 196-197.
- (162) Jansen, C. M. and K. Dose (1985). Simultaneous isolation of Hauthomegnin, Viomellein, Rubrosulphin, Viopurpurin and Brevianamide A by preparative HPLC.
Mycotoxin Research 1 : 11-18.
- (163) Blank, F. (1966). Metabolites of pathogenic fungi V. Isolation and tentative structures of Vioxanthin and Viopurpurin, two colored metabolites of Trichophyton violaceum.
Can. J. Chem. 44 : 2873-2879.
- (164) Wirth, J. and T. E. Beesley (1965). The isolation of xanthomegnin from several strains of the dermatophyte, Trichophyton rubrum.

Phytochemistry 4 : 505-509.

- (165) Yust, G. and W. C. Day (1963). Metabolites of pathogenic fungi III. The structure of wanthomegnin.
Can. J. Chem. 41 : 74-79.
- (166) Stack, M. E.; R. M. Eppley; P. A. Dreifuss and A. E. Pohland (1977).
Isolation and identification of xanthomegnin, viomellein, rubrosulphin and viopurpurin as metabolites of Penicillium viridicatum.
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 2351-2355.
- (167) Stack, M. E. and P. B. Mislivec (1978). Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of Aspergillus ochraceus, Penicillium cyclopium and Penicillium viridicatum.
Appl. Environ. Microbiol. 36 : 552-554.
- (168) Veselá, D.; D. Veselý and R. Jelinek (1983). Toxic effects of ochratoxin A and citrinin. Alone and in combination on chicken embryos.
Appl. Environ. Microbiol. 45 : 91-93.
- (169) Jackson, L. K. and A. Ciegler (1978). Production and analysis of citrinin in corn.
Appl. Environ. Microbiol. 36 : 408-411.
- (170) Curtis, R. F.; C. H. Hassall and M. Nazar (1968). The biosynthesis of phenols. XV. Some metabolites of Penicillium citrinum relate to citrinin.

- J. Chem. Soc. 85-93.
- (171) Damodaran, C.; C. S. Ramadoss and E. R. B. Sahnugasun-
daran (1973). A rapid procedure for the isolation
identification and estimation of citrinin.
Anal. Biochem. 52 : 482-488.
- (172) Mathieson, D. and W. B. Whalley (1964). The chemistry
of fungi XLIV. The conformation of citrinin.
J. Chem. Soc. 4640-4641.
- (173) Rodig, O. R.; L. C. Ellis and J. T. Glover (1966). The
biosynthesis of citrinin in Penicillium citrinum.
Production and degradation of citrinin.
Biochemistry 5 : 2451-2458.
- (174) Ciegler, A.; R. F. Vesonder and L. K. Jackson (1977).
Production and biological activity of patulin and
citrinin from Penicillium expansum.
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 1004-1006.
- (175) Adams, E.; G. Tood and W. Gibson (1975). Long term
toxicity study of mycophenolic acids in rabbits.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 34 : 509-512.
- (176) Birkinshaw, J. H.; H. Raistrick and D. J. Ross (1952).
Studies in the biochemistry of mycophenolic acid.
Biochem. J. 50 : 630-634.
- (177) Multon, C. P. and J. M. Campbell (1977). Mycophenolic
acid is produced during balanced growth of Penicillium
brevi-compactum.

- Can. J. Microbiol. 23 : 20-27.
- (178) Lafont, P.; J. P. Debeaupius; M. Gaillardin and J. Pagen (1979). Production of mycophenolic acid by Penicillium roqueforti strains.
Appl. Environ. Microbiol. 37 : 365-368.
- (179) Wei, R. D. and G. X. Liu (1978). PR toxin production in different Penicillium roqueforti strains.
Appl. Environ. Microbiol. 35 : 797-799.
- (180) Moule, Y.; M. Jemali and N. Rousseau (1976). Mechanism of the inhibition of transcription by PR toxin a mycotoxin from Penicillium roqueforti.
Chem. Biol. Interact. 14 : 207-216.
- (181) Wei, R. D.; P. E. Still; E. B. Smalley; H. K. Schnoes and F. M. Strong (1973). Isolation and partial characterization of a mycotoxin from Penicillium roqueforti.
Appl. Microbiol. 25 : 111-114.
- (182) Moreau, S.; A. Lablache-Combiere and J. Biquet (1980). Production of eremofortins A, B and C relative to formation of PR toxin by Penicillium roqueforti.
Appl. Environ. Microbiol. 39 : 770-776.
- (183) Moule, Y.; S. Moreau and J. F. Bousquet (1977). Relationships between the chemical structure and the biological properties of some ermophilane compounds related to PR toxin.
Chem. Biol. Interact. 17 : 185-192.

- (184) Cole, R. I.; J. W. Dorner; R. H. Cox; R. A. Hill; H. G. Cluter and J. M. Wells (1981). The isolation and identification of citreoviridin. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 677-681.
- (185) Franck B. and H. P. Gehrken (1980). Citreoviridins from Aspergillus terreus. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 19 : 461-462.
- (186) Nagel, D. W. and P. S. Steyn (1972). Biosynthesis of citreoviridin. *Phytochemistry.* 11 : 3215-3218.
- (187) Nagel, D. W.; P. S. Steyn and D. B. Scott (1972). Production of citreoviridin by Penicillium pulvillorum. *Phytochemistry.* 11 : 627-630.
- (188) Ueno, Y. (1972). Production of citreoviridin, a neurotoxic mycotoxin of Penicillium citreoviride. I. F. H. Purchase Ed. *Mycotoxins in human health: Symposium.* Halstead Press. New York. pág. 115-132.
- (189) Chi, M. S. and C. J. Mirocha (1980). Effect of zearalenona on female white Leghorn chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 1026.
- (190) Hagler, W. H. and C. J. Mirocha (1980). Biosynthesis of C¹⁴ zearalenona from (1¹⁴-C) acetate by Fusarium roseum. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 668.
- (191) Hagler, W. H. and C. J. Mirocha (1980). Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced

- by Fusarium roseum in rice culture
Appl. Environ. Microbiol. 37 : 849.
- (192) Hidy, P. H.; R. S. Baldwin and R. L. Greasham (1977).
Zearalenone and some derivatives: production and biological activities.
Adv. Appl. Microbiol. 22 : 59.
- (193) Rabie, C. J.; A. Lubben; A. J. Lown; E. B. Rathbone and P. S. Steyn (1978). Moniliformin a mycotoxin from Fusarium fusarioides.
Agricultural and Food Chemistry 26 : 375-379.
- (194) Burmeister, H. R.; A. Ciegler and R. F. Vesonder (1979).
Moniliformin a metabolite of Fusarium moniliforme NRRL 6322. Purification and toxicity.
Appl. Environ. Microbiol. 37 : 11-13.
- (195) Busky, W. F. and G. N. Wogan (1983). Psoralens. Chapter 7. In: Mycotoxin and N-nitrosocompounds: Environmental Risks Vol. II.
Editor R. C. Shank. C.R.C. Press, pág. 105-119.
- (196) Ling, K. H.; C. K. Yang and F. T. Peng (1979). Tremors, tremorigenic mycotoxins of Aspergillus terreus.
Appl. Environ. Microbiol. 37 : 355-357.
- (197) Stark, A. A.; B. Kobbe; K. Matsuo; G. Buchi ; G. N. Wogan and A. L. Demain (1978). Mollicellins: mutagenic and antibacterial mycotoxins.
Appl. Environ. Microbiol. 36 : 412-420.

- (198) Lanigan, G. W.; A. L. Payne; L. W. Smith; P. M. Wood and D. Petterson (1979). Phomopsin A production by Phomopsis leptostromiformis in liquid media. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 : 289-292.
- (199) Marasas, W. F. O. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by Fusarium moniliforme. 7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (200) Steyn, P. and R. Vleggaar (1988). Recent advances on the chemistry of mycotoxins. 7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (201) Greenhalgh, R. (1988). Apotriconothecenes. Minor metabolites of the Fusarium species. 7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (202) Mirocha, Ch. (1988). Chemistry, occurrence and toxicology of the hemorrhagic Mycotoxin produced by Fusarium. 7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Tokyo.
- (203) Debeaupuis, J. P. and P. Lafont (1978). Fumitoxins, new mycotoxins from Aspergillus fumigatus Fres. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 8-10.
- (204) Marasas, W. F. O.; P. E. Nelson and T. A. Toussoun

- (1984). Toxigenic Fusarium Species. Identity and mycotoxicology.
The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania.
- (205) Vaamonde, G. (1988). Factores que afectan el crecimiento de hongos toxicogénicos y la producción de micotoxinas.
Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas. Buenos Aires.
- (206) Basflico, J. C.; A. Sauboís; O. Balestrino y J. Payen (1986). Influencia de las condiciones de cultivo sobre la producción de tricotecenos en cepas de Fusarium.
Rev. Lat. Amer. Microbiol. 28: 153-155.
- (207) Lurá, M. C. E.; A. M. González; M. I. Caffer y J. C. Basflico (1988). Estudio de la capacidad toxicogénica de los hongos aislados a partir de maíz y sus derivados.
Revista de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, 1: 31-34.
- (208) Smith, J. E. and M. O. Moss (1985). Mycotoxins, Formation, Analysis and Significance.
John Willey and Sons Ltd.
- (209) Diener, V. L. and N. D. Davis (1977). Aflatoxin formation in peanuts by Aspergillus flavus.
Bulletin 493. Agricultural Experiment Station. Auburn University.
- (210) Eugenio, C. P.; C. M. Christensen and C. J. Mirocha

- (1970). Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by Fusarium roseum.
Phytopathology 60 : 1055-1057.
- (211) Montani, M. L.; G. Vaamonde; S. L. Resnik and M. P. Buera (1988). Influencia of water activity and temperature on the accumulation of zearalenona in corn.
Int. J. Food Microbiol. 6 : 1-8.
- (212) Northolt, M. D.; H. P. Van Egmond and N. E. Paulsch (1978). Patulin production by some fungal species in relation to water activity and temperature.
J. Food Prot. 41 : 885-890.
- (213) Northolt, M. D.; H. P. Van Egmond and N. E. Paulsch (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature.
J. Food Prot. 42 : 485-490.
- (214) Northolt, M. D.; H. P. Van Egmond and N. E. Paulsch (1979). Penicillic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature.
J. Food Prot. 42 : 476-484.
- (215) Magan, N. and J. Lancey (1984). The effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 82 : 83-93.
- (216) Synder, A. P. (1986). Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins.

- J. Food Prot. 42 : 485-490.
- (217) Basflico, J. C. (1988). Detección de micotoxinas y hongos toxicogénicos mediante la utilización de ensayos biológicos.
Seminario Latinoamericano y del Caribe sobre Micotoxinas. Buenos Aires.
- (218) Testing capability and resources (1983).
Department of molecular toxicology. Litton bionetics Inc. Kesington.
- (219) Watson, D. H. and D. Lindsay (1982). A critical review of biological methods for the detection of fungal toxins in food and foodstuffs.
J. Sci. Food Agric. 33 : 59-67.
- (220) Robert, B. A. and D. Patterson (1975). Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs using a novel membrane cleanup procedure.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 58 : 1178-1181.
- (221) Patterson, D. and B. A. Roberts (1979). Mycotoxins in animal feedstuffs: sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone and T-2 toxin.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 62 : 1265-1267.
- (222) Curtis, R. F.; D. T. Coxon and G. Levett (1974). Toxicity of fatty acids in assays for mycotoxins using the brine shrimp.

- Fd. Cosmet. Toxicol. 72 : 233-235.
- (223) Ueno, Y. and N. Shimada (1974). Reconfirmation of the specific nature of reticulocytos bioassay system to trichotecenes mycotoxins of *Fusarium*.
Chem. Pharm. Bull. 22 : 2744-2746.
- (224) Mathur, C. F. and C. Bortnes (1978). Dimethyl sulfoxide reversal of aflatoxin B₁ toxicity.
Abstracts Ann. Meeting. Amer. Soc. Microbiol. 78 : 180.
- (225) Boutibonnes, P.; C. Malherbe; Y. Auffray; W. Kogbo and C. Marais (1983). Mycotoxin sensitivity of Bacillus thuringiensis.
IRCS Medical Science: Pharmacology 11 : 430-431.
- (226) De Waart, J.; F. Van Aken and H. Pouww (1972). Detection of orally toxic microbiol metabolites in foods with bioassay systems.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 222 : 96-114.
- (227) Leifer, Z.; M. Kada; M. Mandel and E. Zeiger (1981). An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity.
Mutation Research 87 : 211297.
- (228) Reiss, J. (1975). Mycotoxins bioassay using B. stearo-thermophilus.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 58 : 624-625.
- (229) Broces, D.; R. Grodner; R. Killebrew and F. Bonner (1970). Ochratoxins A and B: Confirmation by microbio -

- logical assay using B. cereus mycoides.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 53 : 616-619.
- (230) Schmuller, P.; W. Horwitz and L. Stoloff (1976). A review of sampling plans and collaboratively studied methods of analysis for aflatoxins.
J. Assoc. Anal. Chem. 59 : 1315-1343.
- (231) Uwaifo, A. and O. Bassir (1978). Toxic effects of aflatoxin B, on Bacillus brevis.
Biochem. Exp. Biol. 14 : 276-382.
- (232) Quillardet, P.; O. Huisman; R. D'Ari and M. Hofnung (1982). SOS chromotest a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity.
Proct. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 5971-5975.
- (233) Yates, I. and Y. Porter (1982). Bacterial bioluminescence as a Bioassay for myxotoxins.
Appl. Env. Microbiol. Nov. 1072-1075.
- (234) Ames, B.; J. Mc'Cann and E. Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.
Mutation Research 31 : 347-364.
- (235) Pathre S. and C. Mirocha (1977). Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence.
In: Mycotoxins in Human and Animal Health.
Rodricks J. Hesseltine C. Mehlman M. Eds., Pathotox

Publishers Inc., pág. 229-253.

- (236) Loprieno, N. and R. Barale (1974). The use of different test systems with yeasts for the evaluation of chemically induced gene conversions and gene mutations. *Mut. Res.* 25 : 197-217.
- (237) Hayes, A.; R. Melton and S. Smith (1974). Effect of alfatoxin B₁, ochratoxin and rubratoxin B on a protozoan, Tetrahymena pyriformis. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* II : 321-325.
- (238) Microbial Test for Mutagenicity / Carciogenicity (1985). Editorial by Traul K. *Benchmark Papers in Microbiology Series*, pág. 164-202.
- (239) Ikawa, M. and D. Meeker (1969). Use of Chlorella in mycotoxin and phycotoxin research. *J. Agric. Fd. Chem.* 17 : 425-429.
- (240) Dive, D.; S. Moreau and M. Cacan (1978). Use of a ciliate protozoan for fungal toxins studies. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 19 : 489-494.
- (241) Schmit, R. (1985). Optical motility test for the detection of trichothecenes using Brine shrimps. *Mycotoxin Research* 1 : 25-27.
- (242) Sinnhuber, R. (1977). Trout bioassay of mycotoxins. In: *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox Publishers, pág. 731-744.

- (243) Abedi, Z. and P. Scott (1969). Detection of toxicity of aflatoxins, sterigmatocystin and other fungal toxins by lethal action on Zebra fish larvae.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 51 : 902-905.
- (244) Mintzloff, H. and W. Christ (1972). Biological determination of mycotoxins with the chick embryo test.
Fleischurrttschaft 52 : 1174-1176.
- (245) Murakiski, S.; T. Ohotomo and H. Kurata (1973). Toxic effects of various mycotoxins on silk worm larvae in adlibitum feeding tests.
J. Fd. Hyg. Soc. Japan 14 : 65-68.
- (246) Van Der Merwe, K.; P. Stein; L. Fourie; D. Scott and J. Theron (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by A. ochraceus.
Nature (London), 205 : 1112-1113.
- (247) Sauer, D. and L. Seitz (1978). Toxicity of Alternaria metabolites found in leafy sorghum grain at harvest.
J. Agric. Fd. Chem. 26 : 1380-1383.
- (248) Wei, R.; E. Smalley and F. Strong (1972). Improved skin test for detection of T-2 toxin.
Appl. Microbiol. 23 : 1029-1030.
- (249) Burmeister, H.; R. Vesonder and W. Kwokel (1980). Mouse bioassay for Fusarium metabolites: rejection or acceptance when dissolved in drinking water.
Appl. Environ. Microbiol. 39 : 957-961.

- (250) Ohtsubo, K.; M. Saito and H. Kimura (1978). High incidence of hepatic tumours in rats fed mouldy rice contaminated with Aspergillus versicolor containing sterigmatocystin.
Fd. Cosmet. Toxicol. 16 : 143-149.
- (251) Tatsuno, T.; K. Ohtsubo and M. Saito (1973). Chemical and biological detection of 12-13 epoxytrichothecenes isolated from Fusarium species.
Pure and Appl. Chem. 35 : 309-313.
- (252) Eppley, R. (1975). Methods for the detection of trichothecenes.
J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 58 : 906-908.
- (253) San, R. and H. Stich (1975). DNA repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens.
Inst. J. Cancer. 16 : 284-291.
- (254) Umeda, M. (1977). Cytotoxicity of mycotoxins. In: Mycotoxins in Human and Animal Health.
Rodricks, Hesseltine C. Eds., Pathotox Publisher, pág. 713-729.
- (255) Ueno, Y. and N. Shimada (1974). Reconfirmation of the specific nature of reticulocytes bioassay systems.
Chem. Pharm. Bull. 22 : 2744-2746.
- (256) Payen, J.; P. Lafont; R. Parache et F. Boller (1978). Detection des Souches toxiques de Fusarium. In: "Myco-

toxins".

Masson. Paris. C. R. Soc. Fr. Toxicol. Med. 107 : 111-118.

- (257) Siriwardana, T. et P. Lafont (1978). New sensitive biological assay for 12-13 epoxytrichothecenes. Appl. and Env. Microbiol. 35 : 206-207.
- (258) Mayer, A. (1969). A simple bioassay for detection of aflatoxin in milk. Toxicon. 7 : 13-14.
- (259) Clements, N. L. (1968). Rapid confirmatory test for aflatoxin B, using Bacillus megaterium. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 51 : 1192-1194.
- (260) Boutibonnes, P. (1976). Effect antibacterien de quelques mycotoxines et metabolites fongiques vis a vis de souches de Bacillus thuringiensis sensibles ou résist_{en}tes a l'aflatoxine B₁. Can. J. Microbiol. 22 : 884-886.
- (261) Olivigni, F. J. and L. B. Bullerman (1978). A microbiological assay for penicillic acid. J. Food Protection 41 : 432-434.
- (262) Boutibonnes, P. and P. Jacquet (1976). Test biologique de detection des mycotoxines aflatoxine B₁ et patuline par utilization de Bacillus thuringiensis. Bull. Acad. Vet. de France 49 : 491-502.

- (263) Kopp, B.; H. J. Rehm (1979). Ein biologischer test zur quantitativen bestimmung von roquefortin.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 169 : 90-91.
- (264) Boutibonnes, P. et. S. Lemarinier (1981). Alterations cytologiques induites par la zéaralenone chez Bacillus thuringiensis.
Mycopathologia 74 : 107-111.
- (265) Saubois, A. y J. C. Basflico (1988). Utilización de Bacillus megaterium y Bacillus thuringiensis para la detección de hongos toxicogénicos.
Boletín Micológico 3 : 243-247.
- (266) De Pauli, E. (1986). Tesis doctoral: Phytotoxicity of T-2 toxin.
Mycotoxin Research 2 : 109.
- (267) Saubois, A.; J. C. Basflico y J. Payen (1985). Ensayo biológico rápido para la detección de cepas productoras de algunos tricotecenos.
Rev. Fac. Ing. Quím. Universidad Nacional del Litoral XLVII : 25-28.
- (268) Kada, T. (1972). In vitro and host mediated "REC assay".
Procedures for screening chemical mutagens.
Mutat. Res. 16 : 165-174.
- (269) Bernheimer, A. W. (1968). Cytolytic toxins of bacterial origin.
Science 159: 847-851.

- (270) Sharpless, E. and J. H. Schwarb (1960). An intracellular hemolysin of a group A streptococci - IV - Lethal activity in mice.
J. Bacteriol. 79 : 496-501.
- (271) Kinsky, S. C. (1967). Antibiotics. Vol. 1. Mechanism of Action.
Gottlieb, D. and P. D. Shaw Eds. Springer Verlag, Berlin, Germany, pág. 122.
- (272) Girard, T. (1981). Hemolyse induites par les mycotoxines et metabolites fongiques.
Conference a la Faculté de Pharmacie de Nancy, France.
- (273) González, A. M. y J. C. Basílico (1983). Capacidad hemolítica de micotoxinas y de hongos aislados a partir de componentes de alimentos para aves.
III Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Santa Fe, pág. 117.
- (274) Lafont, J. et C. Frayssinet (1969). Mycotoxines élaborées par des Aspergillus. Leur activité sur l'embryon de Poulet.
Compte Rendu Societe Biologie Séance du 24 de Juin, pág. 1362-1364.
- (275) Jelinek, R. (1977). The chick Embryotoxicity test. In: Methods in Prenatal Toxicology.
Neubert, D., H. J. Merker and T. E. Kwasigroch Eds., págs. 381-386.

- (276) Veselý, D.; D. Veselá and R. Jelinek (1982). Nineteen mycotoxins tested on chicken embryos.
Toxicology Letters 13 : 239-245.
- (277) Archer, M. (1974). Detection of mycotoxins in foodstuffs by use of chick embryos.
Mycopathologia et Mycologia Applicata 54 : 453-467.
- (278) Roux, W. (1885). Beitrage zur Entwicklungsmechanik des Embryo.
Ztschr. Biol. 21 : 411.
- (279) Harrison, R.G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 4 : 140.
- (280) Burrow, M. T. (1910). The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body.
J. A. M. A. 55 : 2057.
- (281) Nakano, N. (1973). Chemical and biological assay of fusarenone x and diacetoxyscirpenol in cereal grains.
J. Fd. Hyg. Soc. Japan. 14 : 56-64.
- (282) Robb, J. and M. Norval (1983). Comparison of cytotoxicity and Thin-Layer Chromatography Methods for Detection of Mycotoxins.
Appl. Environ. Microbiol. 46 : 948-950.
- (283) Lurá, M. C. E. (1980). Aislamiento e identificación de hongos, a partir de alimentos para aves y de sus componentes. Su acción sobre aves en desarrollo. Identifica-

ción de las principales micotoxinas conocidas que pudie
ran ser producidas por las cepas depresoras del creci--
miento.

Tesis doctoral.

- (284) Smith, G. (1963). Introducción a la micología industrial.
Ed. Acribia, 288.
- (285) Barnett, H. L. (1956). Illustrated genera of Imperfect
Fungi.
Burgess Publ. Co. Minn.
- (286) Pitt, J. I. and A. D. Hocking (1985). Fungi and spoilage
food.
Academic Press Inc.
- (287) Thom, C. and K. B. Raper (1945). Manual of the Aspergi-
lli.
The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- (288) Raper, K. B. and C. Thom (1949). Manual of the Penici-
llia.
The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- (289) Pitt, J. I. (1979). The Genus Penicillium.
Academic Press Inc.
- (290) Booth, C. (1977). Fusarium. Laboratory guide to the
identification of the major species.
Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- (291) Gerlach, W. and H. Nirenberg (1982). The Genus Fusarium.

Kommissiionsvelas Paul Parey.

- (292) Joffe, A. Z. (1974). A modern system of Fusarium taxonomy.
Mycopath et Mycol. Appl. 53 : 201-228.
- (293) Czygan, P.; H. Greim; A. J. Garro (1973). Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P-450 dependency of its activation to a mutagen.
Cancer. Res. 33 : 2983-2986.
- (294) Garner, R. C.; E. C. Miller and J. A. Miller (1972). Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivate toxic to Salmonella typhimurium TA 1530.
Cancer. Res. 32 : 2058-2066.
- (295) Garcia, M.; J. Daffner y J. C. Basílico (1987). Estudio de letalidad y teratogénesis de extractos fúngicos en huevos embrionados.
III Congreso Argentino de Micología. Mar del Plata.
- (296) Scott, P. M.; J. W. Lawrence and W. Van Walbeek (1970). Detection of mycotoxins by Thin Layer Chromatography: Application to screening of fungal extracts.
Applied Microbiology 20 : 839-842.
- (297) Kamimura, H. (1981). Simultaneous detection of several Fusarium mycotoxins in cereals, grains and foodstuffs.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64 : 1067-1073.

- (298) Kreyszig, E. (1974). Introducción a la Estadística Matemática. Principios y Métodos.
Ed. Limusa.
- (299) Stark, A. A. (1980). Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins.
Ann. Rev. Microbiol. 34 : 235-262.
- (300) Tabbache, S. (1980). Contribution a la detection des souches toxiques de moisissures des aliments.
Tesis doctoral.
- (301) ~~Varsavsky~~, E.; E. P. Banchemo; M. A. Sala de Miguel y R. Cantoni (1979). Determinación de aflatoxinas y hongos toxicogénicos en alimentos balanceados.
Rev. Argentina de Microbiología 11 : 108-113.
- (302) Lurá, M. C. E. (1983). Aislamiento e identificación de hongos, a partir de alimentos para aves.
III Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Santa Fe.
- (303) Umansky, G. y B. C. Bracalenti (1983). Micotoxinas en alimentos para cerdos.
Informe CONICET.
- (304) Hassan, M. (1980) La pourriture seche des tubercules de Pomme-de-terre de consommation. Etude mycotoxicologique.
Tesis doctoral.

- (305) Carini, S. (1977). Sulla presenza di muffe e micotossini in fromaggi italiani.
Società Italiana di Microbiologia Applicata (18-11-77).
- (306) Jia Zhen-Zhen (1988). A review of the study on fungi and micotoxins in foodstuffs in Beijing during the last 10 years.
7th. International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.
Tokyo.
- (307) Mujica, M. T. y B. C. de Bracalenti (1983). Comparación de dos métodos rápidos para revelar la presencia de hongos toxicogénicos.
Rev. Latinoamericana de Microbiología 25 : 193-196.
- (308) Veselý, D. and D. Veselá (1984). Use of chick embryo in screening for toxin - producing fungi.
Mycopathologia 88 : 135-140.
- (309) Lurá, M. C. E. y J. C. Basílico (1986). Acción biológica de hongos contaminantes de alimentos para aves.
Acta Científica Venezolana 37 : 437-440.